

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 651**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2016 PCT/US2016/056073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17062820**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2016 E 16782384 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3359562**

54 Título: **Receptores de antígeno quimérico y métodos de uso**

30 Prioridad:

09.10.2015 US 201562239509 P

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

11.08.2020

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
910 Clopper Road, Suite 200S
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**ORENTAS, RIMAS;
SCHNEIDER, DINA y
DROPULIC, BORO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 778 651 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

Receptores de antígeno quimérico y métodos de uso

Campo de la divulgación

5 La presente solicitud se refiere al campo del cáncer, particularmente a receptores de antígeno quimérico (CARs) que contienen dominios transmembranarios de miembros de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral y métodos de uso.

Antecedentes

10 El cáncer es una de las amenazas más mortales para la salud humana. Solo en EE. UU., el cáncer afecta a casi 1,3 millones de pacientes nuevos cada año, y es la segunda causa de muerte después de la enfermedad cardiovascular, representando aproximadamente 1 de cada 4 muertes. Los tumores negros son responsables de la mayoría de las muertes. Aunque ha habido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos cánceres, la tasa de supervivencia global a los 5 años para todos los cánceres ha mejorado solo en aproximadamente 10 % en los últimos 20 años. Los cánceres, o tumores malignos, metastatizan y crecen rápidamente de una forma incontrolada, dificultando extremadamente el tratamiento.

15 Los receptores de antígeno quimérico (CARs) son moléculas híbridas que comprenden tres unidades esenciales: (1) un motivo de unión al antígeno extracelular, (2) motivos de enlace/transmembranarios, y (3) motivos de señalización de linfocitos T intracelulares (Long AH, Haso WM, Orentas RJ. Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. *Oncoimmunology*. 2013; 2 (4):e23621). El motivo de unión al antígeno de un CAR se fabrica comúnmente a semejanza de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), el dominio de unión mínimo de una molécula de inmunoglobulina (Ig). También se han manipulado motivos de unión al antígeno alternativos, tales como ligandos de receptor (es decir, se ha manipulado IL-13 para unirse al receptor de IL-13 expresado en tumor), receptores inmunitarios intactos, péptidos derivados de bibliotecas y moléculas efectoras innatas del sistema inmunitario (tales como NKG2D). También están en desarrollo dianas de células alternativas para la expresión de CAR (tales como linfocitos NK o T gamma-delta) (Brown CE et al *Clin Cancer Res*. 2012;18(8):2199-209; Lehner M et al. *PLoS One*. 2012; 7 (2):e31210). Sigue existiendo un trabajo significativo con respecto a definir la población de linfocitos T más activa para transducir con vectores de CAR, determinar el cultivo óptimo y las técnicas de expansión, y definir los detalles moleculares de la estructura de proteínas CAR en sí mismas.

20 Los motivos de enlace de un CAR pueden ser un dominio estructural relativamente estable, tal como el dominio constante de IgG, o se pueden diseñar para ser un conector flexible extendido. Los motivos estructurales, tales como los derivados de dominios constantes de IgG, se pueden usar para extender el dominio de unión de scFv lejos de la superficie de la membrana plasmática de linfocitos T. Esto puede ser importante para algunas dianas de tumor donde el dominio de unión está particularmente próximo a la membrana superficial de la célula tumoral (tal como para el disialogangliósido GD2; Orentas et al., observaciones no publicadas). Hasta la fecha, los motivos de señalización usados en CARs siempre incluyen la cadena CD3- ζ debido a que este motivo de núcleo es la señal clave para la activación de linfocitos T. Los primeros CARs de segunda generación informados caracterizaron dominios de señalización de CD28 y la secuencia transmembranaria de CD28. Este motivo se usó en los CARs de tercera generación que contenían los motivos de señalización de CD137 (4-1BB) también (Zhao Y et al., *J Immunol*. 2009; 183 (9): 5563-74). Con la llegada de la nueva tecnología, la activación de linfocitos T con perlas unidas a anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28, y la presencia de la "señal 2" canónica de CD28 ya no era requerida para ser codificada por el CAR en sí. Usando la activación de perlas, se encontró que los vectores de tercera generación no eran superiores a los vectores de segunda generación en ensayos *in vitro*, y no proporcionaban un claro beneficio con respecto a los vectores de segunda generación en modelos de ratón de leucemia (Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, FitzGerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Blood*. 2013; 121 (7):1165-74; Kochenderfer JN et al. *Blood*. 2012; 119 (12):2709-20). Esto es confirmado por el éxito clínico de los CARs específicos de CD19 que están en un CD28/CD3- ζ de segunda generación (Lee DW et al. American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, LA; December 7-10, 2013) y un formato de señalización de CD137/CD3- ζ (Porter DL et al. *N Engl J Med*. 2011; 365 (8): 725-33). Además de CD137, otros miembros de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral tales como OX40 también son capaces de proporcionar importantes señales de persistencia en linfocitos T transducidos por CAR (Yvon E et al. *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5852-60). Son igualmente importantes las condiciones de cultivo en las que se cultivaron las poblaciones de linfocitos T de CAR.

25 Los retos actuales en la adaptación más generalizada y eficaz de la terapia con CAR para el cáncer se refieren a una escasez de dianas convincentes. La creación de ligantes para los antígenos de superficie celular es ahora fácilmente logable, pero sigue siendo un reto formidable descubrir un antígeno de superficie celular que sea específico para el tumor mientras que se ahorran tejidos normales. Una posible forma de infundir la mayor especificidad de célula diana por linfocitos T que expresan CAR es usar enfoques combinatorios de CAR. En un sistema, las unidades señal de CD3- ζ y CD28 se dividen entre dos construcciones de CAR diferentes expresadas en la misma célula; en otro, dos CARs se expresan en el mismo linfocito T, pero uno tiene una afinidad más baja y así

requiere que el CAR alternativo sea acoplado primero para la actividad completa del segundo (Lanitis E et al. Cancer Immunol Res. 2013;1(1):43-53; Kloss CC et al. Nat Biotechnol. 2013;31(1):71-5). Un segundo reto para la generación de un único CAR basado en scFv como agente inmunoterapéutico es la heterogeneidad de células tumorales. Al menos un grupo ha desarrollado una estrategia de CAR para glioblastoma, por lo que la población de células efectoras dirige múltiples antígenos (HER2, IL-13Ra, EphA2) al mismo tiempo con la esperanza de evitar el resultado de las poblaciones negativas para antígenos diana (Hegde M et al. Mol Ther. 2013;21(11):2087-101).

La inmunoterapia basada en linfocitos T se ha convertido en una nueva frontera en la biología sintética; se idean múltiples promotores y productos génicos para conducir estas células altamente potentes al microentorno del tumor, donde los linfocitos T pueden tanto evadir las señales reguladoras negativas como mediar en la eficaz destrucción tumoral. La eliminación de linfocitos T no deseados a través de la dimerización inducida por el fármaco de construcciones de caspasa 9 inducibles con AP1903 demuestra una forma en la que se puede iniciar farmacológicamente un cambio poderoso que pueda controlar las poblaciones de linfocitos T (Di Stasi A et al. N Engl J Med. 2011;365(18):1673-83). La creación de poblaciones de linfocitos T efectores que son inmunes a los efectos reguladores negativos del factor de crecimiento transformante- β por la expresión de un receptor señuelo adicional demuestra el grado al que los linfocitos T efectores se pueden manipular para actividad antitumoral óptima (Foster AE et al. J Immunother. 2008;31(5):500-5).

Así, mientras que parece que los CARs pueden desencadenar la activación de linfocitos T de un modo similar a un receptor endógeno de linfocitos T, un impedimento importante a la aplicación clínica de esta tecnología hasta la fecha ha sido la expansión limitada *in vivo* de linfocitos T con CAR+, la rápida desaparición de las células después de la infusión, y la decepcionante actividad clínica. Por consiguiente, existe una necesidad urgente y que se sentía desde hace tiempo en la técnica de descubrir composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer usando CARs que pueden presentar atributos terapéuticos deseados sin los inconvenientes mencionados anteriormente.

El documento de patente US 2015/0283178 A1 describe composiciones para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a la expresión de CD19, por ejemplo, administrando un linfocito T recombinante que comprende el CAR de CD19.

La presente invención trata estas necesidades, proporcionando composiciones de CAR y métodos terapéuticos que se pueden usar para tratar cánceres y otras enfermedades y/o afecciones. En particular, la presente invención como se desvela y describe en el presente documento proporciona CARs que presentan una alta expresión superficial sobre linfocitos T transducidos, presentan un alto grado de citólisis y expansión de linfocitos T transducidos y persistencia *in vivo*.

Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

Se proporcionan en el presente documento novedosos receptores de antígeno quimérico (CARs) que contienen dominios transmembranarios de miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF), así como células hospedadoras (por ejemplo, linfocitos T) que expresan los receptores, y moléculas de ácidos nucleicos que codifican los receptores. Los CARs presentan una alta expresión superficial sobre linfocitos T transducidos, con un alto grado de citólisis y expansión de linfocitos T transducidos y persistencia *in vivo*. También se proporcionan métodos de uso de los CARs desvelados, células hospedadoras y moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, para tratar un cáncer en un sujeto.

Se entenderá que los CARs, células hospedadoras, ácidos nucleicos y métodos son útiles más allá de los aspectos específicos y realizaciones que se describen con detalle en el presente documento. Las anteriores características y ventajas de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que continúa con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La **FIGURA 1** representa un esquema de un receptor de antígeno quimérico (CAR). El CAR contiene un dominio de unión al antígeno, un dominio de enlace, un dominio transmembranario y un dominio de señalización intracelular.

La **FIGURA 2** representa ciertos motivos de aminoácidos transmembranarios en TNFRSF16 y TNFRSF19. También se muestran las secuencias de aminoácidos transmembranarios de CD8, CD4, TNFRSF16 y TNFRSF19. Están subrayadas nueve características distintas en el encabezado de la Figura 2. Cada uno es un aminoácido codificado por el genoma humano en el contexto de una proteína de la membrana plasmática transmembranaria. Las abreviaturas de aminoácidos usadas en el presente documento son según la Comisión Conjunta IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (JCBN).

La **FIGURA 3** representa varios receptores de antígeno quimérico (CARs). El esquema general para los CARs incluye, de extremo N a extremo C, un péptido señal, scFv anti-CD 19 /FMC63, conector extracelular,

transmembrana, 4-1BB, CD3 zeta en donde el texto en negrita representa los sitios de clonación para enlazar dominios. La **FIGURA 3A** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señalización tm de CD8 (LTG1494). La **FIGURA 3B** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD8 (LTI re-manipulado) (LTG1538).
 5 La **FIGURA 3C** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD4 (LTG1562). La **FIGURA 3D** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de TNFRSF19 (LTG1563). La **FIGURA 3E** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene SP-ligante de CD 19-enlace de TNFRSF 19-señales tm de TNFRSF 19 (LTG1564).

10 La **FIGURA 4** representa un esquema de la estructura de dominio general de CARs con novedosas secuencias transmembranarias. Se representa una serie de CARs únicos que utilizan un anticuerpo anti-CD19 FMC63 (dominio de unión A). Los dominios de unión se enlazaron a conectores de CD8 y dominios transmembranarios de CD8, formato de CAR (A), dominios transmembranarios de CD4 (B), TNFRSF 19 (C), o a un conector y dominio transmembranario de TNFRSF 19 (D).

15 La **FIGURA 5** representa la actividad antitumoral de CARs que contienen el motivo de unión anti-CD19 derivado de FMC63, el motivo de señalización de 4-1BB/cadena zeta de CD3 y los dominios transmembranarios de TNFRSF. Los linfocitos T expandidos no traducidos (simulación, diamante blanco) o linfocitos T transducidos con un LV que expresa una proteína de control (LNGFR, LTG, triángulo blanco) sirvieron de controles. El CAR-T que caracteriza un conector derivado de CD8 y dominio transmembranario de CD8 (LTG 1494, círculos negros) mostró fuerte actividad lítica en las relaciones entre efectoras y diana (E:D)
 20 enumeradas en el eje x. El CAR-T que expresa el conector de CD8 y la transmembrana de CD4 (LTG1562, cuadrado blanco) o el conector y los dominios transmembranarios de TNFRSF19 también mostraron ambos actividad lítica apreciable (LTG1564, estrella). El CAR-T expresó el conector de CD8 y las regiones transmembranarias de TNFRSF19 probadas (LTG1563, círculo blanco) presentaron actividad lítica muy fuerte.

25 La **FIGURA 6** representa un diagrama de novedosas construcciones de CAR19 de conector y dominio transmembranario. Se diseñaron seis construcciones de CAR19 denominadas 1562, 1563, 1564 y 1712, 1713 y 1714, que incorporan novedosos elementos de conector y dominio transmembranario, para determinar si la alteración de la composición de conector y dominio transmembranario de CAR-T altera la función de CAR-T. La construcción 1494 indica una configuración de CAR19 que comprende el dominio de unión de scFv FMC63, conector de CD8, dominio transmembranario de CD8, CD137/4-1BB y dominios de señalización de CD3 zeta, y sirve de control positivo. "transM" se refiere al dominio transmembranario. "TruncT19" se refiere a un conector de TNFRSF19 truncado en comparación con la versión extendida presente en la construcción 1564.
 30

35 La **FIGURA 7** representa la expresión superficial de CAR19 en linfocitos T humanos como se ha determinado por A) Proteína L o B) tinción de Fc de CD19. Se expresaron establemente seis novedosas construcciones de CAR19 y la construcción 1494 en linfocitos T primarios humanos por transducción de LV. Se determinó el porcentaje de CAR sobre la superficie de linfocitos T por citometría de flujo usando o tinción con proteína L conjugada con biotina, seguido por incubación con estreptavidina-PE (columna izquierda), o tinción con péptido de Fc de CD19, seguido por reactivo anti-Fc de F(ab)2 conjugado con AF647 (detectado en el canal APC). N.T., linfocitos T no transducidos, se usaron como control negativo.

40 La **FIGURA 8** representa novedosos CAR19s transmembranarios que demuestran actividad de destrucción de células de leucemia *in vitro*. Se evaluó la actividad de destrucción *in vitro* de linfocitos T con CAR por co-cultivo de linfocitos T con CAR con líneas de células tumorales CD19-positivo (Raji) y CD19-negativo (293T, K562) que expresan establemente luciferasa de luciérnaga en las relaciones E:D indicadas (eje x). Después de la incubación durante la noche, las células se lisaron y se cuantificó la luminiscencia de tumores vivos de células
 45 supervivientes. Las barras representan media + DE.

La **FIGURA 9** representa novedosas construcciones de CAR19 transmembranarias que demuestran la respuesta de citocinas específicas de tumor *in vitro*. Se realizó el análisis de secreción de citocinas en sobrenadantes de CAR-T expuestos durante la noche a células tumorales Raji en la relación E:D 10:1. Se midieron las citocinas en sobrenadantes por la matriz MACSPlex (Miltenyi Biotec). Las barras representan el promedio de dos duplicados + DE. Se llevó a cabo el análisis estadístico en el software GraphPad Prism. Se compararon las medias de muestras por ANOVA unilateral con la prueba a posteriori de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.
 50

La **FIGURA 10** representa la novedosa construcción de CAR transmembranario 1563 que es eficiente en eliminar los tumores de linfoma de Burkitt diseminados establecidos en ratones NSG. A. Se inocularon ratones NSG con medio millón de células Raji que expresaban establemente luciferasa de luciérnaga en el día 0, y se verificó el injerto tumoral en el día 6. Entonces, los ratones se distribuyeron en grupos basándose en la bioluminiscencia y se administraron con 10 millones de linfocitos T con CAR por la vena de la cola en el día 7. Se evaluó la carga tumoral por bioluminiscencia hasta el día 32. La construcción 1563 fue más eficiente que 1494 en la eliminación de tumores de Raji en este modelo.
 55

Las **FIGURAS 11A y 11B** representan un estudio *in vivo* repetido con linfocitos T con CAR generados a partir de un donante de linfocitos T diferente. El estudio se realizó como en la Figura 10 anterior. FIGURA 11A. Se inocularon ratones NSG con medio millón de células Raji que expresaban establemente luciferasa de luciérnaga en el día 0, y se verificó el injerto tumoral en el día 6. Entonces, los ratones se distribuyeron en grupos basándose en la bioluminiscencia y se administraron con 10 millones de linfocitos T con CAR por la vena de la cola en el día 7. Se evaluó la carga tumoral por bioluminiscencia hasta el día 32. La construcción 1563 fue más eficiente que 1494 en la eliminación de tumores de Raji en este modelo. FIGURA 11B. Gráfico de Kaplan Meier que muestra el análisis de supervivencia de ratones tratados con linfocitos T con CAR. Se realizó el análisis estadístico usando GraphPad Prism. El grupo superviviente es significativamente diferente del no superviviente por la prueba del orden logarítmico (Mantel - Cox), * $p < 0,05$. Mediana de la supervivencia: GFP-19 días, Sin tratamiento (N.T.) - 20 días, 1494-24 días.

Descripción detallada

Definiciones

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" se refieren a tanto el singular así como el plural, a menos que el contexto indique claramente de otro modo. Por ejemplo, el término "un antígeno" incluye un único antígeno o múltiples antígenos y se puede considerar equivalente a la expresión "al menos un antígeno". Como se usa en el presente documento, el término "comprende" significa "incluye". Así, "que comprende un antígeno" significa "que incluye un antígeno" sin excluir otros elementos. La expresión "y/o" significa "y" u "o". Se debe entender además que todos y cada uno de los tamaños de base o tamaños de aminoácido, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos, son aproximados, y se proporcionan para fines descriptivos, a menos que se indique lo contrario. Aunque se pueden usar muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados particulares. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye explicaciones de términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes. Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos:

El término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende englobar variaciones de $\pm 0,20\%$ o en algunos casos $\pm 0,10\%$, o en algunos casos $\pm 0,5\%$, o en algunos casos $\pm 0,1\%$, o en algunos casos $\pm 0,01\%$ del valor especificado, y que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos desvelados.

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos en el presente documento se usan según el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en la biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 1999; Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994; y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995; y otras referencias similares.

La presente divulgación proporciona receptores de antígeno quimérico (CARs) que tienen dominios transmembranarios de miembros de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFRSF) y/o un dominio de enlace modificado para enlazar el dominio transmembranario con el dominio de unión al antígeno extracelular. La potenciación de la actividad funcional del CAR se refiere directamente a la potenciación de la actividad funcional del linfocito T que expresa CAR. Como resultado de una o más de estas modificaciones, los CARs presentan tanto un alto grado de citólisis inducida por citocina como expresión de la superficie celular en linfocitos T transducidos, junto con un elevado nivel de expansión de linfocitos T *in vivo* del linfocito T que expresa CAR transducido.

La única capacidad para combinar restos funcionales derivados de diferentes dominios de proteína ha sido una característica innovadora clave de receptores de antígeno quimérico (CARs). La elección de cada uno de estos dominios de proteína es una característica de diseño clave, ya que es la forma en la que se combinan específicamente. Cada dominio de diseño es un componente esencial que se puede usar a través de diferentes plataformas de CAR para manipular la función de los linfocitos. Por ejemplo, la elección del dominio de unión extracelular puede hacer que un CAR por lo demás ineficaz sea eficaz.

Los componentes de la región estructural invariable de las secuencias de proteínas derivadas de inmunoglobulina usados para crear el dominio de unión al antígeno extracelular de un CAR pueden o ser completamente neutros, o se pueden auto-asociar y conducir el linfocito T a un estado de agotamiento metabólico, que hace así que el linfocito T terapéutico que expresa ese CAR sea mucho menos eficaz. Esto ocurre independientemente de la función de unión al antígeno de este dominio de CAR. Además, la elección del (de los) dominio(s) de señalización intracelular también puede gobernar la actividad y la durabilidad de la población de linfocitos terapéuticos usados para inmunoterapia. Esto indica que los componentes estructurales y de secuencia de los dominios de proteína usados para crear CARs, que se cree que son biológicamente inertes, pueden tener efectos funcionales completamente inesperados y así afectar el potencial terapéutico de un CAR.

Aunque la capacidad de unir antígeno-diana y la capacidad de transmitir una señal de activación al linfocito T mediante estos dominios extracelulares e intracelulares, respectivamente, son aspectos importantes del diseño de CAR, lo que también ha llegado a ser evidente es que otros dominios estructurales en la composición de un CAR también tienen una función definitoria para la función y utilidad clínica del CAR.

5 Sorprendente e inesperadamente, se ha descubierto ahora por los inventores que el dominio transmembranario en sí mismo, y la forma en la que se enlaza con el dominio de unión al antígeno extracelular y/o dominio de señalización intracelular de un CAR, también determinan la actividad funcional de un linfocito T que expresa CAR. Los CARs desvelados en el presente documento se expresan a un alto nivel en una célula. Una célula que expresa el CAR tiene una alta tasa de proliferación *in vivo*, produce grandes cantidades de citocinas, y tiene una alta actividad
10 citotóxica contra una célula que tiene, sobre su superficie, un antígeno al que se une un CAR.

Lo que sigue es una descripción detallada de los CARs inventivos que incluyen una descripción de su dominio extracelular, el dominio transmembranario y el dominio intracelular, junto con la descripción adicional de CARs, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, conjugados, nucleótidos, expresión, vectores y células
15 hospedadoras, composiciones para su uso en métodos de tratamiento, composiciones y kits que emplean los CARs desvelados.

A. Receptores de antígeno quimérico (CARs)

Los CARs desvelados en el presente documento comprenden al menos un dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno, al menos un dominio transmembranario de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral, y al menos un dominio intracelular.

20 Un receptor de antígeno quimérico (CAR) es una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene los dominios de unión al antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, fragmento de la cadena variable sencilla (scFv)) enlazados con dominios de señalización de linfocitos T por el novedoso dominio transmembranario de miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF). Las características de los CARs incluyen su capacidad para redirigir la especificidad por linfocito T y reactividad hacia una diana seleccionada en un modo no restringido por MHC, y explotar las propiedades de unión al antígeno de anticuerpos monoclonales. El
25 reconocimiento del antígeno no restringido por MHC da a los linfocitos T que expresan CARs la capacidad de reconocer antígeno independiente del procesamiento de antígenos, derivando así un mayor mecanismo de escape tumoral. Además, cuando se expresa en linfocitos T, los CARs no dimerizan ventajosamente con cadenas alfa y beta de receptor de linfocitos T (TCR) endógeno.

30 Como se desvela en el presente documento, los dominios de señalización intracelulares de linfocitos T de los CARs pueden incluir, por ejemplo, un dominio de señalización de receptores de linfocitos T, un dominio de señalización coestimulante de linfocitos T, o ambos. El dominio de señalización de receptores de linfocitos T se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de un receptor de linfocitos T, tal como, por ejemplo, y no a modo de limitación, la porción intracelular de la proteína CD3 zeta. El dominio de señalización coestimulante se
35 refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimulante, que es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficiente de linfocitos al antígeno.

1. Dominio extracelular

40 En una realización, el CAR comprende un elemento específico de unión a diana denominado de otro modo un dominio o resto de unión al antígeno. La elección del dominio depende del tipo y número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno se puede elegir para reconocer un ligando que actúa como marcador de la superficie celular sobre células diana asociadas a un estado de enfermedad particular. Así, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar de ligandos para el dominio de
45 unión al antígeno en el CAR incluyen los asociados a infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.

En una realización, el CAR se puede manipular para dirigir un antígeno de tumor de interés por medio de la manipulación de un dominio de unión al antígeno deseado que se une específicamente a un antígeno sobre una célula tumoral. Los antígenos de tumor son proteínas que se producen por células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria, particularmente respuestas inmunitarias de linfocitos T. La selección del dominio de unión al
50 antígeno dependerá del tipo particular de cáncer que se va a tratar. Se conocen bien en la técnica los antígenos de tumor e incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), .beta.-gonadotropina coriónica humana, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva con lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, telomerasa transcriptasa inversa humana, RU1, RU2 (AS), carboxilesterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno prostático específico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteína, PSMA, Her2/neu, survivina y telomerasa, antígeno 1 de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de
55 neutrófilos, efrina B2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina. Los antígenos de tumor en el presente documento se desvelan simplemente incluidos a modo de ejemplo. La lista no pretende ser excluyente y ejemplos adicionales serán rápidamente evidentes para los expertos en la técnica.

En una realización, el antígeno de tumor comprende uno o más epítopes antigénicos de cáncer asociados a un tumor maligno. Los tumores malignos expresan varias proteínas que pueden servir de antígenos diana para un ataque inmunitario. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos de tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno específico de próstata (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de las moléculas relacionadas con la transformación tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo más de antígenos diana son los antígenos oncofetales tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de linfocitos B, la inmunoglobulina de idi tipo específico de tumor constituye verdaderamente un antígeno de inmunoglobulina específico de tumor que es único para el tumor individual. Los antígenos de diferenciación de linfocitos B tales como CD19, CD20 y CD37 son otros candidatos para antígenos diana en el linfoma de linfocitos B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idi tipo) se han usado como dianas para la inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

El tipo de antígeno de tumor también puede ser un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Un TSA es único para las células tumorales y no ocurre en otras células en el cuerpo. Un TAA no es único para una célula tumoral y en su lugar también se expresa en una célula normal en condiciones que dejan de inducir un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno sobre el tumor puede ocurrir en condiciones que permiten que el sistema inmunitario responda al antígeno. Los TAAs pueden ser antígenos que se expresan en células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmunitario es inmaduro e incapaz de responder o pueden ser antígenos que normalmente están presentes en niveles extremadamente bajos en células normales pero que se expresan a niveles mucho más altos en células tumorales.

Los ejemplos no limitantes de TSAs o TAAs incluyen los siguientes: Antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos multi-linaje específicos de tumor tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios expresados en exceso tales como CEA; oncogenes expresados en exceso y genes supresores de tumores mutados tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos de tumor únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MIL-RAR; y antígenos virales, tales como los antígenos del virus de Epstein Barr EBVA y los antígenos del virus del papiloma humano (VPH) E6 y E7. Otros antígenos grandes basados en proteína incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, beta-catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27,29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\p1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

En una realización preferida, la porción de dominio de unión al antígeno del CAR dirige un antígeno que incluye, pero no se limita a, CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33, c-Met, PSMA, glucolípido F77, EGFRVIII, GD-2, MY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y similares.

Dependiendo del antígeno deseado para ser elegido como diana, el CAR se puede manipular para incluir el dominio de unión al antígeno apropiado que es específico para el antígeno diana deseado. Por ejemplo, si CD19 es el antígeno deseado que se va a elegir como diana, se puede usar un anticuerpo para CD19 como la incorporación del dominio de unión al antígeno en el CAR.

En una realización a modo de ejemplo, la porción del dominio de unión al antígeno del CAR se dirige a CD19. Preferentemente, el dominio de unión al antígeno en el CAR es scFV anti-CD19, en donde la secuencia de ácidos nucleicos del scFV anti-CD19 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27 En una realización, el scFV anti-CD19 comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. En otra realización, la porción de scFV anti-CD19 del CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 28.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un CAR capaz de unirse a un no TSA o no TAA que incluye, por ejemplo y no a modo de limitación, un antígeno derivado de Retroviridae (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana tal como VIH-1 y VIH-LP), Picornaviridae (por ejemplo, virus de la poliomielitis, virus de la hepatitis A, enterovirus, coxsackievirus humano, rinovirus y ecovirus), virus de la rubeola, coronavirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus del ébola, virus paragripal, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, virus de la hepatitis B, parvovirus, Adenoviridae, Herpesviridae [por ejemplo, virus del herpes simple (VHS) de tipo 1 y tipo 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV) y virus del herpes], Poxviridae (por ejemplo, virus de la viruela, virus de la variolovacuna y poxvirus), o virus de la hepatitis C, o cualquier combinación de los mismos.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un CAR capaz de unirse a un antígeno derivado de una cepa bacteriana de *Staphylococci*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* o *Salmonella*. Particularmente, se proporciona un CAR capaz de unirse a un antígeno derivado de una bacteria infecciosa, por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, una cepa bacteriana de *Mycobacteria sps.* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, o *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*,

Listeria monocytogenes, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* de grupo A, *Streptococcus* de grupo B (*Streptococcus agalactiae*), *Streptococcus pneumoniae*, o *Clostridium tetani*, o una combinación de los mismos.

2. Dominio transmembranario

5 Con respecto al dominio transmembranario, el CAR comprende uno o más dominios transmembranarios de TNFRSF fusionados con el dominio extracelular del CAR.

10 En una realización, el dominio transmembranario de TNFRSF comprende al menos un dominio transmembranario de TNFRSF 16, al menos un dominio transmembranario de TNFRSF 19, o una combinación de los mismos. En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en donde el dominio transmembranario de TNFRSF codificado comprende un dominio transmembranario de TNFRSF 16, un dominio transmembranario de TNFRSF 19, o una combinación de los mismos.

15 En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el dominio transmembranario de TNFRSF 16 comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, o una secuencia con 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la misma. En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en donde el dominio transmembranario de TNFRSF 16 codificado comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos con 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

20 En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el dominio transmembranario de TNFRSF 19 comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, o una secuencia con 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la misma. En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en donde el dominio transmembranario de TNFRSF 19 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos con 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

25 Como se muestra en el Ejemplo 1 en el presente documento, ciertos motivos importantes de aminoácidos transmembranarios en TNFRSF 16 y TNFRSF 19 se representan en la Figura 2 que muestra las secuencias de aminoácidos transmembranarios de CD8, CD4, TNFRSF16 y TNFRSF19. Se resaltan nueve características distintas en el encabezado. Cada uno es un aminoácido codificado por el genoma humano en el contexto de una proteína transmembranaria de la membrana plasmática. Las abreviaturas de aminoácido usadas en el presente documento son según la Comisión Conjunta IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (JCBN). Las características se expresan en dos agrupaciones. En la característica 1, 2 y 3, el aminoácido está compuesto por I, A o L dentro de los primeros 10 restos transmembranarios. La característica 2 es adyacente o un aminoácido retirado de la característica 1 y es o una A o una I. La característica tres es o una L o una V y está separada un aminoácido de distancia de la característica 2. El segundo grupo de características empieza al menos en 5, pero no más de 10 aminoácidos de la característica 3. La característica 4, 5 y 6 son una cadena consecutiva de 3 aminoácidos compuesta por L o V. La característica 7 está alejada un aminoácido de la característica 6 y se compone únicamente de L. La característica 8 es adyacente a la característica 7 y está compuesta por una V o L. Esta característica falta en CD4. La característica 9 es adyacente a la característica 8 y está compuesta por una I o una A. La significancia de estas características es que forman una estructura secundaria única dentro de la membrana plasmática de la célula, que permite la transducción óptima de señales y la posterior activación de linfocitos T por el receptor de antígeno quimérico (CAR).

40 En las diversas realizaciones de los CARs desvelados en el presente documento, el esquema general se expone en la Figura 3 e incluye, de extremo N a extremo C, un péptido señal o líder, scFv anti-CD19/FMC63, conector extracelular, transmembrana, 4-1BB, CD3 zeta, en donde el texto en negrita representa los sitios de clonación para los dominios de enlace.

45 En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 29, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 30 [SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señalización tm de CD8 (LTG1494) (como se representa en la Figura 3A)].

50 En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 31, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 32 [SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD8 (LTI re-manipulado) (LTG1538) (como se representa en la Figura 3B)].

55 En otra realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 21, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 22 [SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD4 (LTG1562) (como se representa en la Figura 3C)]. En otra realización, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 39, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 22 [SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD4 (LTG1562) (como se representa en la Figura 3C)].

En otra realización más, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 8 [SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de TNFRSF19 (LTG1563) (como se representa en la Figura 3D)]. En otra realización más, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 40, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 8 [SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de TNFRSF19 (LTG1563) (como se representa en la Figura 3D)].

En otra realización más, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 9, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 10 [SP- SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF19-señales tm de TNFRSF19 LTG1564 (LTG1564) (como se representa en la Figura 3E)]. En otra realización más, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 41, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 10 [SP-SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF19-señales tm de TNFRSF19 LTG1564 (LTG1564) (como se representa en la Figura 3E)].

Como se muestra en el Ejemplo 2 y la Figura 5, respectivamente, se demostró la alta actividad citolítica inesperada de los CARs que contienen TNFRSF cuando se crearon vectores lentivirales (LV) que expresan los siguientes CARs y se probaron para actividad antileucémica. Cada CAR experimental contiene el motivo de señalización de 4-1BB/cadena zeta de CD3 y el motivo de unión a anti-CD19 derivado de FMC63. Se usó la línea de células Raji de leucemia como diana en los ensayos de citólisis. El CAR-T que caracteriza un conector derivado de CD8 y dominio transmembranario de CD8 (véase la Figura 5, LTG1494, círculos negros) mostró una fuerte actividad lítica en las relaciones entre efectoras y diana (E:D) enumeradas en el eje x. El CAR-T que expresa el conector de CD8 y la transmembrana de CD4 (véase la Figura 5, LTG1562, cuadrado blanco) o conector y dominios transmembranarios de TNFRSF19 también mostraron ambos una actividad lítica apreciable (véase la Figura 5, LTG1564, estrella). Sorprendentemente, se encontró que se observó actividad lítica muy fuerte cuando se probaron el CAR-T que contiene un conector de CD8 expresado y las regiones de transmembrana de TNFRSF19 (véase la Figura 5, LTG1563, círculo blanco).

Se espera que debido a la alta conservación de aminoácidos entre las regiones transmembranarias de TNFRSF16 y TNFRSF19 en la región conservada representada en la Figura 2, abajo, un conector de CD8 expresado que contiene CAR-T y regiones transmembranarias de TNFRSF16 también presentaría actividad citolítica muy fuerte cuando se prueba el conector de CD8 expresado por CAR-T y las regiones transmembranarias de TNFRSF16.

La expresión superficial de los CARs que contienen dominio transmembranario de TNFRSF se muestra en el Ejemplo 2 y se resume en la Tabla 2. Se determinó el nivel de expresión para cada dominio de CAR por análisis de citometría de flujo de linfocitos T transducidos con LV usando proteína L biotinilada y ficoeritrina (PE) conjugada con estreptavidina. El CAR que contiene el dominio transmembranario de TNFRSF 19 (LTG1564) presentó alta expresión superficial en comparación con un CAR LNGFR-mCherry (LTG1541) que expresa una proteína de control (LNGFR-mCherry) y no tiene expresión superficial o actividad citolítica (véanse, Ejemplo 1, Figura 5 y Tabla 2).

También se espera que debido a la alta conservación de aminoácidos entre las regiones de dominio transmembranario de TNFRSF16 y TNFRSF19 en la región conservada representada en la Figura 2 abajo, un conector de CD8 expresado que contiene CAR-T y regiones transmembranarias de TNFRSF16 también presentaría alta expresión superficial cuando el conector de CD8 expresado por CAR-T y las regiones transmembranarias de TNFRSF16 se prueban en comparación con el control de CAR LNGFR-mCherry (LTG 1541).

Sin pretender limitar a ningún mecanismo de acción particular, se cree que los posibles motivos para la potenciada función terapéutica asociada a los CARs a modo de ejemplo de la invención incluyen, por ejemplo, y no a modo de limitación, a) movimiento lateral mejorado dentro de la membrana plasmática que permite la transducción de señales más eficiente, b) localización superior dentro de los microdominios de la membrana plasmática, tales como balsas lipídicas, y mayor capacidad para interactuar con las cascadas de señalización transmembranaria asociadas a la activación de linfocitos T, c) localización superior dentro de la membrana plasmática por movimiento preferencial fuera de interacciones amortiguadoras o moduladoras por disminución, tales como menos proximidad a o interacción con fosfatasa tales como CD45, y d) ensamblaje superior en los complejos de señalización de receptores de linfocitos T (es decir, las sinapsis inmunitarias), o cualquier combinación de los mismos.

Aunque la divulgación se ha ilustrado con TNFRSF 16 y TNFRSF19 como dominios transmembranarios a modo de ejemplo, se pueden usar otros miembros dentro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral para derivar los dominios transmembranarios de TNFRSF y/o dominios de conector o espaciador para su uso en los CARs descritos en el presente documento. La Tabla 1 a continuación representa los miembros dentro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral.

ES 2 778 651 T3

Tabla 1. Superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF)

Símbolo autorizado	Nombre autorizado	Símbolos previos	Sinónimos	Cromosoma
<u>EDAR</u>	receptor de ectodisplasia A	ED3, DL	ED5, EDA3, Edar, ED1R, EDA1R	2q13
<u>TNFRSF1A</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 1A	TNFR1	TNF-R, TNFAR, TNFR60, TNF-R-I, CD120a, TNF-R55	12p13.2
<u>TNFRSF1B</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 1B	TNFR2	TNFBR, TNFR80, TNF-R75, TNF-R-II, p75, CD120b	1p36.22
<u>LTBR</u>	receptor de linfotoxina beta (superfamilia de TNFR, miembro 3)	D12S370	TNF-R-III, TNFCR, TNFRSF3, TNFR2-RP, TNFR-RP	12p13
<u>TNFRSF4</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 4	TXGP1L	ACT35, OX40, CD134	1p36
<u>CD40</u>	molécula CD40, miembro 5 de la superfamilia de receptores de TNF	TNFRSF5	p50, Bp50	20q12-q13.2
<u>FAS</u>	receptor de muerte de la superficie celular Fas	APT1, FAS1, TNFRSF 6	CD95, APO-1	10q24.1
<u>TNFRSF6B</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 6b, señuelo		DcR3, DCR3, TR6, M68	20q13.33
<u>CD27</u>	molécula CD27	TNFRSF7	S152, Tp55	12p13
<u>TNFRSF8</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 8	CD30, D1S166E	KI-1	1p36
<u>TNFRSF9</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 9	ILA	CD137, 4-1BB	1p36
<u>TNFRSF10A</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10a		DR4, Apo2, TRAILR-1, CD261	8p21
<u>TNFRSF10B</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10b		DR5, KILLER, TRICK2A, TRAILR2, TRICKB, CD262	8p22-p21
<u>TNFRSF10C</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10c, señuelo sin un dominio intracelular		DcR1, TRAILR3, LIT, TRID, CD263	8p22-p21
<u>TNFRSF10D</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 10d, señuelo con dominio de muerte truncado		DcR2, TRUNDD, TRAILR4, CD264	8p21
<u>TNFRSF11A</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 11a, activador de NFKB	PDB2, LOH18CR1	RANK, CD265, FEO	18q22.1
<u>TNFRSF11B</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 11b	OPG	OCIF, TR1	8q24
<u>TNFRSF12A</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 12A		FN14, TweakR, CD266	16p13.3
<u>TNFRSF13B</u>	superfamilia de receptores del factor		TACI, CD267, IGAD2	17p11.2

Símbolo autorizado	Nombre autorizado	Símbolos previos	Sinónimos	Cromosoma
	de necrosis tumoral, miembro 13B			
<u>TNFRSF13C</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 13C		BAFFR, CD268	22q13.1-q13.3
<u>TNFRSF14</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 14		HVEM, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA, CD270	1p36.32
<u>NGFR</u>	receptor del factor de crecimiento nervioso		TNFRSF16, p75NTR, CD271	17q21-q22
<u>TNFRSF17</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 17	BCMA	BCM, CD269, TNFRSF13A	16p13.1
<u>TNFRSF18</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 18		AITR, GITR, CD357	1p36.3
<u>TNFRSF19</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 19		TAJ-alfa, TROY, TAJ, TRADE	13q12.11-q12.3
<u>RELT</u>	RELT receptor del factor de necrosis tumoral	TNFRSF19L	FLJ14993	11q13.2
<u>TNFRSF21</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 21		DR6, CD358	6p21.1
<u>TNFRSF25</u>	superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 25	TNFRSF 12	DR3, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3	1p36.2
<u>EDA2R</u>	receptor de ectodisplasina A2		XEDAR, EDAA2R, EDA-A2R, TNFRSF27	Xq11.1
<u>EDAR</u>	receptor de ectodisplasina A	ED3, DL	ED5, EDA3, Edar, ED1R, EDA1R	2q13

Los datos representados en la Tabla 1, arriba, se usaron con permiso de la base de datos HGNC, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), EMBL Outstation - Hinxton, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK www.genenames.org. [Gray KA, Yates B, Seal RL, Wright MW, Bruford EA. *genenames.org: the HGNC resources in 2015*. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan; 43 (edición de la base de datos): D1079-85. doi: 10.1093/nar/gku071. PMID: 25361968].

En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en donde el dominio de conector codificado deriva del dominio extracelular de CD8, y se enlaza al dominio transmembranario de TNFRSF16, el dominio transmembranario TNFRSF19, o una combinación de los mismos.

- 10 En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en donde el dominio de conector codificado deriva del dominio extracelular de TNFRSF 16 o TNFRSF 19, y se enlaza al dominio transmembranario de TNFRSF 16, el dominio transmembranario de TNFRSF 19, o una combinación de los mismos.

En una realización, el dominio transmembranario que está asociado naturalmente con uno de los dominios en el CAR se usa además de los novedosos dominios transmembranarios de TNFRSF descritos arriba.

- 15 En algunos casos, el dominio transmembranario se puede seleccionar o por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembranarios de las mismas proteínas de la membrana superficial o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo de receptor.

- 20 El dominio transmembranario se puede obtener o de una fuente natural o de una sintética. Donde la fuente es natural, el dominio se puede obtener de cualquier proteína unida a membrana o transmembranaria. Las regiones transmembranarias de uso particular en la presente invención se pueden obtener de (es decir, comprenden al menos la(s) región(s) transmembranaria(s) de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Alternativamente, el dominio transmembranario puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá restos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. Preferentemente se encontrará un triplete de

fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembranario sintético. Opcionalmente, un conector oligo- o polipeptídico corto, preferentemente entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembranario y el dominio de señalización citoplásmico del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un conector particularmente adecuado.

5 En una realización, el dominio transmembranario en el CAR de la invención es el dominio transmembranario de CD8. En una realización, el dominio transmembranario de CD8 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 11. En una realización, el dominio transmembranario de CD8 comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otra realización, el dominio transmembranario de CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

10 En algunos casos, el dominio transmembranario del CAR comprende CD8.alfa.dominio bisagra. En una realización, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 13. En una realización, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otra realización, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

15 3. Dominio espaciador

En el CAR, se puede disponer un dominio espaciador entre el dominio extracelular y el dominio transmembranario de TNFRSF, o entre el dominio intracelular y el dominio transmembranario de TNFRSF. El dominio espaciador significa cualquier oligopéptido o polipéptido que sirve para enlazar el dominio transmembranario de TNFRSF con el dominio extracelular y/o el dominio transmembranario de TNFRSF con el dominio intracelular. El dominio espaciador comprende hasta 300 aminoácidos, preferentemente 10 a 100 aminoácidos, y lo más preferentemente 25 a 50 aminoácidos.

En varias realizaciones, el conector puede incluir un elemento espaciador, que, cuando está presente, aumenta el tamaño del conector de forma que aumenta la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. El experto en la técnica conoce los espaciadores a modo de ejemplo, e incluyen los enumerados en las patentes de EE. UU. Nº 7.964.5667, 498.298, 6.884.869, 6.323.315, 6.239.104, 6.034.065, 5.780.588, 5.665.860, 5.663.149, 5.635.483, 5.599.902, 5.554.725, 5.530.097, 5.521.284, 5.504.191, 5.410.024, 5.138.036, 5.076.973, 4.986.988, 4.978.744, 4.879.278, 4.816.444 y 4.486.414, así como las publicaciones de patente de EE. UU. Nº 20110212088 y 20110070248.

El dominio espaciador tiene preferentemente una secuencia que promueve la unión de un CAR con un antígeno y potencia la señalización en una célula. Los ejemplos de un aminoácido que se espera que promueva la unión incluyen cisteína, un aminoácido cargado, y serina y treonina en un posible sitio de glucosilación, y estos aminoácidos se pueden usar como un aminoácido que constituye el dominio espaciador.

Como dominio espaciador, se puede usar todo o una parte de los números de aminoácidos 118 a 178 (SEQ ID NO: 15) que es una región bisagra de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3), números de aminoácidos 135 a 195 de CD8.beta. (GenBank: AAA35664.1), números de aminoácidos 315 a 396 de CD4 (NCBI RefSeq: NP.sub.--000607.1), o números de aminoácidos 137 a 152 de CD28 (NCBI RefSeq: NP.sub.--006130.1). Por tanto, como dominio espaciador, se puede usar una parte de una región constante de una cadena H o cadena L de anticuerpo (región CH1 o región CL, por ejemplo, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO.: 16). Además, el dominio espaciador puede ser una secuencia artificialmente sintetizada.

Además, en el CAR, una secuencia de péptidos señal se puede unir al extremo N. La secuencia de péptidos señal existe en el extremo N de muchas proteínas secretoras y proteínas de membrana, y tiene una longitud de 15 a 30 aminoácidos. Puesto que muchas de las moléculas de proteínas mencionadas anteriormente como dominio intracelular tienen secuencias de péptidos señal, los péptidos señal se pueden usar como péptido señal para el CAR. En una realización, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6).

45 4. Dominio intracelular

El dominio citoplásmico o de otro modo el dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que el CAR se ha dispuesto. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas. Así el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de función efectora y dirige la célula para que realice una función especializada. Aunque normalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. Hasta el punto que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede usar en lugar de la cadena intacta, en tanto que transduzca la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de función efectora.

Los ejemplos preferidos de dominios de señalización intracelular para su uso en el CAR incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de linfocitos T (TCR) y los co-receptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales tras el acoplamiento del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

- 5 Se conoce que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa del linfocito T y que también se requiere una señal secundaria o co-estimulante. Así, se puede decir que la activación de linfocitos T está mediada por dos clases distintas de secuencia de señalización citoplásmica: las que inician la activación dependiente de antígeno mediante el TCR (secuencias de señalización citoplásmica primaria) y las que actúan en un modo independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o co-estimulante (secuencias de señalización citoplásmica secundaria).

Las secuencias de señalización citoplásmica primaria regulan la activación primaria del complejo de TCR o en una forma estimulante, o en una forma inhibidora. Las secuencias de señalización citoplásmica primaria que actúan en un modo estimulante pueden contener motivos que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina o ITAMs.

- 15 Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmica primaria que son de uso particular en los CARs desvelados en el presente documento incluyen los derivados de TCR zeta (CD3 Zeta), FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Los ejemplos no limitantes específicos de ITAM incluyen péptidos que tienen secuencias de números de aminoácidos 51 a 164 de CD3.zeta. (NCBI RefSeq: NP.sub.—932170.1), números de aminoácidos 45 a 86 de Fc.épsilon.RI.gamma. (NCBI RefSeq: NP.sub.--004097.1), números de aminoácidos 201 a 244 de Fc.épsilon.RI.beta. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000130.1), números de aminoácidos 139 a 182 de CD3.gamma. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000064.1), números de aminoácidos 128 a 171 de CD3 .delta. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000723.1), números de aminoácidos 153 a 207 de CD3.épsilon. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000724.1), números de aminoácidos 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2), números de aminoácidos 707 a 847 de 0022 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001762.2), números de aminoácidos 166 a 226 de CD79a (NCBI RefSeq: NP.sub.--001774.1), números de aminoácidos 182 a 229 de CD79b (NCBI RefSeq: NP.sub.--000617.1) y números de aminoácidos 177 a 252 de CD66d (NCBI RefSeq: NP.sub.--001806.2), y sus variantes que tienen la misma función que tienen estos péptidos. El número de aminoácidos basado en la información de secuencias de aminoácidos de NCBI RefSeq ID o GenBank descrito en el presente documento se numera basándose en la longitud completa del precursor (que comprende una secuencia de péptidos señal etc.) de cada proteína. En una realización, la de molécula señalización citoplásmica en el CAR comprende una secuencia de señalización citoplásmica derivada de CD3 zeta.

- En una realización preferida, el dominio intracelular del CAR se puede diseñar para comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio(s) citoplásmico(s) deseado(s) útiles en el contexto del CAR. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR puede comprender una porción de cadena zeta de CD3 y una región de señalización coestimulante. La región de señalización coestimulante se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimulante. Una molécula coestimulante es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta de linfocitos eficiente a un antígeno. Los ejemplos de dichas moléculas coestimulantes incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente a CD83, y similares. Los ejemplos no limitantes específicos de dichas moléculas coestimulantes incluyen péptidos que tienen secuencias de números de aminoácidos 236 a 351 de CD2 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001758.2), números de aminoácidos 421 a 458 de CD4 (NCBI RefSeq: NP.sub.--000607.1), números de aminoácidos 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2), números de aminoácidos 207 a 235 de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759,3), números de aminoácidos 196 a 210 de CD83 (GenBank: AAA35664.1), números de aminoácidos 181 a 220 de CD28 (NCBI RefSeq: NP.sub.--006130.1), números de aminoácidos 214 a 255 de CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP.sub.--001552.2), números de aminoácidos 241 a 277 de CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP.sub.--003318.1), y números de aminoácidos 166 a 199 de ICOS (NCBI RefSeq: NP.sub.--036224.1), y sus variantes que tienen la misma función que tienen estos péptidos. Así, mientras que la divulgación en el presente documento se ejemplifica principalmente con 4-1BB como el elemento de señalización coestimulante, otros elementos coestimulantes están dentro del alcance de la divulgación.

Las secuencias de señalización citoplásmica dentro de la porción de señalización citoplásmica del CAR se pueden unir a entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un conector oligo- o polipeptídico corto, preferentemente entre 2 y 10 aminoácidos en longitud, puede formar el enlace. Un doblete de glicina-serina proporciona un conector particularmente adecuado.

- 55 En una realización, el dominio intracelular se diseña para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otra realización, el dominio intracelular se diseña para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En otra realización más, el dominio intracelular se diseña para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y 4-1BB.

- 60 En una realización, el dominio intracelular en el CAR se diseña para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en donde el dominio de señalización de 4-1BB comprende la

secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEQ ID NO: 17 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácidos nucleicos expuesta en SEQ ID NO: 19.

5 En una realización, el dominio intracelular en el CAR se diseña para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en donde el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

10 En una realización, el dominio intracelular en el CAR se diseña para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en donde el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 18 y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20.

5. Descripción adicional de CARs

15 También están explícitamente incluidos dentro del alcance de la invención porciones funcionales de los CARs desveladas en el presente documento. El término "porción funcional" cuando se usa en referencia a un CAR se refiere a cualquier parte o fragmento de uno o más de los CARs desvelados en el presente documento, parte o fragmento que retiene la actividad biológica del CAR del que es una parte (el CAR parental). Las porciones funcionales engloban, por ejemplo, las partes de un CAR que retienen la capacidad de reconocer células diana, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, hasta un grado similar, el mismo grado, o a un grado más alto, que el CAR parental. En referencia al CAR parental, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, 20 aproximadamente 10 %, 25 %, 30 %, 50 %, 68 %, 80 %, 90 %, 95 %, o más, del CAR parental.

25 La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi de la porción, o en ambos extremos, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del CAR parental. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, reconocen células diana, detectan cáncer, tratan o previenen cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del CAR parental.

30 En el alcance de la divulgación se incluyen variantes funcionales de los CARs desvelados en el presente documento. El término "variante funcional" como se usa en el presente documento se refiere a un CAR, polipéptido, o proteína que tiene identidad o similitud de secuencia sustancial o significativa con un CAR parental, variante funcional que retiene la actividad biológica del CAR del que es una variante. Las variantes funcionales engloban, por ejemplo, las variantes del CAR descritas en el presente documento (el CAR parental) que retienen la capacidad de reconocer células diana hasta un grado similar, el mismo grado, o a un grado más alto, que el CAR parental. En referencia al CAR parental, la variante funcional puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 30 %, 50 %, 75 %, 80 %, 90 %, 98 % o más idéntica en secuencia de aminoácidos al CAR parental.

35 Una variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución de aminoácidos conservativa. Alternativamente o además, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución no conservativa de aminoácidos. En este caso, es preferible que la sustitución no conservativa de aminoácidos no interfiera o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. La sustitución no conservativa de aminoácidos puede potenciar la 40 actividad biológica de la variante funcional, de forma que la actividad biológica de la variante funcional aumente en comparación con el CAR parental.

45 Las sustituciones de aminoácidos de los CARs son preferentemente sustituciones conservativas de aminoácidos. Se conocen en la técnica las sustituciones conservativas de aminoácidos, e incluyen sustituciones de aminoácidos en las que un aminoácido que tiene ciertas propiedades químicas y/o físicas se intercambia por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades químicas o físicas, o similares. Por ejemplo, la sustitución conservativa de aminoácidos puede ser un aminoácido ácido/polar negativamente cargado sustituido por otro aminoácido ácido/polar negativamente cargado (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, He, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val, etc.), un aminoácido básico/polar positivamente cargado sustituido por otro aminoácido básico/polar positivamente cargado (por ejemplo Lys, His, Arg, etc.), un aminoácido sin carga con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido sin carga con una cadena lateral polar (por ejemplo, Asn, Gin, Ser, Thr, Tyr, etc.), un aminoácido con una cadena lateral beta-ramificada sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral beta-ramificada (por ejemplo, He, Thr y Val), un aminoácido con una cadena lateral aromática sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral aromática (por ejemplo, His, Phe, Trp y Tyr), etc.

55 El CAR puede consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en el presente documento, de forma que otros componentes, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambien materialmente la actividad biológica de la variante funcional.

Los CARs (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) pueden ser de cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, a condición de que los CARs (o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos) retengan su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente a antígeno, detectar células enfermas en un mamífero, o tratar o prevenir la enfermedad en un mamífero, etc. Por ejemplo, el CAR puede tener aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos de longitud, tal como 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos de longitud.

Los CARs (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de la invención) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos que existen de forma natural. Dichos aminoácidos sintéticos se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexanocarboxílico, norleucina, ácido -amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β-fenilserina β-hidroxifenilalanina, fenilglicina, a-naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido -aminociclopentanocarboxílico, ácido α-aminociclohexanocarboxílico, ácido α-aminocicloheptanocarboxílico, ácido α-(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido γ-diaminobutírico, ácido β-diaminopropiónico, homofenilalanina y α-terc-butilglicina.

Los CARs (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) pueden estar glucosilados, amidados, carboxilados, fosforilados, esterificados, N-acilados, ciclados por, por ejemplo, un puente disulfuro, o se convierten en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente se dimerizan o polimerizan, o conjugan.

Los CARs (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica. Los CARs se pueden preparar por cualquier método adecuado de preparación de polipéptidos o proteínas. Los métodos adecuados de síntesis *de novo* de los polipéptidos y proteínas se describen en referencias, tales como Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; *Epitope Mapping*, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001; y la patente de EE. UU. 5.449.752. Por tanto, los polipéptidos y proteínas se pueden producir recombinantemente usando los ácidos nucleicos descritos en el presente documento usando métodos recombinantes convencionales. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. Además, algunos de los CARs (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden aislar y/o purificar de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, por ejemplo, una rata, un humano, etc. Los métodos de aislamiento y purificación se conocen bien en la técnica. Alternativamente, los CARs descritos en el presente documento (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden sintetizar comercialmente por empresas. A este respecto, los CARs pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

B. Anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno

Una realización proporciona además un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o dominio de unión al antígeno, o porción del mismo, que se une específicamente a uno o más de los antígenos desvelados en el presente documento. Como se usa en el presente documento, un "linfocito T que expresa un CAR," o un "linfocito T con CAR" significa un linfocito T que expresa un CAR, y tiene especificidad por antígenos determinada por, por ejemplo, el dominio de direccionamiento derivado de anticuerpo del CAR.

Como se usa en el presente documento, un "dominio de unión al antígeno" puede incluir un anticuerpo y fragmentos de unión al antígeno del mismo. El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, mientras presenten la actividad de unión al antígeno deseada. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas y variantes y fragmentos de las mismas conocidas en la técnica que retienen afinidad de unión por el antígeno.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que existen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico único. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por ser obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. En algunos ejemplos, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectedo el ácido nucleico que codifica las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo de un único anticuerpo (o un fragmento de unión al antígeno del mismo), o una progenie del mismo. En algunos ejemplos, los anticuerpos monoclonales se aíslan de un sujeto. Los anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservativas de aminoácidos que no tienen sustancialmente efecto sobre la unión al antígeno u otras

funciones de inmunoglobulina. Se conocen métodos de producción de anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo, por ejemplo, véase Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Publications, New York (2013).

5 Normalmente, una inmunoglobulina tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Los genes de inmunoglobulina incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la infinidad de genes del dominio variable de inmunoglobulina. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

10 Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante (o dominio constante) y una región variable (o dominio variable; véase, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). En varias realizaciones, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se combinan con se unen específicamente con el antígeno. En realizaciones adicionales, solo se requiere la región variable de la cadena pesada. Por ejemplo, los anticuerpos de camélido que existen de forma natural que consisten en una cadena pesada solo son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera (véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature*, 363:446-448, 1993; Sheriff et al., *Nat. Struct. Biol.*, 3:733-736, 1996). Las referencias a "VH" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada del anticuerpo, que incluye la de un fragmento de unión al antígeno, tal como Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a "VL" o "VL" se refieren al dominio variable de una cadena ligera del anticuerpo, que incluye la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

20 Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una "región estructural" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDRs" (véase, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región estructural de un anticuerpo, que es las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para situar y alinear las CDRs en el espacio tridimensional.

25 Las CDRs son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Los límites de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar fácilmente usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, que incluyen los descritos por Kabat et al. ("*Sequences of Proteins of Immunological Interest*," 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991; esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani et al., (*JMB* 273,927-948, 1997; esquema de numeración de "Chothia"), y Lefranc et al. ("*IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*", *Dev. Comp. Immunol.*, 27:55-77, 2003; esquema de numeración de "IMGT"). Las CDRs de cada cadena se denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3 (de extremo N a extremo C), y también se identifican normalmente por la cadena en la que se sitúa la CDR particular. Así, una CDR3 VH es la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en que se encuentra, mientras que una CDR1 VL es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en que se encuentra. Las CDRs de cadena ligera se denominan algunas veces LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las CDRs de cadena pesada se denominan algunas veces LCDR1, LCDR2 y LCDR3.

30 Un "fragmento de unión al antígeno" es una porción de un anticuerpo de longitud completa que retiene la capacidad de reconocer específicamente el antígeno relacionado, así como diversas combinaciones de dichas porciones. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión al antígeno incluyen Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de unión al antígeno o producidos por la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Kontermann y Dubel (Ed), *Antibody Engineering*, Vols. 1-2, 2ª Ed., Springer Press, 2010).

35 Un anticuerpo monocatenario (scFv) es una molécula genéticamente manipulada que contiene los dominios VH y VL de uno o más anticuerpo(s) enlazados por un conector polipeptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla genéticamente fusionada (véase, por ejemplo, Bird et al., *Science*, 242:423-426, 1988; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:5879-5883, 1988; Ahmad et al., *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, doi:10.1155/2012/980250; Marbry, *IDrugs*, 13:543-549, 2010). La orientación intramolecular de VH-dominio y VL-dominio en un scFv normalmente no es decisiva para scFvs. Así, se pueden usar scFvs con ambas disposiciones posibles (VH-dominio-dominio de conector-VL-dominio; VL-dominio-dominio de conector-VH-dominio).

40 En un dsFv, las cadenas variables de la cadena pesada y ligera han sido mutadas para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. También se incluyen diacuerpos, que son bivalentes, anticuerpos biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena de polipéptidos, pero que usan un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:6444-6448, 1993; Poljak et al., *Structure*, 2:1121-1123, 1994).

Los anticuerpos también incluyen formas genéticamente manipuladas tales como anticuerpos quiméricos (tales como anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véanse, por tanto, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3ª Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997.

5 Los anticuerpos naturales que no existen de forma natural se pueden construir usando síntesis de péptidos en fase sólida, se pueden producir recombinantemente, o se pueden obtener, por ejemplo, por bibliotecas combinatorias de cribado que consisten en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables como se describe por Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989). Estos y otros métodos de preparación, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, de CDR injertadas, monocatenarios y bifuncionales, se conocen bien por los expertos en la técnica (Winter y Harris, Immunol. Today 14:243-246 (1993); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989); Harlow and Lane, arriba, 1988; Hilyard et al., Protein Engineering: A practical approach (IRL Press 1992); Borrabeck, Antibody Engineering, 2d ed. (Oxford University Press 1995).

10 Un "anticuerpo que se une al mismo epítotope" como anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en 50 % o más, y en cambio, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en 50 % o más. Se conocen ensayos de competición de anticuerpos, y en el presente documento se proporciona un ensayo de competición a modo de ejemplo.

15 Un anticuerpo "humanizado" o fragmento de unión al antígeno incluye una región estructural humana y una o más CDRs de un anticuerpo no humano (tal como un ratón, rata, o sintético) o fragmento de unión al antígeno. El anticuerpo no humano o fragmento de unión al antígeno que proporciona las CDRs se llama un "donante," y el anticuerpo humano o fragmento de unión al antígeno que proporciona la región estructural se llama un "aceptor". En una realización, todas las CDRs son de la inmunoglobulina de donante en una inmunoglobulina humanizada. No necesitan estar presentes regiones constantes, pero si están, pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, tales como al menos aproximadamente 85-90 %, tal como
20 aproximadamente 95 % o más idénticas. Por tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno, excepto posiblemente las CDRs, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de secuencias naturales de anticuerpo humano.

25 Un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo que incluye secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, que normalmente son de especies diferentes. En algunos ejemplos, un anticuerpo quimérico incluye una o más CDRs y/o regiones estructurales de un anticuerpo humano y CDRs y/o regiones estructurales de otro anticuerpo humano.

30 Un "anticuerpo completamente humano" o "anticuerpo humano" es un anticuerpo que incluye secuencias del (o derivadas del) genoma humano, y no incluye secuencia de otra especie. En algunas realizaciones, un anticuerpo humano incluye CDRs, regiones estructurales y (si está presente) una región Fc de (o derivada del) genoma humano. Los anticuerpos humanos se pueden identificar y aislar usando tecnologías para crear anticuerpos basados
35 en secuencias derivadas del genoma humano, por ejemplo, por presentación en fagos o usando animales transgénicos (véase, por ejemplo, Barbas et al. Phage display: A Laboratory Manual. 1ª Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. Print.; Lonberg, Nat. Biotech., 23: 1117-1125, 2005; Lonenberg, Curr. Opin. Immunol., 20:450-459, 2008).

40 Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si existe más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina que existe de forma natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo monocatenario o fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo biespecífico o bifuncional tiene dos sitios de unión diferentes.

45 Los métodos de ensayo de anticuerpos para la capacidad para unirse a cualquier porción funcional del CAR se conocen en la técnica e incluyen cualquier ensayo de unión anticuerpo-antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitiva (véase, por ejemplo, Janeway et al., abajo, publicación de solicitud de patente de EE. UU. N° 2002/0197266 A1, y la patente de EE. UU. N° 7.338.929).

50 Por tanto, un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).

C. Conjugados

55 Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, o anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, específicos para uno o más de los antígenos desvelados en el presente documento, se puede conjugar con un agente, tal como una molécula efectora o marcador detectable, usando cualquier número de medios conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden usar tanto medios de unión covalentes como no covalentes. Los conjugados incluyen, pero no se limitan a, moléculas en las que existe un enlace covalente de una molécula efectora o un marcador detectable para un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a uno o

más de los antígenos desvelados en el presente documento. Un experto en la técnica apreciará que se pueden usar diversas moléculas efectoras y marcadores detectables, que incluyen (pero no se limitan a) agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, toxinas, agentes radiactivos tales como ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C , ^3H y ^{35}S y otros marcadores, restos diana y ligandos, etc.

- 5 La elección de una molécula efectora particular o marcador detectable depende de la molécula diana particular o célula, y el efecto biológico deseado. Así, por ejemplo, la molécula efectora puede ser una citotoxina que se usa para provocar la muerte de una célula diana particular (tal como una célula tumoral).

El procedimiento de fijación de una molécula efectora o marcador detectable a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno varía según la estructura química del efector. Los polipéptidos contienen normalmente una variedad de grupos funcionales; tales como grupos ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para dar como resultado la unión de la molécula efectora o marcador detectable. Alternativamente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se derivatiza para exponer o fijar grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas conectoras conocidas tales como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL. El conector puede ser cualquier molécula usada para unir el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno a la molécula efectora o marcador detectable. El conector es capaz de formar enlaces covalentes con tanto el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno como con la molécula efectora o marcador detectable. Los expertos en la técnica conocen bien los conectores adecuados e incluyen, pero no se limitan a, conectores de carbono de cadena lineal o ramificada, conectores de carbono heterocíclicos, o conectores peptídicos. Donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y la molécula efectora o marcador detectable sean polipéptidos, los conectores se pueden unir a los aminoácidos constituyentes mediante sus grupos laterales (tal como mediante un enlace disulfuro con cisteína) o con los grupos amino y carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En varias realizaciones, el conector puede incluir un elemento espaciador, que, cuando está presente, aumenta el tamaño del conector de forma que aumenta la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. El experto en la técnica conoce espaciadores a modo de ejemplo, e incluyen los enumerados en las patentes de EE. UU. N^o 7.964.5667, 498.298, 6.884.869, 6.323.315, 6.239.104, 6.034.065, 5.780.588, 5.665.860, 5.663.149, 5.635.483, 5.599.902, 5.554.725, 5.530.097, 5.521.284, 5.504.191, 5.410.024, 5.138.036, 5.076.973, 4.986.988, 4.978.744, 4.879.278, 4.816.444 y 4.486.414, así como las publicaciones de patente de EE. UU. N^o 20110212088 y 20110070248.

En algunas realizaciones, el conector es escindible en condiciones intracelulares, de forma que la escisión del conector libera la molécula efectora o marcador detectable del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en el entorno intracelular. En aún otras realizaciones, el conector no es escindible y la molécula efectora o marcador detectable se libera, por ejemplo, por la degradación del anticuerpo. En algunas realizaciones, el conector es escindible por un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El conector puede ser, por ejemplo, un conector peptídico que se escinde por una peptidasa intracelular o enzima proteasa, que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el conector peptídico tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Sin embargo, el conector puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud, tal como 1-2, 1-3, 2-5, 3-10, 3-15, 1-5, 1-10, 1-15 aminoácidos de longitud. Las proteasas pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se conocen por hidrolizar los derivados de fármaco de dipéptido dando como resultado la liberación de fármaco activo dentro de células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Por ejemplo, se puede usar un conector peptídico que es escindible por la catepsina-B de proteasa dependiente de tiol (por ejemplo, un conector de fenilalanina-leucina o de glicina-fenilalanina-leucina-glicina). Otros ejemplos de dichos conectores se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N^o 6.214.345. En una realización específica, el conector peptídico escindible por una proteasa intracelular es un conector de valina-citrulina o un conector de fenilalanina-lisina (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N^o 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el conector de valina-citrulina).

En otras realizaciones, el conector escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Normalmente, el conector sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil a ácidos que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetol, o similares) (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N^o 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661). Dichos conectores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como aquellas en la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el conector hidrolizable es un conector de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter fijado al agente terapéutico por un enlace acilhidrazona (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N^o 5.622.929).

En otras realizaciones, el conector es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un conector de disulfuro). Se conocen en la técnica una variedad de conectores de disulfuro, que incluyen, por ejemplo, los que se pueden formar usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno) -, SPDB

y SMPT (véanse, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., en Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987); Phillips et al., Cancer Res. 68:92809290, 2008). Véase también la patente de EE. UU. N° 4.880.935).

5 En aún otras realizaciones específicas, el conector es un conector de malonato (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), un conector de maleimidobenzoilo (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304), o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12).

En aún otras realizaciones, el conector no es escindible y la molécula efectora o el marcador detectable se libera por degradación del anticuerpo (véase la publicación de EE. UU. N° 2005/0238649 incorporada como referencia en el presente documento en su totalidad).

10 En varias realizaciones, el conector es resistente a la escisión en un entorno extracelular. Por ejemplo, no más de aproximadamente 20 %, no más de aproximadamente 15 %, no más de aproximadamente 10 %, no más de aproximadamente 5 %, no más de aproximadamente 3 %, o no más de aproximadamente 1 % de los conectores, en una muestra de conjugado, se escinden cuando el conjugado está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Si un conector es resistente o no a la escisión en un entorno extracelular se puede determinar, por
15 ejemplo, incubando el conjugado que contiene el conector de interés con plasma durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y luego cuantificando la cantidad de molécula efectora libre o marcador detectable presente en el plasma. Una variedad de conectores a modo de ejemplo que se pueden usar en los conjugados se describen en los documento de patente WO 2004-010957, publicación de EE. UU. N° 2006/0074008, publicación de EE. UU. N° 20050238649 y publicación de EE. UU. N° 2006/0024317.

20 En varias realizaciones, se proporcionan conjugados de un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Se conocen bien en la técnica los compuestos de maitansina adecuados para su uso como restos de toxina de maitansinoide, y se pueden aislar de fuentes naturales según métodos conocidos, producidos usando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973), o maitansinol y análogos de maitansinol preparados sintéticamente según métodos conocidos. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE. UU. N° 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE. UU. N° 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533. Los conjugados que contienen maitansinoides, métodos de preparación de los mismos, y su uso
35 terapéutico, se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N° 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163 y la patente europea EP 0 425 235 B1.

Se pueden emplear toxinas adicionales con un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo. Las toxinas a modo de ejemplo incluyen exotoxina de *Pseudomonas* (PE), ricina, abrina, toxina diftérica y subunidades de la misma, ribotoxina, ribonucleasa, saporina y caliqueamicina, así como toxina botulínica A a F. Estas toxinas se conocen bien en la técnica y muchas están fácilmente disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Las toxinas contempladas también incluyen variantes de las toxinas (véanse, por ejemplo, véanse, las patentes de EE. UU. N° 5.079.163 y 4.689.401).

La saporina es una toxina derivada de *Saponaria officinalis* que altera la síntesis de proteínas inactivando la porción 60S del complejo ribosomal (Stirpe et al., Bio/Technology, 10:405-412, 1992). Sin embargo, la toxina no tiene mecanismo para la entrada específica en las células y, por tanto, requiere conjugación con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que reconoce una proteína de la superficie celular que se internaliza para ser eficientemente absorbida por las células.

La toxina diftérica se aísla de *Corynebacterium diphtheriae*. Normalmente, la toxina diftérica para su uso en las inmunotoxinas se muta para reducir o eliminar la toxicidad no específica. Se conoce un mutante conocido como CRM107, que tiene actividad enzimática completa, pero toxicidad no específica notablemente reducida, desde los años 70 (Laird y Groman, J. Virol. 19:220, 1976), y se ha usado en ensayos clínicos humanos. Véase la patente de EE. UU. N° 5.792.458 y la patente de EE. UU. N° 5.208.021.

La ricina es la lectina RCA60 de *Ricinus communis* (haba de ricino). Para ejemplos de ricina véase la patente de EE. UU. N° 5.079.163 y la patente de EE. UU. N° 4.689.401. La aglutinina de *Ricinus communis* (RCA) ocurre en dos formas designadas RCA₆₀ y RCA₁₂₀ según sus pesos moleculares de aproximadamente 65 y 120 kD, respectivamente (Nicholson & Blaustein, J. Biochim. Biophys. Acta 266:543, 1972). La cadena A es responsable de inactivar la síntesis de proteínas y destruir células. La cadena B une la ricina a los restos de galactosa de la

superficie celular y facilita el transporte de la cadena A en el citosol (Olsnes et al., Nature 249:627-631, 1974 y patente de EE. UU. Nº 3.060.165).

También se han conjugado ribonucleasas con moléculas de direccionamiento para su uso como inmunotoxinas (véase Suzuki et al., Nat. Biotech. 17:265-70, 1999). Las ribotoxinas a modo de ejemplo tales como α -sarcina y restrictocina se tratan en, por ejemplo, Rathore et al., Gene 190:31-5, 1997; y Goyal y Batra, Biochem. 345 Pt 2:247-54, 2000. La caliqueamicinas se aislaron por primera vez de *Micromonospora echinospora* y son miembros de la familia de antibióticos antitumorales de enediina que provocan roturas de doble cadena en ADN que conducen a la apoptosis (véase, por ejemplo, Lee et al., J. Antibiot. 42:1070-87,1989). El fármaco es el resto tóxico de una inmunotoxina en ensayos clínicos (véase, por ejemplo, Gillespie et al., Ann. Oncol. 11:735-41, 2000).

La abrina incluye lectinas tóxicas de *Abrus precatorius*. Los principios tóxicos, abrina a, b, c y d, tienen un peso molecular de desde aproximadamente 63 y 67 kD y están compuestos de dos cadenas de polipéptidos A y B enlazados por disulfuro. La cadena A inhibe la síntesis de proteínas; la cadena B (abrina-b) se une a restos de D-galactosa (véase Funatsu et al., Agr. Biol. Chem. 52:1095, 1988; y Olsnes, Methods Enzymol. 50:330-335, 1978).

Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión al antígeno de los mismos, específicos para uno o más de los antígenos desvelados en el presente documento, también se puede conjugar con un marcador detectable; por ejemplo, un marcador detectable capaz de detección por ELISA, espectrofotometría, citometría de flujo, microscopía o técnicas de diagnóstico por imágenes (tales como tomografía computerizada (TC), tomografía axial computerizada (TAC), imagen por resonancia magnética (IRM), imagen por resonancia magnética nuclear IRMN), tomografía por resonancia magnética (TMR), ultrasonidos, fibroendoscopia y examen laparoscópico). Los ejemplos no limitantes específicos de los marcadores detectables incluyen fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enlaces enzimáticos, isótopos radiactivos y metales o compuestos pesados (por ejemplo, nanocristales de óxido de hierro superparamagnético para la detección por IRM). Por ejemplo, marcadores detectables útiles incluyen compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares. También son de uso los marcadores bioluminiscentes, tales como luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteína amarilla fluorescente (YFP). Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, también se puede conjugar con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se conjuga con una enzima detectable, se puede detectar añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que puede ser distinguido. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es visualmente detectable. Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, también se puede conjugar con biotina, y se detecta mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Se debe observar que la avidina en sí se puede conjugar con una enzima o un marcador fluorescente.

Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se puede conjugar con un agente paramagnético, tal como gadolinio. Los agentes paramagnéticos tales como el óxido de hierro superparamagnético también son de uso como marcadores. Los anticuerpos también se pueden conjugar con lantánidos (tales como europio y disprosio) y manganeso. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno también se puede marcar con epítopes de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (tal como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcadores de epítopes).

Un CAR, un linfocito T que expresa un CAR, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, también se puede conjugar con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador se puede usar para tanto fines de diagnóstico como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador se puede usar para detectar uno o más de los antígenos desvelados en el presente documento y células que expresan antígeno por rayos X, espectros de emisión, u otras técnicas de diagnóstico. Además, el radiomarcador se puede usar terapéuticamente como una toxina para el tratamiento de tumores en un sujeto, por ejemplo, para el tratamiento de un neuroblastoma. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

Los expertos en la técnica conocen bien los medios de detección de dichos marcadores detectables. Así, por ejemplo, se pueden detectar radiomarcadores usando película fotográfica o contadores de centelleo, se pueden detectar marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan normalmente proveyendo la enzima de un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y se detectan marcadores colorimétricos simplemente visualizando el marcador coloreado.

D. Nucleótidos, expresión, vectores y células hospedadoras

Se proporciona además por una realización de la invención un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los CARs, un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, descrito en el presente documento (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos). Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las secuencias líder, dominios de unión al antígeno, dominios transmembranarios y/o dominios de señalización intracelular de linfocitos T descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos puede estar modificada en los codones. Sin desear quedar ligado a una teoría particular, se cree que la optimización de codones de la secuencia de nucleótidos aumenta la eficiencia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización de codones de la secuencia de nucleótidos puede implicar sustituir un codón nativo por otro codón que codifica el mismo aminoácido, pero puede ser traducido por ARNt que está más fácilmente disponible dentro de una célula, aumentando así la eficiencia de traducción. La optimización de la secuencia de nucleótidos también puede reducir las estructuras de ARNm secundario que interferirían con la traducción, aumentando así la eficiencia de traducción.

En una realización de la invención, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos modificada en los codones que codifica el dominio de unión al antígeno del CAR inventivo. En otra realización de la invención, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos modificada en los codones que codifica cualquiera de los CARs descritos en el presente documento (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos).

"Ácido nucleico", como se usa en el presente documento, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico" y, en general, significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace internucleotídico natural, no natural o alterado, tal como un enlace fosforamidoato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido sin modificar. En algunas realizaciones, el ácido nucleico no comprende ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, como se trata en el presente documento, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones.

Un ácido nucleico recombinante puede ser uno que tiene una secuencia que no existe de forma natural o tiene una secuencia que se prepara por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo. Esta combinación artificial se realiza frecuentemente por síntesis química o, más comúnmente, por la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, por técnicas de ingeniería genética, tales como aquellos descritos en Sambrook et al., arriba. Los ácidos nucleicos se pueden construir basándose en síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., arriba, y Ausubel et al., arriba. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede sintetizar químicamente usando nucleótidos que existen de forma natural o nucleótidos diversamente modificados diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-sustituido adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención se pueden comprar de empresas, tales como Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EE. UU.).

El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos aislada o purificada que codifique cualquiera de los CARs o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos puede comprender una secuencia de nucleótidos que se degenera a cualquiera de las secuencias o una combinación de secuencias degeneradas.

Una realización también proporciona un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

La secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas se puede hibridar en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" se indica que la secuencia de nucleótidos se hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos

descritos en el presente documento) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o uno que contiene solo algunos desapareamientos dispersos de una secuencia aleatoria que resultó que tenía algunas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que se correspondieron con la secuencia de nucleótidos. Dichas pequeñas regiones de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad las hace fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente alta incluirían, por ejemplo, condiciones de baja sal y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por aproximadamente NaCl 0,02-0,1 M o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70 °C. Dichas condiciones de alta rigurosidad toleran poco, si algún, desapareamiento entre la secuencia de nucleótidos y el molde o la cadena diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los CARs inventivos. En general, se aprecia que las condiciones se pueden volver más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

También se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 70 % o más, por ejemplo, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento.

En una realización, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector de expresión recombinante. A este respecto, una realización proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos. Para los fines en el presente documento, el término "vector de expresión recombinante" significa una construcción de oligonucleótido o polinucleótido genéticamente modificado que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido, o péptido por una célula hospedadora, cuando la construcción comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, proteína, polipéptido, o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para que el ARNm, proteína, polipéptido, o péptido, se exprese dentro de la célula. Los vectores no existen de forma natural en conjunto.

Sin embargo, partes de los vectores pueden existir de forma natural. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a, ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, sintetizados u obtenidos en parte de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleotídicos que existen de forma natural o que no existen de forma natural, o ambos tipos de enlaces. Preferentemente, los enlaces nucleotídicos o internucleotídicos que no existen de forma natural o alterados no dificultan la transcripción o replicación del vector.

En una realización, el vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector adecuado de expresión recombinante, y se puede usar para transformar o transfectar cualquier célula hospedadora adecuada. Los vectores adecuados incluyen los diseñados para la propagación y expansión o para la expresión, o ambos, tales como plásmidos y virus. El vector se puede seleccionar del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA).

También se pueden usar vectores de bacteriófago, tales como λT10, λT11, λZapII (Stratagene), EMBL4 y λNMI 149. Los ejemplos de vectores de expresión en planta incluyen pBIOI, pBII01.2, pBHOI.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión en animal incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral o un vector lentiviral. Un vector lentiviral es un vector derivado de al menos una porción de un genoma del lentivirus, que incluye especialmente un vector lentiviral auto-inactivante como se proporciona en Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores de lentivirus que se pueden usar en la clínica incluyen, por ejemplo, y no a modo de limitación, la tecnología de administración génica LENTIVECTOR.RTM. de Oxford BioMedica plc, el sistema de vector LENTIMAX.TM. de Lentigen y similares. También están disponibles tipos no clínicos de vectores lentivirales y serían conocidos por un experto en la técnica.

Se conocen en la técnica varias técnicas de transfección, en general (véase, por ejemplo, Graham et al., Virology, 52: 456-467 (1973); Sambrook et al., arriba; Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986); and Chu et al, Gene, 13: 97 (1981).

Los métodos de transfección incluyen co-precipitación con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, Graham et al., arriba), microinyección directa en células cultivadas (véase, por ejemplo, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980)), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa et al., BioTechniques, 6: 742-751 (1988)), transferencia génica mediada por liposomas (véase, por ejemplo, Mannino et al., BioTechniques, 6: 682-690 (1988)), transducción mediada por lípidos (véase, por ejemplo, Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987)) y administración de ácido nucleico usando microproyectiles de alta velocidad (véase, por ejemplo, Klein et al, Nature, 327: 70-73 (1987)).

En una realización, los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante convencionales descritas en, por ejemplo, Sambrook et al., arriba, y Ausubel et al., arriba. Las construcciones de vectores de expresión, que son circulares o lineales, se pueden preparar para contener un sistema de replicación funcional en una célula hospedadora procariota o eucariota. Los sistemas de replicación se pueden derivar, por ejemplo, de ColEI, plásmido 2 μ , λ , SV40, virus del papiloma bovino, y similares.

El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias reguladoras, tales como inicio de la transcripción y traducción y codones de terminación, que son específicos del tipo de célula hospedadora (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en que el vector se va a introducir, según convenga, y teniendo en consideración si el vector está basado en ADN o ARN. El vector de expresión recombinante puede comprender sitios de restricción para facilitar la clonación.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de células hospedadoras transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un hospedador auxotrófico para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión inventivos incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a o que se hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. La selección de promotores, por ejemplo, fuerte, débil, inducible, específico de tejido y específico del desarrollo, está dentro de la experiencia habitual del experto. Similarmemente, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de la experiencia habitual del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV, o un promotor encontrado en la repetición terminal larga de los virus de células madre murinas.

Los vectores de expresión recombinantes se pueden diseñar para o expresión transitoria, para expresión estable, o para ambas. Por tanto, los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar para expresión constitutiva o para expresión inducible.

Además, los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar para incluir un gen suicida. Como se usa en el presente documento, el término "gen suicida" se refiere a un gen que provoca que muera la célula que expresa el gen suicida. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo, un fármaco, sobre la célula en la que se expresa el gen, y provoca que muera la célula cuando la célula se pone en contacto con o se expone al agente. Se conocen en la técnica genes suicidas (véase, por ejemplo, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el virus del herpes simple (VHS) gen de timidina cinasa (TK), citosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa, y nitroreductasa.

Una realización proporciona además una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "célula hospedadora" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante inventivo. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota, por ejemplo, planta, animal, hongos, o algas, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacterias o protozoos. La célula hospedadora puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un humano. La célula hospedadora puede ser una célula adherente o una célula suspensa, es decir, una célula que crece en suspensión. Se conocen en la técnica células hospedadoras adecuadas e incluyen, por ejemplo, células DH5a de *E. coli*, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293, y similares. Para los fines de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula hospedadora puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5a. Para los fines de producir un CAR recombinante, la célula hospedadora puede ser una célula de mamífero. La célula hospedadora puede ser una célula humana. Mientras que la célula hospedadora puede ser de cualquier tipo de célula, se puede originar a partir de cualquier tipo de tejido, y puede ser de cualquier etapa de desarrollo, la célula hospedadora puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). La célula hospedadora puede ser un linfocito T.

Para los fines en el presente documento, el linfocito T puede ser cualquier linfocito T, tal como un linfocito T cultivado, por ejemplo, un linfocito T primario, o un linfocito T de una línea de linfocitos T cultivados, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o un linfocito T obtenido de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, el linfocito T se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, sangre, médula ósea, ganglio linfático, el timo, u otros tejidos o fluidos. Los linfocitos T también se pueden estar enriquecidos o purificados. El linfocito T puede ser un linfocito T humano. El linfocito T puede ser un linfocito T aislado de un ser humano. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede ser de cualquier etapa de desarrollo, que incluye, pero no se limita a, linfocitos T de doble positivo CD4+/CD8+, linfocitos T cooperadores CD4+, por ejemplo, células Th1 y Th2, linfocitos T CD8+ (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos), células infiltrantes de tumor, linfocitos T de memoria, linfocitos T intactos, y similares. El linfocito T puede ser un linfocito T CD8+ o un linfocito T CD4+.

En una realización, los CARs como se describen en el presente documento se pueden usar en linfocitos no T adecuados. Dichas células son aquellas con una función inmunoefectora, tales como, por ejemplo, linfocitos NK y linfocitos de tipo T generados a partir de células madre pluripotentes.

5 También se proporciona por una realización una población de células que comprende al menos una célula hospedadora descrita en el presente documento. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo, una célula hospedadora (por ejemplo, un linfocito T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes, o una célula distinta de un linfocito T, por ejemplo, un linfocito B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una
10 célula de músculo, una célula de cerebro, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células hospedadoras (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una única célula hospedadora que comprende un vector de expresión recombinante, de forma que todas las células de la población comprendan el vector de expresión recombinante. En una realización de la invención, la población de células es una
15 población clonal que comprende células hospedadoras que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en el presente documento.

Se pueden aislar y/o purificar los CARs (incluyendo porciones funcionales y variantes de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras (incluyendo poblaciones de los mismos) y anticuerpos (incluyendo porciones de unión al antígeno de los mismos). Por ejemplo, una preparación de célula hospedadora purificada (o aislada) es una en la que la célula hospedadora es más pura que las células en su entorno natural dentro del cuerpo. Dichas células hospedadoras se pueden producir, por ejemplo, por técnicas de purificación estándar. En algunas realizaciones, una preparación de una célula hospedadora se purifica de forma que la célula hospedadora represente al menos aproximadamente 50 %, por ejemplo al menos aproximadamente
20 70 %, del contenido de células totales de la preparación. Por ejemplo, la pureza puede ser al menos aproximadamente 50 %, puede ser superior a aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 %, o puede ser aproximadamente 100 %.

E. Composiciones para su uso en los métodos de tratamiento

30 Se contempla que los CARs desvelados en el presente documento se pueden usar en métodos de prevención o tratamiento de una enfermedad en un mamífero. A este respecto, una realización proporciona una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero los CARs, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras, la población de células, los anticuerpos y/o las porciones de unión al antígeno de los mismos, y/o las composiciones farmacéuticas en una cantidad eficaz para tratar o prevenir cáncer en el mamífero.

35 Una realización comprende además linfoagotar el mamífero antes de administrar los CARs desvelados en el presente documento. Los ejemplos de linfoagotamiento incluyen, pero pueden no limitarse a, quimioterapia de linfoagotamiento no mieloablativa, quimioterapia de linfoagotamiento mieloablativa, irradiación de cuerpo entero, etc.

Para los fines de los métodos, en donde se administran células hospedadoras o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogenas o autólogas para el mamífero. Preferentemente, las células son autólogas para el mamífero. Como se usa en el presente documento, alogeno significa cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alogenos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogeno de los individuos de la misma especie puede ser suficientemente distinto genéticamente para interactuar antigénicamente. Como se usa en el presente documento, "autólogo" significa cualquier material derivado del mismo individuo al que se va a reintroducir después en el mismo individuo.
40
45

El mamífero denominado en el presente documento puede ser cualquier mamífero. Como se usa en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, que incluye, pero no se limita a, mamíferos del orden de los roedores, tales como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden de los lagomorfos, tales como conejos. Los mamíferos pueden ser del orden carnívoros, que incluye felinos (gatos) y caninos (perros). Los mamíferos pueden ser del orden artiodáctilos, que incluye bovinos (vacas) y porcinos (cerdos) o del orden perisodáctilos, que incluye equinos (caballos). Los mamíferos pueden ser del orden primates, cébidos o simioides (monos) o del orden antropoides (seres humanos y monos superiores). Preferentemente, el mamífero es un ser humano.
50

Con respecto a los métodos, el cáncer puede ser cualquier cáncer, que incluye cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de vejiga), cáncer de huesos, cáncer cerebral (por ejemplo, meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal, o anorrectal, cáncer de ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de nariz, fosa nasal, u oído medio, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino,
55

- fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no de células pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), linfoma, mesotelioma, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica-B, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer pancreático, peritoneo, epiplón y cáncer de mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejido blando, tumores sólidos, sarcoma sinovial, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de uréter.
- 5 Los términos "tratar" y "prevenir", así como palabras que proceden de las mismas, como se usa en el presente documento, no implican necesariamente 100 % o tratamiento completo o prevención. Más bien, existen grados variables de tratamiento o prevención que un experto habitual en la técnica reconoce por tener un posible beneficio o efecto terapéutico. A este respecto, los métodos pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero.
- 10 Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el método pueden incluir tratamiento o prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cáncer, que está tratándose o se previene. Por tanto, para los fines en el presente documento, la "prevención" puede englobar retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o afección de la misma.
- 15 Otra realización proporciona un método de detección de la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con los CARs, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras, la población de células, los anticuerpos, y/o las porciones de unión al antígeno de los mismos, o las composiciones farmacéuticas, formando así un complejo, (b) y detectar el complejo, en donde la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.
- 20 La muestra se puede obtener por cualquier método adecuado, por ejemplo, biopsia o autopsia. Una biopsia es la retirada de tejido y/o células de un individuo. Dicha retirada puede ser para recoger tejido y/o células del individuo para realizar experimentación en el tejido y/o células retirados. Esta experimentación puede incluir experimentos para determinar si el individuo tiene y/o está padeciendo una cierta afección o estado de enfermedad. La afección o enfermedad pueden ser, por ejemplo, cáncer.
- 25 Con respecto a una realización del método de detección de la presencia de un trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer, en un mamífero, la muestra que comprende células del mamífero puede ser una muestra que comprende células completas, lisados de las mismas, o una fracción de los lisados de las células completas, por ejemplo, una fracción nuclear o citoplásmica, una fracción de proteína completa, o una fracción de ácido nucleico. Si la muestra comprende células completas, las células pueden ser cualquier célula de mamífero, por ejemplo, las células de cualquier órgano o tejido, que incluye glóbulos sanguíneos o células endoteliales.
- 30 La puesta en contacto puede tener lugar *in vitro* o *in vivo* con respecto al mamífero. Preferentemente, la puesta en contacto es *in vitro*.
- 35 Por tanto, la detección del complejo puede ocurrir mediante cualquier número de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los CARs desvelados en el presente documento, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células, o anticuerpos, o porciones de unión al antígeno de los mismos, descritos en el presente documento, se pueden marcar con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro), como se desvela arriba.
- 40 Se conocen en la técnica métodos de ensayo de un CAR para la capacidad para reconocer células diana y para especificidad por antígenos. Por ejemplo, Clay et al., J. Immunol, 163: 507-513 (1999), enseñan métodos de medición de la liberación de citocinas (por ejemplo, interferón- γ , factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interleucina 2 (IL-2)). Además, se puede evaluar la función del CAR por medición de la citotoxicidad celular, como se describe en Zhao et al, J. Immunol. 174: 4415-4423 (2005).
- 45 Otra realización proporciona el uso de los CARs, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células, anticuerpos, o porciones de unión al antígeno de los mismos, y/o composiciones farmacéuticas de la invención, para el tratamiento o la prevención de un trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer, en un mamífero. El cáncer puede ser cualquiera de los cánceres descritos en el presente documento.
- 50 Se puede usar cualquier método de administración para los agentes terapéuticos desvelados, que incluye administración local y sistémica. Por ejemplo, se puede usar administración tópica, oral, intravascular tal como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intradérmica, intratecal y subcutánea. El modo particular de administración y la pauta posológica se seleccionarán por el profesional clínico que atiende, teniendo en cuenta los
- 55

datos del caso (por ejemplo, el sujeto, la enfermedad, el estado de enfermedad implicado, y si el tratamiento es profiláctico). En casos en los que se administre más de un agente o composición, se pueden usar una o más vías de administración; por ejemplo, un agente quimioterapéutico se puede administrar por vía oral y un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o conjugado o composición se puede administrar por vía intravenosa. Los métodos de administración incluyen inyección para la que el CAR, linfocito T con CAR, conjugados, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, o composiciones se proporcionan en un vehículo farmacéuticamente aceptable no tóxico tal como agua, solución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, 5 % de albúmina de suero humano, aceites no volátiles, oleato de etilo, o liposomas. En algunas realizaciones, se puede usar administración local de los compuestos desvelados, por ejemplo, aplicando el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno a una región de tejido de la que se ha retirado un tumor, o una región que se sospecha que está siendo propensa al desarrollo de un tumor. En algunas realizaciones, puede ser beneficiosa la liberación intratumoral sostenida (o casi tumoral) de la preparación farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En otros ejemplos, el conjugado se aplica como un colirio por vía tópica a la córnea, o por vía intravítrea en el ojo.

Los agentes terapéuticos desvelados se pueden formular en forma farmacéutica unitaria adecuada para la administración individual de dosificaciones precisas. Además, los agentes terapéuticos desvelados se pueden administrar en una dosis única o en un programa de dosis múltiple. Un programa de dosis múltiple es uno en el que un ciclo primario de tratamiento puede ser con más de una dosis separada, por ejemplo 1-10 dosis, seguido por otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores según se necesite para mantener o reforzar la acción de las composiciones. El tratamiento puede implicar dosis diarias o de múltiples días del (de los) compuesto(s) durante un periodo de algunos días a meses, o incluso años. Así, la pauta de dosificación se determinará, por tanto, al menos en parte, basándose en las necesidades particulares del sujeto que se va a tratar y dependerá del criterio del médico que administra.

Las dosificaciones típicas de los anticuerpos o conjugados pueden variar desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 30 mg/kg, tal como desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mg/kg.

En ejemplos particulares, el sujeto se administra con una composición terapéutica que incluye uno o más de los conjugados, anticuerpos, composiciones, CARs, linfocitos T con CAR o agentes adicionales, en un programa de administración de múltiples días, tal como al menos dos días consecutivos, 10 días consecutivos, etc., por ejemplo durante un periodo de semanas, meses, o años. En un ejemplo, el sujeto se administra con los conjugados, anticuerpos, composiciones o agentes adicionales durante un periodo de al menos 30 días, tal como al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 24 meses, o al menos 36 meses.

En algunas realizaciones, los métodos desvelados incluyen proporcionar cirugía, radioterapia y/o agentes quimioterapéuticos al sujeto en combinación con un anticuerpo desvelado, fragmento de unión al antígeno, conjugado, CAR o linfocito T que expresa un CAR (por ejemplo, secuencialmente, sustancialmente simultáneamente, o simultáneamente). Los expertos en la técnica conocen los métodos y las dosificaciones terapéuticas de dichos agentes y tratamientos, y se pueden determinar por un profesional clínico experto. La preparación y los programas de administración del agente adicional se pueden usar según las instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el médico habitual. La preparación y los programas de administración de tal quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service*, (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

En algunas realizaciones, la terapia de combinación puede incluir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del cáncer adicional a un sujeto. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar con la terapia de combinación incluyen agentes de unión a microtúbulos, intercaladores o reticulantes de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores de enzimas, reguladores génicos e inhibidores de la angiogénesis. Estos agentes (que se administran a una cantidad terapéuticamente eficaz) y los tratamientos se pueden usar solos o en combinación. Por ejemplo, se puede administrar cualquier agente anticancerígeno o antiangiogénico adecuado en combinación con los CARs, linfocitos T con CAR, anticuerpos, fragmento de unión al antígeno, o conjugados desvelados en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen los métodos y las dosificaciones terapéuticas de dichos agentes, y se pueden determinar por un profesional clínico experto.

Los agentes quimioterapéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas (por ejemplo, clorambucilo, clorometina, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, fotemustina, lomustina y estreptozocina), compuestos de platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y BBR3464), busulfán, dacarbazina, mecloretamina, procarbazona, temozolomida, tiotepa y uramustina; antimetabolitos, tales como ácido fólico (por ejemplo, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed), purina (por ejemplo, cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina y tioguanina), pirimidina (por ejemplo, capecitabina), citarabina, fluorouracilo y gemcitabina; alcaloides de las plantas, tales como Podophyllum (por ejemplo, etopósido y tenipósido), taxano (por ejemplo, docetaxel y paclitaxel), vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina); antibióticos citotóxicos/antitumorales, tales como miembros de la familia de las antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona y valrubicina), bleomicina, rifampicina, hidroxiaurea y mitomicina; inhibidores de la topoisomerasa, tales como topotecán e irinotecán; anticuerpos

monoclonales, tales como alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, rituximab, panitumumab, pertuzumab y trastuzumab; fotosensibilizadores, tales como ácido aminolevulínico, metilaminolevulinato, porfimer sodio y verteporfina; y otros agentes, tales como alitretinoína, alretamina, amsacrina, anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa, axitinib, bexaroteno, bevacizumab, bortezomib, celecoxib, denileukin difitox, erlotinib, estramustina, gefitinib, hidroxycarbamida, imatinib, lapatinib, pazopanib, pentostatina, masoprocol, mitotano, pegaspargasa, tamoxifeno, sorafenib, sunitinib, vemurafinib, vandetanib y tretinoína. Los expertos en la técnica conocen la selección y las dosificaciones terapéuticas de dichos agentes, y se pueden determinar por un profesional clínico experto.

La terapia de combinación puede proporcionar sinergia y demuestra ser sinérgica, es decir, el efecto logrado cuando los principios activos usados juntos es mayor que la suma de los efectos que resulta de usar los compuestos por separado. Se puede obtener un efecto sinérgico cuando los principios activos son: (1) co-formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministran en alternancia, se puede obtener un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, por diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la alternancia, se administra secuencialmente una dosificación eficaz de cada principio activo, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, se administran juntas dosificaciones eficaces de dos o más principios activos.

En una realización, se administra una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a uno o más de los antígenos desvelados en el presente documento o un conjugado del mismo a un sujeto que tiene un tumor tras el tratamiento contra el cáncer. Después de que haya transcurrido una cantidad suficiente de tiempo para permitir que el anticuerpo administrado o fragmento de unión al antígeno o conjugado forme un inmunocomplejo con el antígeno expresado sobre la célula cancerosa respectiva, se detecta el inmunocomplejo. La presencia (o ausencia) del inmunocomplejo indica la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, un aumento en el inmunocomplejo en comparación con un control tomado antes del tratamiento indica que el tratamiento no es eficaz, mientras que una disminución en el inmunocomplejo en comparación con un control tomado antes del tratamiento indica que el tratamiento es eficaz.

F. Composiciones biofarmacéuticas

Se proporcionan composiciones biofarmacéuticas o biológicas (en lo sucesivo, "composiciones") en el presente documento para su uso en terapia génica, inmunoterapia y/o terapia de células que incluyen uno o más de los CARs desvelados, o linfocitos T que expresan un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, conjugados, CARs, o linfocitos T que expresan un CAR que se unen específicamente a uno o más antígenos desvelados en el presente documento, en un vehículo (tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable). Las composiciones se pueden preparar en formas farmacéuticas unitarias para administración a un sujeto. La cantidad y el momento exacto de la administración son a criterio del profesional clínico que trata para lograr el resultado deseado. Las composiciones se pueden formular para administración sistémica (tal como intravenosa) o local (tal como intratumoral). En un ejemplo, se formula un CAR desvelado, o linfocitos T que expresan un CAR, anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, conjugado, para administración parenteral, tal como administración intravenosa. Las composiciones que incluyen un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, como se desvelan en el presente documento son de uso, por ejemplo, para el tratamiento y la detección de un tumor, por ejemplo, y no a modo de limitación, un neuroblastoma. En algunos ejemplos, las composiciones son útiles para el tratamiento o la detección de un carcinoma. Las composiciones que incluyen un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno como se desvela en el presente documento, también son de uso, por ejemplo, para la detección de angiogénesis patológica.

Las composiciones para administración pueden incluir una disolución del CAR, o linfocito T que expresa un CAR, conjugado, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas disoluciones son estériles y, en general, están libres de materia no deseable. Estas composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como ajuste de pH y agentes de tamponamiento, agentes de ajuste de la toxicidad, agentes adyuvantes, y similares, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o conjugado en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del sujeto. Se conocen métodos reales de preparación de dichas formas farmacéuticas para su uso en una terapia génica, inmunoterapia y/o terapia de células, o serán evidentes para los expertos en la técnica.

Una composición típica para administración intravenosa incluye aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o conjugado por sujeto por día (o la dosis correspondiente de un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, conjugado que incluye el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno). Los métodos reales de preparación de las composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los

expertos en la técnica y se describen con más detalle en dichas publicaciones como Remington's Pharmaceutical Science, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995).

Un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, o conjugados, se puede proporcionar en forma liofilizada y se rehidrata con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en disoluciones estériles de concentración conocida. Los CARs, o linfocitos T que expresan un CAR, disolución de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o conjugado, se añaden entonces a una bolsa de infusión que contiene 0,9 % de cloruro sódico, USP, y en algunos casos se administra a una dosis de desde 0,5 hasta 15 mg/kg de peso corporal. Está disponible experiencia considerable en la técnica en la administración de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno y fármacos conjugados; por ejemplo, se han comercializado fármacos de anticuerpo en EE. UU. desde la autorización de RITUXAN® en 1997. Se puede administrar un CAR, o linfocito T que expresa un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno y conjugados del mismo por infusión lenta, en vez de en una inyección intravenosa lenta o inmediata. En un ejemplo, se administra una dosis de carga más alta, siendo administradas dosis de mantenimiento posteriores a un nivel más bajo. Por ejemplo, se puede infundir una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (o la dosis correspondiente de un conjugado que incluye el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno) durante un periodo de unos 90 minutos, seguido por dosis semanales de mantenimiento durante 4-8 semanas de 2 mg/kg infundidas durante un periodo de 30 minutos si la dosis previa fue bien tolerada.

Se pueden preparar formulaciones parenterales de liberación controlada como implantes, inyecciones aceitosas, o como sistemas en partículas. Para una amplia visión general de sistemas de administración de proteínas véase, Banga, A.J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Los sistemas en partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, tal como una citotoxina o un fármaco, como un núcleo central. En las microesferas, el terapéutico se dispersa en toda la partícula. Partículas, microesferas y microcápsulas más pequeña de aproximadamente 1 µm, en general, se denominan nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm de manera que solo las nanopartículas se administran por vía intravenosa. Las micropartículas normalmente tienen alrededor de 100 µm de diámetro y se administran por vía subcutánea o por vía intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 219-342 (1994); y Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 315-339, (1992).

Se pueden usar polímeros para la liberación controlada de iones de los CARs, o linfocitos T que expresan un CAR, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno o composiciones de conjugado desveladas en el presente documento. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en la administración controlada de fármacos (Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-542, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, poloxamer 407, existe como un líquido viscoso aún móvil a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a temperatura corporal. Se ha mostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y administración sostenida de interleucina-2 recombinante y ureasa (Johnston et al., Pharm. Res. 9:425-434, 1992; y Pec et al., J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58-65, 1990). Alternativamente, se ha usado hidroxiapatita como un microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., Int. J. Pharm. 112:215-224, 1994). En otro aspecto más, se usan liposomas para la liberación controlada, así como el direccionamiento de fármacos del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri et al., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la liberación controlada de proteínas terapéuticas (véase la patente de EE. UU. Nº 5.055.303; la patente de EE. UU. Nº 5.188.837; la patente de EE. UU. Nº 4.235.871; la patente de EE. UU. Nº 4.501.728; la patente de EE. UU. Nº 4.837.028; la patente de EE. UU. Nº 4.957.735; la patente de EE. UU. Nº 5.019.369; la patente de EE. UU. Nº 5.055.303; la patente de EE. UU. Nº 5.514.670; la patente de EE. UU. Nº 5.413.797; la patente de EE. UU. Nº 5.268.164; la patente de EE. UU. Nº 5.004.697; la patente de EE. UU. Nº 4.902.505; la patente de EE. UU. Nº 5.506.206; la patente de EE. UU. Nº 5.271.961; la patente de EE. UU. Nº 5.254.342 y la patente de EE. UU. Nº 5.534.496).

G. Kits

En un aspecto, también se proporcionan kits que emplean los CARs desvelados en el presente documento. Por ejemplo, kits para tratar un tumor en un sujeto, o preparar un linfocito T con CAR que expresa uno o más de los CARs desvelados en el presente documento. Los kits normalmente incluirán un anticuerpo desvelado, fragmento de unión al antígeno, conjugado, molécula de ácido nucleico, CAR o linfocito T que expresa un CAR como se desvela en el presente documento. Se pueden incluir en el kit más de uno de los anticuerpos desvelados, fragmentos de unión al antígeno, conjugados, moléculas de ácidos nucleicos, CARs o linfocitos T que expresan un CAR.

El kit puede incluir un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente normalmente contiene una composición que incluye uno o más de los anticuerpos desvelados, fragmentos de unión al antígeno, conjugados, moléculas de ácidos nucleicos, CARs o linfocitos T que expresan un CAR. En varias realizaciones, el recipiente puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón

perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Una etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección particular.

La etiqueta o prospecto incluirá normalmente además instrucciones para el uso de un anticuerpo desvelado, fragmentos de unión al antígeno, conjugados, moléculas de ácidos nucleicos, CARs o linfocitos T que expresan un CAR, por ejemplo, en un método de tratamiento o prevención de un tumor o de preparación de un linfocito T con CAR. El prospecto incluye normalmente instrucciones habitualmente incluidas en paquetes comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de dichos productos terapéuticos. Los materiales didácticos pueden estar escritos, en una forma electrónica (tal como un disquete de ordenador o disco compacto), o pueden ser visuales (tales como archivos de vídeo). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que se diseña el kit. Así, por ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios de detección de un marcador (tal como sustratos de enzima para marcas enzimáticas, conjuntos de filtros para detectar marcadores fluorescentes, marcadores secundarios apropiados tales como un anticuerpo secundario, o similares). Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos rutinariamente usados para la práctica de un método particular. Dichos kits y contenidos apropiados se conocen bien por los expertos en la técnica.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos, que no se deben interpretar de ningún modo como limitaciones de imposición al alcance de la misma. Por el contrario, se debe entender claramente que se puede recurrir a diversas otras realizaciones, modificaciones, y equivalentes de la misma que, después de leer la descripción en el presente documento, pueden sugerir ellas mismas a los expertos en la técnica sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1

Receptores de antígeno quimérico que contienen dominios transmembranarios de TNFRSF

Se logró la generación de CARs con novedosas secuencias transmembranarias según el procedimiento descrito en el presente documento.

Se creó el casete de expresión del transgén para el CAR (genoma de vector) por síntesis *in vitro* de todo el marco de lectura abierto que codifica la unión al antígeno, conector, transmembrana y dominios de señalización de linfocitos T. Se crearon vectores de expresión de lentivirus (LV) que expresan los CARs por co-transfección de plásmidos que codifican el genoma de envoltura, auxiliar y vector en una línea celular productora y se recogieron y valoraron los sobrenadantes que contenían vector en una línea celular indicadora usando métodos convencionales para el cultivo de células de mamífero y la transfección de ADN. Entonces se usaron los sobrenadantes que contenían vector para transducir los linfocitos humanos primarios aislados de sangre periférica y la expresión del transgén codificado por CAR se demostró por análisis de citometría de flujo de la población de linfocitos T transducidos. Entonces se probaron las poblaciones de linfocitos que expresan CAR en ensayos funcionales. Para la producción de citocina, se co-cultivaron linfocitos T con CAR con la línea de células tumorales que expresan el antígeno relacionado. Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron por ensayo de ELISA a las 24 horas. Para citotoxicidad, se co-cultivaron las líneas de células tumorales con CAR-linfocitos T y se monitorizó el grado de muerte celular por análisis de citometría de flujo de la pérdida de integridad de la membrana en la población de células diana o activación bioquímica de vías de muerte celular.

Para la prueba de principio, cada CAR utilizó el motivo de señalización 4-1BB/cadena zeta de CD3 y el motivo de unión anti-CD19 derivado de FMC63 y se caracterizó el conector derivado de CD8 y el dominio transmembranario de CD8 (véase la Figura 2 y Figura 4 (a)), el conector de CD8 y la transmembrana de CD4 (véase la Figura 2 y Figura 4 (b)), conector y dominios transmembranarios de TNFRSF 19 (véase la Figura 2 y Figura 4 (c)), o un conector de CD8 expresado y las regiones transmembranarias de TNFRSF19 (véase la Figura 2 y Figura 4 (d)).

Los restos de núcleo que definen el motivo transmembranario de TNFRSF 16 y TNFRSF 19 en comparación con los motivos transmembranarios presentes en las proteínas CD4 y CD8a humanas revelan la presencia de un patrón de núcleo de homología de secuencias que los inventores reivindican que está asociado con una actividad transductora de señales en CARs.

Se muestra en la Figura 1 un esquema de un receptor de antígeno quimérico que muestra la posición relativa del dominio transmembranario con respecto al dominio de unión al antígeno extracelular y el dominio de señalización intracelular.

Se muestran en la Figura 2 las secuencias de aminoácidos transmembranarios de CD8, CD4, TNFRSF16 y TNFRSF19 y ciertos motivos de aminoácidos transmembranarios importantes en TNFRSF16 y TNFRSF19. Se resaltan nueve características distintas en el encabezado de la Figura 2. Cada uno es un aminoácido codificado por el genoma humano en el contexto de una proteína transmembranaria de la membrana plasmática. Las abreviaturas de aminoácido usadas en el presente documento son según la Comisión Conjunta IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (JCBN). Las características se expresaron en dos agrupaciones. En la característica 1, 2 y 3, el

aminoácido está compuesto por I, A, o L dentro de los primeros 10 restos transmembranarios. La característica 2 es adyacente o un aminoácido retirado de la característica 1 y es o una A o una I. La característica tres es o una L o una V y está separada un aminoácido de la característica 2. El segundo grupo de características empieza al menos en 5 pero no más de 10 aminoácidos de la característica 3. La característica 4, 5 y 6 son una cadena consecutiva de 3 aminoácidos compuesta por L o V. La característica 7 está alejada un aminoácido de la característica 6 y se compone únicamente de L. La característica 8 es adyacente a la característica 7 y está compuesta por una V o L. Esta característica falta en CD4. La característica 9 es adyacente a la característica 8 y está compuesta por una I o una A. La significancia de estas características es que forman una estructura secundaria única dentro de la membrana plasmática de la célula, permite la transducción óptima de señales y la posterior activación de linfocitos T por el receptor de antígeno quimérico (CAR).

EJEMPLO 2

Linfocitos T que expresan receptores quiméricos presentan actividad superficial y citolítica de alta expresión

Se expresaron los CARs desvelados en el presente documento a un alto nivel en la línea celular Raji. Las células que expresan el CAR tuvieron una alta tasa de proliferación, produjeron grandes cantidades de citocinas, y tuvieron una alta actividad citotóxica contra una célula que tiene, sobre su superficie, un antígeno al que se une un CAR.

Para demostrar la actividad citolítica de los motivos transmembranarios identificados, se crearon receptores de antígeno quimérico que incluían una porción de los dominios transmembranarios de TNFRSF 19 o transmembranarios y de conector como se representa en la Figura 3.

Se construyeron vectores de expresión de lentivirus (LV) que expresaban los CARs que utilizan el motivo de señalización de 4-1BB/cadena zeta de CD3 y el motivo de unión anti-CD19 derivado de FMC63 que caracterizaron o el conector derivado de CD8 y el dominio transmembranario de CD8 (véase la Figura 2 y Figura 4 (a), LTG1494, círculos negros representados en la Figura 5), el conector de CD8 y transmembrana de CD4 (véase la Figura 2 y Figura 4(b), LTG1562, cuadrados blancos representados en la Figura 5), conector y dominios transmembranarios de TNFRSF19 (véase la Figura 2 y Figura 4 (c), LTG1564, estrella representada en la Figura 5), o un conector de CD8 expresado y regiones transmembranarias de TNFRSF19 (véase la Figura 2 y Figura 4 (d), LTG1563, círculo blanco representado en la Figura 5) por los métodos descritos en el Ejemplo 1 arriba.

a) Ensayo de citólisis de CARs

Entonces se probaron los CARs en un ensayo de citólisis que implicó una línea celular Raji (CCL-86 de ATCC) que se transdujo con un LV que codifica luciferasa (Raji-luc). El cultivo Raji-luc y el ensayo de citólisis en sí mismo se llevan a cabo en medio RPMI-1640 que contiene 10 % de suero bovino fetal en condiciones de cultivo de tejido convencionales. La adición de un sustrato de luciferasa permite que el número de células Raji viables sea medido con exactitud en cada pocillo de una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos que contiene un número constante de células diana. Los linfocitos T con CAR se generaron por estimulación con perlas anti-CD3/CD28 (TransACT, Miltenyi Biotec) en condiciones sin suero en medio TexMACS (Miltenyi Biotec) que contenía IL-2. Se activaron células durante 3 días, se expusieron a LV y se cultivaron durante hasta 10 días adicionales. La determinación de la actividad citolítica de linfocitos T que expresan CAR se llevó a cabo por co-incubación de Raji-luc con linfocitos T activados (control), linfocito T activado que expresa una proteína de control codificada por LV (control de LNGFR), o un LV que codifica un CAR específico para un antígeno de superficie celular presente en Raji-luc (en este caso CD19). El aumentar el número de CAR-linfocitos T efectores por pocillo permitió probar diferentes relaciones entre efectoras y diana. Se determinó Raji-luc viable al final de un periodo de co-incubación de 24 horas añadiendo sustrato de luciferasa y midiendo la emisión de luz en un lector de placas. La citotoxicidad se cuantificó como un porcentaje de la señal de luciferasa de Raji-luc viable por pocillo sin linfocitos T en comparación con Raji-luc co-incubado con CAR-linfocitos T.

b) Ensayo de expresión de la superficie celular de CARs

Entonces se probaron los CAR-linfocitos T en un ensayo de expresión de la superficie celular basado en citometría de flujo que implicó la exposición a proteína L biotinilada, que se une al dominio derivado de la cadena ligera del aspecto extracelular de CARs. La cantidad de proteína L biotinilada que se une al dominio de CAR se determinó por tinción secundaria con avidina conjugada con ficoeritrina (PE). Se usó el porcentaje de células individuales que se tiñen positivamente para la unión de proteína L como se ha determinado por la señal de PE en un citómetro de flujo MACS-Quant para calcular la expresión de CAR.

c) Ensayo de citólisis de CARs

Se demostró una alta actividad lítica inesperada de los CARs que contienen TNFRSF cuando se crearon vectores de expresión de lentivirus (LV) que expresan los siguiente CARs y se probaron para actividad antileucémica (véase la Figura 5).

Cada CAR experimental contiene el motivo de señalización de 4-1BB/cadena zeta de CD3 y el motivo de unión anti-CD19 derivado de FMC63. El CAR-T que caracteriza un conector derivado de CD8 y dominio transmembranario de

CD8 (véase la Figura 4, LTG1494, círculos negros) mostró una fuerte actividad lítica en las relaciones entre efectoras y diana (E:D) enumeradas en el eje x. CAR-T que expresa el conector de CD8 y la transmembrana de CD4 (véase la Figura 4, LTG1562, cuadrado blanco) o el conector y los dominios transmembranarios de TNFRSF19 también mostraron actividad lítica apreciable (véase la Figura 4, LTG1564, estrella). Sorprendentemente, se encontró que se observó actividad lítica muy fuerte cuando se probó el CAR-T que contiene un conector de CD8 expresado y las regiones transmembranarias de TNFRSF19 (véase la Figura 4, LTG1563, círculo blanco).

En este análisis, aunque se observó alta actividad citolítica por el dominio transmembranario de TNFRSF19 que contiene CARs, también hubo una marcada diferencia entre los diferentes formatos, mostrando LTG1563 (que contiene conector de CD8 y transmembrana de TNFRSF19) tanto una fuerte actividad lítica como una alta expresión superficial de linfocitos T transducidos por LV.

Como hubo alta conservación de aminoácidos entre las regiones transmembranarias de TNFRSF16 y TNFRSF19 en la región conservada como se representa en la Figura 2, un conector de CD8 expresado que contiene CAR-T y regiones transmembranarias de TNFRSF16 también presentó actividad citolítica muy fuerte cuando se probaron el conector de CD8 expresado por CAR-T y las regiones transmembranarias de TNFRSF16.

d) Ensayo de expresión de la superficie celular de CARs

Se ha demostrado que la expresión de la superficie celular de CAR en la membrana plasmática de linfocitos T también fue un parámetro importante requerido para la robusta actividad de poblaciones celulares terapéuticas que expresan CARs. Se detectó la expresión de la superficie celular del CAR sobre la membrana plasmática de linfocitos T por análisis de citometría de flujo.

El análisis de expresión de la superficie celular (como se determinó por análisis de citometría de flujo) usó tinción fluorescente indirecta de proteína L unida al dominio de unión derivado de Ig del CAR de linfocitos T transducidos con los vectores de expresión de lentivirus (LV). Los resultados que mostraron la expresión de los CARs utilizando el motivo de señalización de 4-1BB/cadena zeta de CD3 y el motivo de unión anti-CD19 derivado de FMC63 caracterizó o el conector derivado de CD8 y el dominio transmembranario de CD8 (véase la Figura 4 (a)), el conector de CD8 y la transmembrana de CD4 (véase la Figura 4 (b)), el conector de TNFRSF19 y los dominios transmembranarios (véase la Figura 2 y Figura 4 (c)), o un conector de CD8 expresado y regiones transmembranarias de TNFRSF19 (véanse la Figura 4 (d)) construidas por los métodos descritos en el Ejemplo 1, arriba, se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Los resultados de la expresión de la superficie celular de los CARs que contienen el dominio transmembranario de TNFRSF se representan en la Tabla 2. El nivel de expresión de la superficie celular para cada dominio de CAR se determinó por análisis de citometría de flujo de linfocitos T transducidos por LV usando proteína L biotinilada y ficoeritrina conjugada con estreptavidina (PE). El CAR que contiene el dominio transmembranario de TNFRSF19 (LTG1564) presentó expresión superficial alta en comparación con un CAR de LNGFR-mCherry (LTG1541) que expresa una proteína de control (LNGFR-mCherry) y no tiene expresión superficial o actividad citolítica (véase Ejemplo 1, Figura 5 y tabla 2).

La Tabla 2 a continuación representa el resumen de los resultados de la expresión citolítica y superficial de CARs que contienen el dominio de TNFRSF. Los linfocitos T humanos activados no recibieron LV (Simulación) o se transdujeron con LV que codifica las siguientes combinaciones conector y dominios transmembranarios (Conector TM): transmembrana de CD8 y dominio de conector (LTG1494), conector de CD8 y transmembrana de CD4 (LTG1562), región conectora de CD8 y transmembrana de TNFRSF19 (LTG1563), conector de TNFRSF19 y dominios transmembranario de TNFRSF19 (LTG1564). LTG1541 expresa una proteína de control (LNGFR-mCherry) y no tiene actividad citolítica. Se determinó la expresión de actividad citolítica usando la línea celular Raji, Figura 4. El nivel de expresión para cada dominio de CAR se determinó por análisis de citometría de flujo de linfocitos T transducidos por LV usando proteína L biotinilada y ficoeritrina conjugada con estreptavidina (PE).

Tabla 2. Resumen de la expresión citolítica y superficial del dominio de TNFRSF que contiene CARs.

	Conector_TM	Expresión	Citolisis
Simulación	Ninguno	n/a	ninguno
LTG1541	LNGFR	Alta	ninguno
LTG1494	CD8_CD8	Alta	Alta
LTG1562	8_4	Med	Alta
LTG1563	8_TNFRSF	Alta	Alta
LTG1564	TNFRSF_TNFRSF	Baja	Alta

El conector de CD8 expresado que contiene CAR-T y las regiones transmembranarias de TNFRSF16 presentaron alta expresión de la superficie celular en comparación con el control de CAR de LNGFR-mCherry (LTG1541).

EJEMPLO 3

5 **La utilización conector y/o dominios transmembranarios derivados de miembros de TNFRSF permite el ajuste de la función antitumoral de CAR-T.**

En este ejemplo, se demuestra la inesperada superioridad de TNFRSF 19 y TNFRSF9 al dominio transmembranario codificado por CD8. En los ensayos de destrucción tumoral basados en CAR19, y en la inducción de citocinas IFN gamma, TNF alfa, IL-2 y de GM-CSF *in vitro* tras el co-cultivo con células diana de tumor, ambos demostraron ser superiores. Además, se demuestra que el CAR19 derivado de TNFRSF 19 es superior al CAR19 transmembranario de CD8 en la eliminación de un linfoma de Raji-Burkitt establecido en un modelo de ratón de leucemia humana. Y, lo que es más importante, la incorporación del dominio transmembranario derivado de TNFRSF16 (también conocido como LNGFR, receptor de neurotrofina de baja afinidad) en CAR19 bloqueó toda la actividad *in vitro* e *in vivo*, a pesar del alto nivel de expresión de CAR superficial en linfocitos T. Indicando así que no todas las regiones transmembranarias, incluso de proteínas en la misma superfamilia tales como TNFRSF, funcionan como componentes de un CAR.

Los novedosos resultados demuestran que el dominio transmembranario de CAR desempeña una función en la función de CAR-T más allá de una simple conexión entre los dominios extracelulares e intracelulares. Además, la magnitud de una respuesta de CAR-T puede ser potenciada o inhibida usando novedosos dominios transmembranarios.

20 **Materiales y métodos**

(a) Líneas celulares (CMSP y dianas)

Todas las líneas celulares y reactivos se compraron de la Colección Americana de Cultivo de Tejido (ATCC, Manassas, VA), a menos que se indique lo contrario. Las líneas celulares Raji y K562 se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor y glutamina 2 mM. Se propagó la línea celular 293T de riñón embrionario humano en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10 % de FBS inactivado por calor.

Se generaron clones de una sola célula de líneas celulares que expresan luciferasa transduciendo establemente líneas tumorales no mutantes con vector lentiviral que codifica luciferasa de luciérnaga (Lentigen Technology, Inc., Gaithersburg, MD), seguido por la clonación y selección de clones positivos para luciferasa. Se generó la línea Raji-luc adaptada al ratón por injerto de un clon de Raji que expresa establemente luciferasa de luciérnaga en ratones NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ), The Jackson Laboratory Sacramento, CA), aislando las células tumorales Raji-luc injertadas de los bazos de ratón por o selección positiva (CD19 microBeads, humanas, Miltenyi Biotec) o negativa (kit de agotamiento de células de ratón, Miltenyi Biotec), expandiendo en cultivo, y re-clonando para facilitar la selección de clones con alta expresión de luciferasa de luciérnaga.

35 Se recogió sangre completa de voluntarios sanos en el Oklahoma Blood Institute (OBI) con el consentimiento por escrito de los donantes. Se purificaron linfocitos T humanos CD4-positivo y CD8-positivo de capas leucocíticas por selección positiva usando una mezcla 1:1 de CD4- y CD8- MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, FRG) según el protocolo del fabricante.

(b) Creación de receptor de antígeno quimérico (CAR) - vectores de expresión

40 Se derivaron de dominios de unión al antígeno de CAR, scFv, secuencias del ratón hibridoma FMC-63 para CD19 (FMC-63: aa 1-267, GenBank ID: HM852952,1). Se generaron construcciones de CAR-T enlazando scFv de FMC63 en marco con el enlace diseñado y los dominios transmembranarios, y luego con el dominio de señalización de 4-1BB (CD137, aa 214-255, ID de secuencia de UniProt Q07011) y dominio de señalización de CD3 zeta (CD247, aa 52-163, ID de secuencia de Ref: NP_000725.1). Se diseñó la construcción 1494 para aproximar la configuración de CAR de CD19 publicada (Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia, 2004, C Imai, K Mihara, M Andreansky, IC Nicholson, C-H Pui, TL Geiger, D Campana. Leukemia, 18:676-84) (denominado en la memoria descriptiva "1494"). La construcción 1494 incorpora el conector y los dominios transmembranarios derivados de la proteína CD8 alfa humana (ID de secuencia de UniProt P01732, aa 138-206). Se clonaron las secuencias de construcciones de CAR en un esqueleto de plásmido lentiviral de tercera generación (Lentigen Technology Inc., Gaithersburg, MD). Se generaron sobrenadantes que contenían vector lentivector (LV) por transfección transitoria de células HEK 293T y el vector se sedimentó por centrifugación de sobrenadantes que contenían vector lentiviral, y se almacenó a -80 °C.

(c) Transducción de linfocitos T primarios

55 Se purificaron linfocitos T primarios humanos de donantes normales de capas leucocíticas tras la selección de perlas inmunomagnéticas de células CD4+ y CD8+, se cultivaron en medio TexMACS complementado con 40 UI/mL de IL-

2 a una densidad de 0,3 y 2×10^6 células/mL, se activaron con reactivo CD3/CD28 MACS® GMP TransAct (Miltenyi Biotec) y se transdujeron en el día 3 con vectores lentivirales que codificaban construcciones de CAR en presencia de 10 µg/mL de sulfato de protamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante la noche, y los medios se intercambiaron en el día 4. En el día 5, los cultivos se transfirieron a medio TexMACS complementado con 200 UI/mL de IL-2, y se propagaron hasta la recogida en el día 10-13.

(d) *Ensayos de efectores inmunitarios (CTL y citocina)*

Para determinar la citotoxicidad mediada por células (ensayo CTL), 5.000 células diana transducidas establemente con luciferasa de luciérnaga se combinaron con linfocitos T con CAR en diversas relaciones entre efectoras y diana y se incubaron durante la noche. Se añadió reactivo SteadyGlo (Promega, Madison WI) a cada pocillo y se cuantificó la luminiscencia resultante como recuentos por segundo (CPS de muestra). Se usaron pocillos de solo diana (CPS máx) y pocillos de solo diana más 1 % de Tween-20 (CPS mín) para determinar el intervalo del ensayo. Se calculó el porcentaje de lisis específica como: $(1 - (\text{CPS de muestra} - \text{CPS mín}) / (\text{CPS máx} - \text{CPS mín}))$. Para los ensayos de liberación de citocinas, se combinaron células efectoras y diana en la relación 10:1 y se incubaron durante la noche. Se analizaron los sobrenadantes recogidos para las citocinas secretadas usando o el kit de matrices de perlas de citocinas humanas MACSplex (Miltenyi Biotec).

(e) *Transferencia Western*

Se lavaron dos veces en PBS frío (Lonza, Walkersville, MD) dos millones de linfocitos T con CAR, se lisaron en tampón RIPA frío que contenía una proteasa y mezcla de inhibidor de fosfatasa. El lisado se incubó a 4 °C durante 20 minutos, se sedimentó a 13000 RPM en una centrifugadora de mesa a 4 °C durante 10 min, y los sobrenadantes se recogieron y se congelaron a -20 °C. Las muestras se resolvieron sobre gel de SDS-PAGE al 4 %-12 % de gradiente en tampón MOPS (Thermo-Fisher Scientific, Grand Island, NY) según el protocolo del fabricante. Las proteínas se transfirieron a membrana de transferencia de nitrocelulosa de 0,45 micrómetros y se sondaron con anticuerpo contra CD3 zeta (clon ab40804, Abcam, Cambridge, MA). Las bandas se visualizaron usando el kit de reactivo Vectastain ABC-AMP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y las imágenes se capturaron en un sistema de obtención de imágenes Odyssey (LI-COR, Lincoln, Nebraska).

(f) *Análisis de citometría de flujo*

Para la tinción de células, se recogieron un millón de células transducidas con CAR-T del cultivo, se lavaron dos veces en tampón de tinción frío y se detectó la expresión superficial de CAR por tinción con conjugado de proteína L-biotina (disolución madre 1 mg/mL, 1:1000 de dilución, GenScript, Piscataway, NJ) durante 30 minutos a 4 °C, seguido por dos lavados y tinción con conjugado de estreptavidina-PE durante 30 minutos a 4 °C (disolución madre: 1,0 mL, 1:200 de dilución, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Se usaron células no transducidas como controles negativos. Se excluyeron células muertas en todos los estudios por tinción con 7AAD (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 200 µL de tampón de tinción antes del análisis cuantitativo por citometría de flujo.

Se llevó a cabo tinción específica de CAR-T incubando células con 1 µg/mL de péptido CD19 marcado con Fc durante 15 minutos a 4 °C, seguido por incubación con fragmento F(ab')₂ anti-Fc-AF647. El análisis de citometría de flujo se realizó en un analizador MACSQuant®10 Analyser (Miltenyi Biotec), y se generaron gráficos de alta resolución usando el software FlowJo (Ashland, OR).

(g) *Análisis in vivo de la actividad de CAR-T*

Todos los estudios en animales fueron autorizados por Jackson Laboratory Animal Care and Use Committee (Sacramento, CA). Se inyectaron medio millón de células Raji-luc adaptadas al ratón en la vena de la cola de ratones NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ). En el día 6 después de la inyección de Raji-luc, se midió el injerto del tumor por inyección i.p. de 150 mg/kg de luciferina y se obtuvieron imágenes 10 min después durante 40 segundos en un instrumento Xenogen IVIS-200 (Caliper Biosciences). Las imágenes se analizaron usando el software Living Imagen, versión 4.1 (Perkin Elmer), y se expresó el flujo de señal bioluminiscente para cada ratón como radiancia promedio (fotones por segundo por cm² por estereorradián). Los linfocitos T con CAR se administraron a ratones por inyección en la vena de la cola en el día 7. La obtención de imágenes se realizó en los días indicados tras la inyección para establecer la cinética de crecimiento tumoral y la erradicación por linfocitos T con CAR.

(h) *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó usando el software estadístico GraphPad Prism 7.01 (La Jolla, CA) como se indica en las leyendas de la figura.

Resultados

Para investigar la función de los dominios transmembranarios y de conector en la función de los linfocitos T con CAR, se incorporaron elementos transmembranarios y de conector derivados de miembros de proteína de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) en el diseño de CAR 19 (Figura 6 y Tabla 3).

Tabla 3 - Composición de construcciones de CAR

Número de construcción	dominio de scFv CD19	dominio de conector	dominio transmembranario	dominios de señalización
1562	FMC63	CD8	CD4	4-1BB/CD3z
1563	FMC63	CD8	TNFRSF 19	4-1BB/CD3z
1564	FMC63	TNFRSF19	TNFRSF19	4-1BB/CD3z
1712	FMC63	TNFRSF16	TNFRSF16	4-1BB/CD3z
1713	FMC63	TNFRSF19 truncado	TNFRSF 19	4-1BB/CD3z
1714	FMC63	*TNFRSF9	*TNFRSF9	4-1BB/CD3z
1494 (control positivo)	FMC63	CD8	CD8	4-1BB/CD3z
GFP (control negativo)	N/A	N/A	N/A	N/A

*Por favor, téngase en cuenta que TNFRSF9 es un nombre alternativo para CD137 (4-1BB)

La construcción 1494 se basó en secuencias publicadas y se usó como control positivo y comparador. La construcción 1494 comprende la secuencia de scFv anti-CD 19 murina, derivada del anticuerpo FMC63, unido en marco con el conector y dominio transmembranario de CD8-alfa humano (CD8-a), y el dominio de activación intracelular CD137 (4-1BB), seguido por el dominio de señalización de CD247 (CD3-zeta) como en Materiales y métodos. Para cada construcción de prueba, o el conector de CD8, el dominio transmembranario de CD8, o ambos, se sustituyeron con las secuencias alternativas como se describe en la Tabla 3. Para generar construcciones con dominios transmembranarios sustituidos, el dominio transmembranario de CD8 de la construcción 1494 se sustituyó con secuencias que forman la hélice transmembranaria en CD4, TNFRSF19, TNFRSF16, o TNFRSF9. Queda por esclarecer completamente la función de formación de enlaces disulfuro en la función de CART. Para cada diseño de conector novedoso, se redujo la complejidad estructural incorporando fragmentos cortos de los ectodominios nativos. Este enfoque dio lugar a las construcciones 1564, 1712, 1714, cuyos conectores contienen 4, 0 y 1 restos de cisteína, respectivamente. Para minimizar más las posibilidades de formación de enlaces disulfuro en la construcción 1564, se diseñó la construcción 1713 con un conector de TNFRSF19 truncado para incluir solo un resto de cisteína.

Para evaluar la expresión de construcciones de CAR19, cada construcción se produjo como un vector lentiviral (LV), y se transdujeron linfocitos T primarios humanos con LV como se describe en Materiales y métodos. En el día 10 después de la transducción, se analizaron los linfocitos T con CAR para la expresión superficial de CAR19 por citometría de flujo (Figura 6). Se evaluaron dos métodos de tinción distintos en paralelo para identificar el método más sensible y específico para la detección superficial de CAR19. La tinción de proteína L explota la afinidad de la proteína bacteriana L por todas las cadenas ligeras kappa de inmunoglobulina que comprenden scFv. La proteína L no puede así diferenciar la especificidad por antígenos diana de CAR, y frecuentemente muestra afinidad variable por diferentes CARTs. Por otra parte, la unión al péptido Fc de CD19 se basa en la unión del dominio scFv anti-CD 19 de CAR a la proteína CD19 diana en la superficie de linfocitos T. Así, la tinción con este reactivo es tanto específica de diana, como requiere la apropiada conformación de la unión de scFv. La tinción de proteína L demostró un grado variable de expresión de CAR T en las construcciones presentadas aquí, que varía desde 90,4 % para la construcción 1494 hasta 0,3 % para la construcción 1713 (Figura 6). Por el contrario, la tinción con el péptido CD19Fc dio mejor sensibilidad, y la expresión de CART varió desde 94,2 % - 6,86 %. Por tanto, la tinción de Fc de CD19 es más sensible que la tinción de la proteína L, es más uniforme, y evita el sesgo específico de la construcción. El análisis de citometría de flujo demuestra que todas las construcciones de CAR19 se expresan sobre la superficie de linfocitos T humanos transducidos con LV que codifica CAR.

Se validaron los datos de expresión de CAR de citometría de flujo por un método alternativo, transferencia Western, para también demostrar que las construcciones expresadas corresponden al peso molecular predicho. El análisis de transferencia Western demostró fuertes bandas para cada construcción probada cuando se sondaron con un anticuerpo anti-CD3 zeta, que también reveló una segunda banda fuerte para la cadena zeta de CD3 nativa de menor peso molecular (no ilustrada). Los lisados de linfocitos T transducidos con CAR se resolvieron sobre gel de SDS-PAGE desnaturalizante al 4-12 % y se sondaron con un anticuerpo para CD3 zeta. Se usaron los linfocitos T transducidos con GFP y los linfocitos T no transducidos (N.T.) como controles negativos. Se detectó CD3 zeta nativo en todas las muestras y tuvo un peso molecular aproximado de 16 kDa, como se predijo. Todas las construcciones de CAR-T produjeron bandas inmunorreactivas del peso molecular predicho de 58 kDa. Las bandas adicionales observadas en algunos de los carriles pueden representar modificaciones post-traduccionales de las proteínas de CAR-T, o dímeros no desnaturalizados residuales de CD3 zeta nativo (notable en las construcciones 1712, 1714). Y,

lo que es más importante, todas las construcciones de CAR-T dieron una banda del tamaño predicho de 58 kDa, corroborando así el hallazgo de que todos los CARs se expresaron en los linfocitos T primarios humanos.

Para determinar el potencial lítico de las construcciones de CAR-T, se empleó linfoma de Raji CD19-positivo, que expresó establemente luciferasa de luciérnaga, en un ensayo de destrucción *in vitro* (Figura 8). Los linfocitos T con CAR se combinaron con células Raji-Luc en las relaciones entre efectoras y diana de 5:1, 10:1 y 20:1 y se incubaron durante la noche en 96 pocillos, luego se recogieron los cultivos y se analizaron para la actividad de luciferasa residual, indicativa de las células tumorales de Raji vivas supervivientes. Se usaron dos líneas CD19-negativo que expresaban establemente luciferasa, K562 y 293T como controles negativos. Los resultados demuestran una clara clasificación de la potencia lítica dentro del LV de CAR19 probado. La construcción 1713 fue la más potente, seguida por 1562 y 1564. Mostrando las construcciones 1563, 1714 y el control positivo 1494 capacidad destructora similar. Inesperadamente, la construcción 1712 no tuvo actividad lítica específica contra células Raji, a pesar de los altos niveles de expresión (86,4 % y 86,9 % por proteína L y tinción de Fc de CD19, respectivamente). Similarmente, la GFP de control negativo no mostró lisis específica de la línea tumoral.

Entonces se midió la magnitud de la inducción de las citocinas de tipo I IFN gamma, IL-2, TNF alfa y GM-CSF en células CAR19 co-incubadas con el linfoma de Raji CD19-positivo. Se combinaron los linfocitos T con CAR y células Raji a la relación 10:1 entre efectoras y diana durante la noche, y se analizaron los sobrenadantes de cultivo por matriz de perlas humanas MACSPlex (Figura 9). Al igual que con el ensayo de destrucción *in vitro*, la inducción de citocinas siguió un claro orden numérico, dando la construcción 1713 las mayores concentraciones de citocinas inducidas, y las novedosas construcciones de dominio transmembranario que producen más citocinas que la construcción 1494 de control, la construcción no lítica 1712 y la GFP de control negativo.

Entonces se midió la actividad antitumoral de las novedosas construcciones de dominio transmembranario de CAR19 *in vivo* (Figura 10). Se implantaron los ratones NSG con células tumorales Raji-luc en el día 0. Entonces, en el día 6 se verificó el injerto de tumor por imágenes de bioluminiscencia. Se aleatorizaron los ratones para obtener grupos con carga tumoral similar, y se inyectaron linfocitos T con CAR que llevan novedosos dominios transmembranarios, CAR 1563, o CAR 1712, o CAR1494 de control positivo, o linfocitos T transducidos con GFP de control negativo, en ratones en el día 7 de estudio. El grupo de solo tumor (sin linfocitos T) sirvió de control negativo adicional. Se realizaron semanalmente mediciones cinéticas de la carga tumoral hasta el día de estudio 32. Como demuestran los resultados de radiancia promediada en la Figura 10, la construcción de CAR 1712, que no mostró lisis tumoral o inducción de citocina en ensayos *in vitro*, también dejó de aliviar la carga tumoral de Raji en ratones NSG, y produjo radiancia promedio del tumor similar a los grupos de control negativo GFP y sin linfocitos T durante la evolución temporal de la medición. Además, la construcción de CAR19 1494 de control positivo fue capaz de reducir, pero no aliviar completamente, el crecimiento tumoral en este modelo de linfoma agresivo. Y, lo que es más importante, e inesperadamente, solo la novedosa construcción de dominio transmembranario 1563 fue capaz de controlar completamente el crecimiento tumoral de Raji a partir del día de estudio 18 y en adelante.

Para confirmar los resultados *in vivo* en la Figura 10, y descartar posible variabilidad entre donantes, se repitió el experimento del modelo de NSG con linfocitos T con CAR generados a partir de un donante humano diferente, usando el mismo protocolo experimental (Figura 11A). Aquí nuevamente, los ratones que llevan tumores Raji bioluminiscentes se trataron o con la construcción 1494, 1563, GFP, o sin linfocitos T. Como antes, la construcción 1563 solo fue capaz de controlar la progresión de tumores Raji. Es de notar que estos experimentos se llevaron a cabo con la línea celular Raji más resistente, a diferencia de la línea celular NALM-6 comúnmente usada en otros informes. Así, el ensayo empleado es mucho más riguroso y puede tener mayor potencia predictiva para enfermedad humana recidivante o resistente al tratamiento. Inesperadamente, en este experimento, la construcción 1494 de control positivo no fue capaz de reducir la carga tumoral de Raji por debajo del nivel de los controles negativos, GFP o el tratamiento "Sin linfocitos T" (Figura 11A). Además, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones en este experimento demuestra una diferencia significativa en la supervivencia entre la construcción 1563, y o 1494, o cualquiera de los dos controles negativos, como se ha determinado por la prueba de Mantel-Cox del orden logarítmico (Figura 11B). La mediana de la supervivencia fue: para la construcción 1563 - indeterminada (es decir, todos los ratones en este grupo sobrevivieron durante la duración del estudio), para el control negativo de GFP - 19 días, para el grupo "Sin tratamiento" - 20 días, y para la construcción 1494 - 24 días desde el día de estudio 0.

En conclusión, estos resultados han demostrado aquí que las novedosas construcciones de dominio transmembranario CAR19 pueden ser satisfactoriamente expresadas en linfocitos T primarios humanos, como se evidencia por citometría de flujo y transferencia Western. Además, los novedosos linfocitos T que llevan el dominio transmembranario CAR19 son funcionales *in vitro* y presentan un perfil funcional superior en comparación con la construcción de control 1494. Por consiguiente, la novedosa construcción transmembranaria 1563 rindió coherentemente mejor que el control positivo (construcción 1494) en controlar los tumores de linfomas Raji diseminados establecidos en el modelo de NSG de ratón en dos estudios *in vivo* independientes, que emplean linfocitos T con CAR que se originan a partir de dos donantes humanos separados. Estos hallazgos demuestran la superioridad de varias construcciones de CAR19 que incorporan dominios transmembranarios y/o de conector derivados de TNFRSF, en particular, 19 y 9, con respecto a la construcción de CAR19 previamente descrita basada en el dominio transmembranario de CD8-a y los dominios de conector (es decir, construcción de CAR 1494). Inesperadamente, la construcción 1712 en la que se usaron los dominios transmembranarios y de conector de TNFRSF 16 en lugar de las secuencias de CD8a no demostró ni actividad citolítica ni inducción de citocinas *in vitro*,

y fue ineficiente en controlar tumores *in vivo*, a pesar de ser altamente expresados en linfocitos T. Por tanto, la mejora de la función de CAR19 por sustitución de dominios de conector o transmembranarios era un resultado inesperado que indica que no todas las regiones transmembranarias se comportan coherentemente a través de todas las glucoproteínas transmembranarias de tipo I y tipo II, incluso dentro de un único sub-tipo de superfamilia tal como TNFRSF, para producir un CAR funcional que presenta actividad *in vitro* y *in vivo*.

La descripción anterior de algunas realizaciones específicas proporciona información suficiente que otros pueden, aplicando el actual conocimiento, modificar o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones de dichas realizaciones específicas sin apartarse del concepto genérico y, por tanto, dichas adaptaciones y modificaciones deben y pretenden estar comprendidas dentro del significado e intervalo de los equivalentes de las realizaciones desveladas. Se debe entender que la fraseología o terminología empleada en el presente documento es con el fin de descripción y no de limitación. En los dibujos y la descripción, se han desvelado realizaciones a modo de ejemplo y, aunque se pueden haber empleado términos específicos, se usan, a menos que se establezca de otro modo, en un sentido genérico y descriptivo solo y no para fines de limitación, no estando así, por tanto, limitado el alcance de las reivindicaciones. Además, un experto en la técnica apreciará que ciertas etapas de los métodos tratados en el presente documento se pueden secuenciar en orden alternativo o se pueden combinar las etapas. Por tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas no se limiten a la realización particular desvelada en el presente documento. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, usando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento. Dichos equivalentes están englobados por las siguientes reivindicaciones.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias presentado electrónicamente a la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos mediante un archivo PDF titulado "Listado de secuencias". El listado de secuencias se incorpora como referencia.

SECUENCIAS DE LA DIVULGACIÓN

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos enumeradas a continuación se muestran usando las abreviaturas de una letra estándar para bases de nucleótidos, y el código de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácidos nucleicos, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena presentada. En el listado de secuencias adjunto:

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de transmembrana de TNSRFS 16

accgataacctgattccgggtattgcagcattctggcggcgggtgggtggcctggg
gcglatattgcgtltaaacgctgg

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de transmembrana de TNSRFS 16:

TDNLIPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRW

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de transmembrana de TNSRFS 19

gataccgcgctggcggcgggtattgcagcgcgctggcggaccgtgctgctggcgtgctg
attctgtgcgtattatgcaaaccgag

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de transmembrana de TNSRFS 19

DTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQ

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos de la secuencia de péptidos líder/señal

atgctgctgctggtagaccagcctgctgctgctggaactgccgcatccggcgtttctgctgattccg

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia de péptidos líder/señal

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de TNFRSF19 LTG1563 (FIGURA 3D)

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgctggaactccgcatccggcgttctgctg
 affccggatattcagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctggcgatcgc
 gtgaccattagctgcccgcgagccagatattagcaatatctgaaactggtatcagcag
 aaaccggatggcaccgtgaaactgctgattatataccagccgctgcatagcggcgtg
 ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
 gaacaggaaatattgagacctattttgcccagcagggcaaacacctgcccgtatacctt
 ggccggcggcaccaaactggaattaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 ggccggcggcagcgaagtgaactgcaaggaaagcggcccggcctgggtggcggcggcggc
 agcctgagcgtgacctgaccgtgagcggcgtgagcctgcccggattatggcgtgagctgg
 attcggcagccggcgcgaaaggcctggaatgctggcgtgatttggggcagcgaaac
 acctattataacagcgcgctgaaaagccgctgaccattattaagataacagcaaaagc
 cagggtttctgaaaatgaacagcctgagaccgtagataccgctgattatttgcgcg
 aaacattattattggcggcagcctatgctgagatttggggccaggccaccagcgtg
 accgtgagcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 agccagccgctgagcctgcccggaaagcgtgcccggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 acccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gctg
 aaactgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
 gatggcctgagcctgcccgtlccggaagaagaagaaggcggcctgcaactgcgcgtgaaa
 tttagccgagcgcggatgcccggcgtatcagcagggccagaaccagctglalaacgaa
 ctgaacctggccggcggcgaagaatgatgctgctgataaacgcccggcggcggcggcggc
 gaaatggcggcgaaccggcggcgaaccggcggcgaaggcctgtataacgaactgcag
 aaagataaaatggcgaagcgtatagcgaattggcatgaaaggcgaaccggcggcggcggc
 aaaggccatgatggcctgctgagggcctgagcaccgcaacaaagatacctatgatgctg
 ctgcatatgcaggcgtgcccggcgc

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de TNFRSF19 LTG1563 (FIGURA 3D)

*MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLGD
 RVTISCRASQDISKYI.NWYQQKPDGTVKLLIYHTSRI.HSGVPSRF.SGSGS
 GTDYSLTISNLEQEDIAIFYFCQQGNTI.PYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
 GGGGSEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
 EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTYSSAAAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
 ACRPAAGGAVHTRGLDFDTALA AVICSALATVLLALLILCVIYCKRQPRR
 KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
 YQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQGLYN
 EL
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
 PR*

5 **SEQ ID NO: 9** es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF19-señales tm de TNFRSF19 LTG1564 (FIGURA 3E)

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactccgcatccggcgtttctgctg
 affccggatattcagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctggcgatcgc
 gtgaccattagctgcccgcgagccagatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
 aaaccggatggcaccgtgaaactgctgattatcataccagccgctgcatagcggcgtg
 ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
 gaacaggaagatattgcgacctattttgcccagcagggcaaacacctgcccgtataccttt
 ggcgcgccgaccacaaactggaaftaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggc
 ggcgcgccgagcgaagtgaactgcaaggaaagcggcccggcctgggtggcggcggcagccag
 agcctgagcgtgacctgaccgtgagcggcgtgagcctgcccggattatggcgtgagctgg
 attcgcagccggcggcgaaggcctggaatgctggcgctgatttggggcagcgaacc
 acctattataacagcgcgctgaaaagccgctgaccattattaagataacagcaaaagc
 caggtgtttctgaaaatgaacagcctgagaccgtagataccgcttattattgctgcg
 aaacattattattggcgcgagctatgctgagctgatttggggccagggcaccagcgtg
 accgtgagcagcgcggcggcgtggccttcaggatattgaaatgctgcccgtgcccgcgat
 ccgcccggcgtatgaaccgattgctgcgagcaaatgaaactggtgaaatgctgagc
 acccgagcagcccgcgataaccgctggcggcggcgtgattgagcgcgctggcggacc
 gtgctgctgctgctgctgallctgctgctgalltattgaaacgcccagccgcccga
 aaactgctglatatlllaaacagccgtttatgcccggctgagaccaccaggaagaa
 gatggctgagctgcccgtllccggaagaagaagaaggcggctgcaactgctgctgaaa
 tttagccgagcgcggatgcccggcglatcagcagggccagaaccagctglalaacgaa
 ctgaacctggcccggcgaagaatattgctgctgataaacgcccggcggcggcggatccg
 gaaatggcgccgcaaacggcggcgaaccccgaggaaggcctgtataacgaactgag
 aaagataaaatggcggaagcgtatagcgaatggcatgaaaggcgaacggcggcggc
 aaaggccatgatggcctgctatcagggcctgagcaccgcaacaaagatacctatgatgc
 ctgcatatgcagggcgtgcccggcgc

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF19-señales tm de TNFRSF19 LTG1564 (FIGURA 3E)

*MLLVTSLLLCELHPAFLFLIPDIQMTQTSSLSASLGD
 RVTISCRASQDISKYI.NWYQQKPDGTVKLLIYHTSRI.HSGVPSRF.SGSGS
 GTDYSLTISNLEQEDIAIYFCQQGNTI.PYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGS
 GGGGSEVKLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
 EWLGVIWGETTYNSALKSRLTHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDEAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTYSSAAAVGFQDMECVPCGDPPIPPYEPHC
 ASKVNLVKIASTASSPRDTALAAVICSALATVLLALLLILCVIYCKRQPRR
 KKLLEYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
 YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPMEGGKPRRKNPQEGLYN
 EL
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
 PR*

5 **SEQ ID NO.: 11** es la secuencia de nucleótidos de ADN dominio transmembranario de CD8

atctacatctggcgcccttggccgggactgtggtgctctcctgctcactggttatcaccctttactgc

SEQ ID NO. 12 es la secuencia de aminoácidos del dominio transmembranario de CD8

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 Val Ile Thr Leu Tyr Cys

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de nucleótidos de ADN dominio bisagra de CD8

accacgacgc cagcggcgcg accaccaaca ccggcggcca ccatcgcgctc gcagcccctg
 tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggcgtg
 gacttcgct gtgat

10

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos del dominio bisagra de CD8

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácidos 118 a 178 región bisagra de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP.sub.—001759.3)

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia de CL de IgG humana

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

5

SEQ ID NO 17 es la secuencia de nucleótidos de ADN dominio de señalización de 4-1BB

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaacaac catttatgag accagtacaa
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggagatgt
gaactg

SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos del dominio de señalización de 4-1BB

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

10

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de nucleótidos de ADN dominio de señalización de CD3-zeta

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg tttggacaa gagacgtggc
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaal
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttggatgaa aggcgagcgc
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctca gtacagccac caaggacacc
tacgacgcc ttacatgca ggccctgccc cctcgc

SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de CD3zeta

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

15

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos (ADN) SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD4 LTG1562

ES 2 778 651 T3

SEQ ID NO: 27 es la secuencia de nucleótidos de Scvf cd 19

gacatccaga tgacacagac facatectcc ctgctgcct ctctgggaga cagagtcacatcagttgca
gggcaagtca ggacattagt aatatlttaa atgggtatca gcagaaacca gatggaactg ttaaactct
gatctaccat acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat
tattctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg ccacttactt ttccaacag ggtaatacgc
ttccgtacac gttcggaggg gggaccaagc tggagatcac aggtggcggf ggctcgggcg gtegtgggtc
gggtggcggc ggatctgagg tgaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcggcctc acagagcctg
tccgtacat gcactgtctc aggggtcica ttaccgact atgggtgaag ctggattgc cagcctcac
gaaagggctt ggagtgctg ggagtaatat ggggtagtga aaccacatac tataattcag ctctcaaatc
cagactgacc atcatcaagg acaactccaa gagccaagtt ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaacatgat
gacacagcca ttfactactg tggcaaacat tattactacg gtggtagcta tgctatggac tactggggcc
aaggaaactc agtcaccgtc tctca

SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácidos de Scvf cd 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Ser 100 105
110 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly
Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu
Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser
Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

5

SEQ ID NO: 29 es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señalización tm de CD8
LTG1494 (FIGURA 3A)

atgctgctgctggtagaccgctgctgctgcaactgcccacatccggcgtttctgctg
attccggataccgataftcagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggg
gatccgctgaccattagctccgctgagccagcagatattagcaaatatctgaactggat
cagcagaaaccggatggcaccgtgaaactgctgattatcataccagcccctgcatagc
ggcgtgccgagccgcttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagc
aacctggaacaggaagatattgcaacctattttgccagcaggccaacaccctgccgtat
acctttggcggcggcaccaaactggaattaccggcagcaccagcggcagcggcaaacgg
ggcagcggcgaaggcagcaccaaaggcgaagtgaactgcaggaagcggcccgggcctg
gtggcggcggcagccagcctgagcctgacccctgagcggcgtgagcctgcccgat
tatggcgtgagctgattgccagcccgccgcaaaaggcctggaatggctggcgtgatt
tggggcagcgaaccacattataacagcgcctgaaaaggcctgaccattatataa
gataacagcaaaagccagggtttctgaaaatgaacagcctgagaccgatgaccgcg
atttattattgctgcaaacattattattgctgagcctatgctgattattggggc
cagggcaccagcgtgaccgtgagcagcgcggcggcaccaccaccccgccgcccggc
ccgaccccgccggaccattgagcagcccgctgagcctgcccgggaagcgtgcccg
ccggcggcggcggcggcggcgcatacccgccgctggaatttgcgtgataattatatt
tgggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
tgcaaacgcggccgcaaaaactgctgataatttaaacagccggttatgcccggctg
cagaccaccaggaagaagatggctgagcctgccccttccggaagaagaagaaggcggc
tgcaactgcgctgaaatitagccgagcgcggatgcccggcgtatcagcaggccag
aacagctgtataacgaactgaactggcggcggcggcgaagaatatgatgctggataaa
cgccgcccggcggatccggaatggcggcgaaccggcggcgaaaacccgcaggaaggc
ctgtataacgaactgcagaaagataaatggcggcgaagcgtatagcgaattgcatgaaa
ggcgaacggcggcggcgaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccggcacc
aaagatacctatgatgctgcatatgaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc

SEQ ID NO: 30 es la secuencia de aminoácidos de SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señalización tm de
CD8 LTG1494 (FIGURA 3A)

10

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIIPDIDIQMTQTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGPKLEITGTSGSGKPG
SGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR
KGLEWLVWVWSEETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDATAIYYC
AKHYIYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAATTTPA PRPPTPA PTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQL
YNE_LNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGEFRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR

SEQ ID NO: 31 es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD8 (LTI re-manipulado) (LTG1538) (FIGURA 3B)

atgctgctgctgctgaccagcctgctgctgctgcaactgccgcatccggcgtttctgctg
attccggatattcagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctggcgatcgcg
gtgaccattagctgcccgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
aaaccggatggcaccgtgaaactgctgattatataccagccgctgcatagcggcgtg
ccgagccgcttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
gaacaggaagatattgcgacctatfttccagcagggcaacacctgcccgtatataccttt
ggcggcggcaccaaactggaactaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcggcggc
ggcggcggcagcgaagtgaactgcaggaagcggcccgggcctggtggcggcggcggcggc
agcctgagcgtgacctgaccgtgagcggcgtgagcctgcccggatattgctgagcgtg
atgccagccgcccgaaggcctggaatggcctggcgtgattggggcagcgaacc
acctattataacagcgcctgaaaagccgctgacctattataaagataacagcaaaagc
caggtgttctgaaaatgacagcctgcagaccgatgataccgctgattattattgctg
aaacattattattggcggcagctatgcatgattattggggccagggcaccagcgtg
accgtgagcagcggcggcggcaccaccaccggcggcggcggcggcggcggcggcggc
accattgagcagccagccgctgagcctgcccgaagcgtgcccggcggcggcggcggc
gctgctgataccggcggcctggttggcgtgctgataattattggggcggcggcggcggc
ggcacctgcccgtgctgctgctgagcctggtgattaccctgattgcaaacggcggcggc
aaaaactgctgataattttaaacagccgttatgcccggcggcggcggcggcggcggc
gaagatgctgctgagcgtgcccgttccggaagaagaagaggcggcggcggcggcggcggc
aaatttagccgagcggatgcccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataac
gaactgaacctggcggcggcgaagaatgatgtgctgataaacggcggcggcggcggcggc
ccggaaatggcggcgaaccggcggcgaaaaaccgaggaaggcctgtataacgaactg
cagaagataaaatggcggcgaagcgtatagcgaatggcatgaaaggcgaaccggcggc
ggcaagccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccggcggcggcggcggcggcggc
gcgctgcatatgcaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc

5 SEQ ID NO: 32 es la secuencia de aminoácidos de SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD8 (LTI re-manipulado) (LTG1538) (FIGURA 3B)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIIPDIDIQMTQTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGPKLEITGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR
KGLEWLVWVWSEETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDATAIYYC
AKHYIYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAATTTPA PRPPTPA PTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQL
YNE_LNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGEFRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR

10 SEQ ID NO: 33 es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF16-señalización tm de TNFRSF16 (LTG1712) (FIGURA 4)

ES 2 778 651 T3

ATGGGAGCCGGAGCTACTGGACGCGCAATGGACGGACCGAGACTGCT
GCTTCTCCTTCTG
CTGGGCGTGTCCCTTGGCGGTGCCGATATCCAGATGACCCAGACAACC
TCGTCCCTGTCTG
GCCAGCCTGGGTGATCGCGTGACCATCTCGTGCCCGCGCAAGCCAGGAC
ATCTCAAAGTAT
CTGAACTGGTACCAACAAAAGCCCAGCGGGACTGTGAAGCTGCTGATC
TACCACACCTCC
CGACTCCATAGCGGAGTGCCAAGCCGATTCTCCGGTTCCGGCTCTGGA
ACCGATTACTCC
CTGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTTTGC
CAGCAGGGGAAC
ACCTGCCGTACACTTTCGGGGGTGGTACTAAGCTGGAAATCACCGGA
GGCGGAGGAAGC
GGAGGAGGCGGTTCCGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTGAAGCTGCAAGA
ATCCGGACCAGGC
TTGGTCGCCCCCTCCAAAGCCTGTCAGTGACTTGTACCGTGTCCGGGA
GTGTCGCTGCC
GACTACGGCGTGTCTGGATTAGACAGCCGCCGAGAAAGGGCCTGGA
GTGGCTGGGTGTC
ATTTGGGGCTCCGAAACCACCTACTACAACAGCGCCCTCAAGTCACGG
CTTACCATCATT
AAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTTCTCAAGATGAACAGCCTCCAG
ACCGACGACACC
GCCATCTACTACTGTGCTAAGCACTACTACTACGGGGGCTCCTACGCA
ATGGACTACTGG
GGTCAGGGCACCAGCGTGACCGTGTCTCCGAAGAGATCCCTGGCAGA
TGGATTACACGG
TCTACGCCTCCTGAAGGCTCGGACTCCACTGCCCCGAGCACTCAGGAA
CCGGAAGCCCCT
CCAGAACAGGACTTGATCGCGAGCACTGTGGCCGGGGTGGTCACTACT
GTCATGGGATCG
TCCCAACCTGTGGTGACCCGGGGTACCACTGACAACCTGATCCCCGTC
TACTGCTCGATT
CTCGCAGCCGTCGTGGTCCGGCTGGTGGCATATATCGCATTCAAGAGG
GGCCGGAAGAAG
CTGCTCTACATCTTCAAACAACCATTATGCGGCCGGTGCAGACTACC
CAGGAGGAGGAC
GGATGTTTCGTGCCGCTTCCCAGGAAGAGGAAGAGGGCGGATGCCAACT
GAGAGTCAAGTTC
TCGAGATCAGCGGATGCCCCGCTTACCAGCAGGGACAGAATCAGCTC
TATAACGAGCTG
AACCTTGCCGGCGGGAAGAGTACGATGTGCTGGATAAGAGAAGAGG
ACGCGATCCCGAG

ATGGGAGGAAAGCCTCGCCGGAAGAACCCGCAGGAAGGCCTGTACAA
CGAGCTTCAGAAG
GACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAAATCGGAATGAAGGGAGAACG
CAGGCGGGGAAA
GGCCACGATGGGCTCTACCAGGGTCTTAGCACCGCGACCAAGGACACC
TACGACGCCCTG
CATATGCAAGCGCTTCTCCACGC

SEQ ID NO: 34 es la secuencia de aminoácidos de SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF16-señalización tm de TNFRSF16 (LTG1712) (FIGURA 6)

ES 2 778 651 T3

MGAGATGRAMDGPRLLLLLLVSLGGADIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS
CRASQDISKY
LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI
ATYFCQQGN
TLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSV
TCTVSGVSLP
DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWVWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFL
KMNSLQTTDDT
AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSEEIPGRWITRSTPPEGSDST
APSTQEPEAP
PEQDLIASTVAGVTTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVVVGLVA
YIAFKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ
GQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
EIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 35 es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF19 truncado-
señalización tm de TNFRSF19 (LTG1713) (FIGURA 6)

ATGGCTCTGAAAGTGCTGTTGGAACAAGAAAAGACCTTCTTCACCTG
CTCGTGTGCTG
GGGTACCTGTCCTGCAAAGTCACCTGTGATATCCAGATGACCCAGACA
ACCTCGTCCCTG
TCGGCCAGCCTGGGTGATCGCGTGACCATCTCGTGCCGCGCAAGCCAG
GACATCTCAAAG
TATCTGAACTGGTACCAACAAAAGCCCGACGGGACTGTGAAGCTGCTG
ATCTACCACACC
TCCCGACTCCATAGCGGAGTGCCAAGCCGATTCTCCGGTTCCGGCTCT
GGAACCGATTAC
TCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTTT
GCCAGCAGGGG
AACACCCTGCCGTACACTTTCGGGGGTGGTACTAAGCTGGAAATCACC
GGAGGCGGAGGA
AGCGGAGGAGGCGGTTCCGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTGAAGCTGCA
AGAATCCGGACCA
GGCTTGGTCGCCCCCTCCCAAAGCCTGTCAGTGACTTGTACCGTGTGCG
GGAGTGTGCTG

CCCGACTACGGCGTGTCTGATTAGACAGCCGCCGAGAAAGGGCCTG
 GAGTGGCTGGGT
 GTCATTTGGGGCTCCGAAACCACCTACTACAACAGCGCCCTCAAGTCA
 CGGCTTACCATC
 ATTAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTCTCAAGATGAACAGCCTC
 CAGACCGACGAC
 ACCGCCATCTACTACTGTGCTAAGCACTACTACTACGGGGGCTCCTAC
 GCAATGGACTAC
 TGGGGTCAGGGCACCAGCGTGACCGTGTCTCCTACGAGCCTCACTGC
 GCCAGCAAAGTC
 AACTTGGTGAAGATCGCGAGCACTGCCTCGTCCCCTCGGGACTGCT
 CTGGCCGCCGTC
 ATTTGCTCGGCGCTCGCAACGGTCCTGCTGGCCCTGCTCATTCTGTGCG
 TGATCTACTGC
 AAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTCTACATCTTCAAACAACCATTCATG
 CGGCCGGTGCAG
 ACTACCCAGGAGGAGGACGGATGTTCGTGCCGCTTCCCGGAAGAGGA
 AGAGGGCGGATGC
 GAACTGAGAGTCAAGTTCTCGAGATCAGCGGATGCCCCCGCTTACCAG
 CAGGGACAGAAT
 CAGTCTATAACGAGCTGAACCTTGGCCGGCGGGAAGAGTACGATGTG
 CTGGATAAGAGA
 AGAGGACGCGATCCCAGATGGGAGGAAAGCCTCGCCGGAAGAACCC
 GCAGGAAGGCCTG
 TACAACGAGCTTCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAAAT
 CGGAATGAAGGGA
 GAACGCAGGCGGGGAAAGGCCACGATGGGCTCTACCAGGGTCTTAG
 CACCGCGACCAAG
 GACACCTACGACGCCCTGCATATGCAAGCGCTTCTCCACGC

SEQ ID NO: 36 es la secuencia de aminoácidos de SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF19 truncado-señalización tm de TNFRSF19 (LTG1713) (FIGURA 6)

MALKVLEQEKTFFLLVLLGYLSCKVTCDIQMTQTTSSLSASLGDRVTIS
 CRASQDISK
 YLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQED
 IATYFCQQG
 NTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGSEVKLQESGPLVAPSQSL
 VTCTVSGVSL
 PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFL
 KMNSLQTD
 TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSYEPHCASKVNLVKIASTA
 SSPRDTALAAV
 ICSALATVLLALLILCVIYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
 PEEEEGGC
 ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
 GKPRRKNPQEGL
 YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHM
 QALPPR

5 **SEQ ID NO: 37** es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF9-señalización tm de TNFRSF9 (LTG1714) (FIGURA 6)

ES 2 778 651 T3

ATGGGAAATTCCTGCTACAACATCGTCGCCACTCTGCTCCTCGTGCTGA
ACTTCGAGAGA
ACTCGCAGCGATATCCAGATGACCCAGACAACTCGTCCCTGTCGGCC
AGCCTGGGTGAT
CGCGTGACCATCTCGTGCCGCGCAAGCCAGGACATCTCAAAGTATCTG
AACTGGTACCAA
CAAAAGCCCAGCGGACTGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCTCCCGA
CTCCATAGCGGA
GTGCCAAGCCGATTCTCCGGTTCGGCTCTGGAACCGATTACTCCCTG
ACCATCTCCAAC
CTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGGAACACC
CTGCCGTACACT
TTCGGGGGTGGTACTAAGCTGGAAATCACCGGAGGCGGAGGAAGCGG
AGGAGGCGGTTC
GGAGGAGGAGGCTCAGAAGTGAAGCTGCAAGAATCCGGACCAGGCTT
GGTCGCCCCCTCC
CAAAGCCTGTCAGTGACTTGTACCGTGTCCGGAGTGTGCTGCCCGAC
TACGGCGTGTCC
TGGATTAGACAGCCGCCGAGAAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGTGTCATT
TGGGGCTCCGAA
ACCACCTACTACAACAGCGCCCTCAAGTCACGGCTTACCATCATTAAAG
GACAACTCCAAG
AGCCAAGTGTCTCAAGATGAACAGCCTCCAGACCGACGACACCGCC
ATCTACTACTGT
GCTAAGCACTACTACTACGGGGGCTCCTACGCAATGGACTACTGGGGT
CAGGGCACCCAGC
GTGACCGTGTCTCCCTGGATGGCAAATCCGTGCTTGTGAACGGGACG
AAGGAAAGGGAC
GTGGTCTGTGGACCGAGCCCGGCCGACTTGAGCCAGGGCCTCATCC
GTCACTCCCCCT
GCTCCTGCACGGGAGCCTGGTACAGCCCCAGATCATTTCTGTTCTTCC
TCGCATTGACC
TCCACTGCCCTGCTGTTCTGCTGTTCTTCTGACCCTGCGGTTCTCGGT
GGTCAAGAGG
GGCCGGAAGAAGCTGCTCTACATCTTCAAACAACCATTATGCGGCCG
GTGCAGACTACC
CAGGAGGAGGACGGATGTTCTGTGCCGCTTCCCGGAAGAGGAAGAGGG
CGGATGCCAACTG
AGAGTCAAGTTCTCGAGATCAGCGGATGCCCCGCTTACCAGCAGGGA
CAGAATCAGCTC
TATAACGAGCTGAACCTTGGCCGGCGGGAAGAGTACGATGTGCTGGAT
AAGAGAAGAGGA
CGCGATCCCGAGATGGGAGGAAAGCCTCGCCGGAAGAACCCGCAGGA
AGGCCTGTACAAC
GAGCTTCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCACTCCGAAATCGGAAT
GAAGGGAGAACGC

AGGCGGGGGAAAGGCCACGATGGGCTCTACCAGGGTCTTAGCACCCG
GACCAAGGACACC
TACGACGCCCTGCATATGCAAGCGCTTCCCTCCACGC

SEQ ID NO: 38 es la secuencia de aminoácidos de SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF9-señalización tm de TNFRSF9 (LTG1714) (FIGURA 6)

ES 2 778 651 T3

MGNSCYNIVÄTLĻĻLNFERTRSDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDI
SKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ
QGNTLPYT
FGGGTKLEITGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS
GVSLPDYGVS
WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL
QTDDTAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSA
DLSPGASSVTPP
APAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPF
MRPVQTT
QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRRE
EYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG
LYQGLSTATKDT
YDALHMQUALPPR

SEQ ID NO: 39 es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señalización tm de CD4 (LTG1562) (FIGURA 6)

ATGCTGCTGCTGGTCACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTCCCTCACCCCG
CCTTTCTGCTT
ATCCCGGACATTCAGATGACACAGACCACCTCGAGCTTGTCCGCGTCG
CTGGGCGATCGC
GTGACCATCTCCTGCCGGCCTCCCAAGACATTTCAAAGTATCTCAAC
TGGTACCAGCAG
AAGCCGGACGGAACCGTGAAACTGCTGATCTACCATAACCAGCCGCTG
CACTCCGGCGTG
CCGTCCCCTTCTCCGGATCGGGTTCGGAACTGACTACTCACTGACTA
TCTCCAACCTG
GAACAAGAGGACATCGCCACTTACTTCTGTCAACAAGGAAATACCCTT
CCCTACACCTT
GGGGGGGTACCAAGCTGGAGATCACTGGGGGCGGAGGCTCCGGTGG
AGGCGGATCCGGC
GGTGGAGGGAGCGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCAGGACTCGT
GGCGCCATCCAG
TCCCTGTCGGTGACCTGTACTGTCTCCGGAGTCAGCCTCCCCGATTACG
GAGTGTGATGG
ATTAGGCAACCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTCGGAGTGATCTG
GGGCTCCGAAACC
ACCTACTACAACCTCGGCGCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGAC
AACTCCAAGAGC

ES 2 778 651 T3

CAAGTGTTCCTTGAAGATGAACAGCTTGCAGACCGACGATAACCGCAATC
TACTACTGTGCC
AAGCACTATTACTACGGGGGGTCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAG
GGCACCTCCGTG
ACTGTGTCGTCCGCGGGCCGCGCCCGCCCTCGGCCCCCGACTCCTGCC
CCGACGATCGCT
TCCCAACCTCTCTCGCTGCGCCCGGAAGCATGCCGGCCCGCCGCCGGT
GGCGCTGTCCAC
ACTCGCGGACTGGACTTTGTGCAGCCTATGGCACTGATCGTCCTGGGA
GGAGTGGCCGGA
CTGCTGCTGTTCAATTGGGCTCGGAATCTTCTTCTGCGTGCGGTGCCGGC
CTAGGCCGAAAG
AAGCTCCTCTACATTTTCAAGCAACCCTTCATGCGCCCCGTGCAAACC
ACCCAGGAGGAG
GATGGATGCTCATGCCGGTTCCTGAGGAAGAAGAGGGCGGTTGCGA
GCTCAGAGTGAAA
TTCAGCCGGTCGGCTGACGCCCCGGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCA
GCTGTACAATGAG
CTCAACCTGGGGCGCCGCGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAG
AGGCAGAGATCCG
GAAATGGGCGGAAAGCCAAGGCGGAAGAACCCGCAGGAAGGTCTTTA
CAACGAACTGCAG
AAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATTGGGATGAAGGGAGA
AAGACGGAGGGGA
AAGGGACATGACGGACTTTACCAGGGCCTGAGCACTGCCACGAAGGA
CACCTATGATGCC
CTGCACATGCAGGCGCTGCCGCCTCGG

SEQ ID NO: 40 es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señalización tm de TNFRSF19 (LTG1563) (FIGURA 6)

ATGCTGCTGCTGGTACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTCCCTCACCCCG
CCTTTCTGCTT
ATCCCGGACATTCAGATGACACAGACCACCTCGAGCTTGTCCGCGTCG
CTGGGCGATCGC
GTGACCATCTCCTGCCGGCCTCCCAAGACATTTCAAAGTATCTCAAC
TGGTACCAGCAG
AAGCCGGACGGAACCGTGAAACTGCTGATCTACCATAACCAGCCGCCTG
CACTCCGGCGTG
CCGTCCCCTTCTCCGGATCGGGTTCGGAACTGACTACTACTGACTA
TCTCCAACCTT
GAACAAGAGGACATCGCCACTTACTTCTGTCAACAAGGAAATACCCTT
CCCTACACCTT
GGGGGGGGTACCAAGCTGGAGATCACTGGGGGCGGAGGCTCCGGTGG
AGGCGGATCCGGC
GGTGGAGGAGCGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCAGGACTCGT
GGCGCATCCAG
TCCCTGTGCGGTGACCTGTACTGTCTCCGGAGTCAGCCTCCCCGATTACG
GAGTGTGATGG

ES 2 778 651 T3

ATTAGGCAACCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTCGGAGTGATCTG
GGGCTCCGAAACC
ACCTACTACAACCTCGGCGCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGAC
AACTCCAAGAGC
CAAGTGTTCTTGAAGATGAACAGCTTGCAGACCGACGATAACCGCAATC
TACTACTGTGCC
AAGCACTATTACTACGGGGGGTCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAG
GGCACCTCCGTG
ACTGTGTCGTCCGCGGCCGCGCCCGCCCTCGGCCCGGACTCCTGCC
CCGACGATCGCT
TCCCAACCTCTCTCGCTGCGCCCGGAAGCATGCCGGCCCGCCGCGGT
GGCGCTGTCCAC
ACTCGCGGACTGGACTTTGATACCGCACTGGCGGCCGTGATCTGTAGC
GCCCTGGCCACC
GTGCTGCTGGCGCTGCTCATCCTTTGCGTGATCTACTGCAAGCGGCAG
CCTAGGCGAAAG
AAGCTCCTCTACATTTTCAAGCAACCCTTCATGCGCCCCGTGCAAACC
ACCCAGGAGGAG
GATGGATGCTCATGCCGGTTCCTGAGGAAGAAGAGGGCGGTTGCCA
GCTCAGAGTGAAA
TTCAGCCGGTCGGCTGACGCCCCGGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCA
GCTGTACAATGAG
CTCAACCTGGGGCGCCGCGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAG
AGGCAGAGATCCG
GAAATGGGCGGAAAGCCAAGGCGGAAGAACCCGCAGGAAGGTCTTTA
CAACGAACTGCAG
AAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATTGGGATGAAGGGAGA
AAGACGGAGGGGA
AAGGGACATGACGGACTTTACCAGGGCCTGAGCACTGCCACGAAGGA
CACCTATGATGCC
CTGCACATGCAGGCGCTGCCGCCTCGG

SEQ ID NO: 41 es la secuencia de nucleótidos de SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF19-señalización tm de TNFRSF19 (LTG1564) (FIGURA 6)

ATGCTGCTGCTGGTCACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTCCCTCACCCCG
CCTTTCTGCTT
ATCCCGGACATTCAGATGACACAGACCACCTCGAGCTTGTCCGCGTCG
CTGGGCGATCGC
GTGACCATCTCCTGCCGGCCTCCCAAGACATTTCAAAGTATCTCAAC
TGGTACCAGCAG
AAGCCGGACGGAACCGTGAAACTGCTGATCTACCATAACCAGCCGCCTG
CACTCCGGCGTG
CCGTCGCCGCTTCTCCGGATCGGGTTCGGAACTGACTACTCACTGACTA
TCTCCAACCTTG
GAACAAGAGGACATCGCCACTTACTTCTGTCAACAAGGAAATACCCTT
CCCTACACCTTC
GGGGGGGTACCAAGCTGGAGATCACTGGGGGCGGAGGCTCCGGTGG
AGGCGGATCCGGC

ES 2 778 651 T3

GGTGGAGGGAGCGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCAGGACTCGT
GGCGCCATCCCAG
TCCCTGTCCGGTACCTGTACTGTCTCCGGAGTCAGCCTCCCCGATTACG
GAGTGTTCATGG
ATTAGGCAACCCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTCGGAGTGATCTG
GGGCTCCGAAACC
ACCTACTACAACCTCGGGCGCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGAC
AACTCCAAGAGC
CAAGTGTTCTTGAAGATGAACAGCTTGCAGACCGACGATACCGCAATC
TACTACTGTGCC
AAGCACTATTACTACGGGGGGTCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAG
GGCACCTCCGTG
ACTGTGTCGTCCGCGGCCGCGGTCCGATTCCAAGACATGGAATGCGTG
CCCTGCGGGCAGC
CCGCCACCTCCTTACGAGCCGCACTGCGCATCGAAGGTCAACCTCGTG
AAGATCGCGAGC
ACCGCGTCTCACCCCCGGATACTGCTCTGGCCGCCGTGATTTGTTCCG
CCTTGGCCACC
GTGCTTCTGGCCCTGCTGATCCTCTGTGTGATCTACTGCAAGCGCCAGC
CTAGGCCGAAAG
AAGTCTCTTACATTTTCAAGCAACCCTTCATGCGCCCCGTGCAAACC
ACCCAGGAGGAG
GATGGATGCTCATGCCGGTTCCTGAGGAAGAAGAGGGCGGTTGCGA
GCTCAGAGTGAAA
TTCAGCCGGTCCGGCTGACGCCCCGGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCA
GCTGTACAATGAG
CTCAACCTGGGGCGCCGCGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAG
AGGCAGAGATCCG
GAAATGGGCGGAAAGCCAAGGCGGAAGAACCCGCAGGAAGGTCTTTA
CAACGAACTGCAG
AAGGACAAGATGGCCGAGGCCACTCCGAGATTGGGATGAAGGGAGA
AAGACGGAGGGGA
AAGGGACATGACGGACTTTACCAGGGCCTGAGCACTGCCACGAAGGA
CACCTATGATGCC
CTGCACATGCAGGCGCTGCCGCCTCGG

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 5 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico que codifica dicho CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 7, o
 en donde la molécula de ácido nucleico que codifica dicho CAR comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 40.
3. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) codificado por la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1.
- 10 4. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
5. El vector de la reivindicación 4, en donde el vector se selecciona del grupo que consiste en un vector de ADN, un vector de ARN, un vector plasmídico, un vector de cósmido, un vector de virus del herpes, un vector de virus del sarampión, un vector de lentivirus, vector adenoviral, o un vector de retrovirus, o una combinación de los mismos.
- 15 6. El vector de la reivindicación 4, que comprende además un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor inducible, un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, un promotor suicida, o cualquier combinación de los mismos.
7. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 4.
8. La célula de la reivindicación 7, en donde la célula es un linfocito T, opcionalmente en donde el linfocito T es un linfocito T CD8+.
- 20 9. La célula de la reivindicación 7, en donde la célula es una célula humana.
10. Una composición que comprende la célula de la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de cáncer, proporcionando una inmunidad antitumoral en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de dicha composición al mamífero.
- 25 11. Una composición que comprende el CAR de la reivindicación 3 para su uso en un método de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero dicha composición en una cantidad eficaz para tratar o prevenir cáncer en el mamífero.
12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad antitumoral eficaz de una población de linfocitos T humanos, en donde los linfocitos T comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 30 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en donde los linfocitos T son linfocitos T de un humano que tiene un cáncer hematológico, opcionalmente en donde el cáncer hematológico es leucemia o linfoma, opcionalmente además en donde la leucemia es leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), o leucemia mielógena crónica (LMC), o en donde el linfoma es linfoma de células del manto, linfoma no Hodgkin o linfoma de Hodgkin.
- 35 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en donde el cáncer hematológico es mieloma múltiple.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en donde el cáncer humano incluye un carcinoma de adulto que comprende cáncer bucal y de faringe (lengua, boca, faringe, cabeza y cuello), cánceres del aparato digestivo (esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, hígado, conducto biliar interhepático, vesícula biliar, páncreas), cánceres del aparato respiratorio (laringe, pulmón y bronquio), cánceres de huesos y de las articulaciones, cánceres de tejido blando, cánceres de piel (melanoma, carcinoma de células basales y escamosas),
 40 tumores pediátricos (neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing), tumores del sistema nervioso central (cerebro, astrocitoma, glioblastoma, glioma) y cánceres de mama, el sistema genital (cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, vulva, vagina, próstata, testículo, pene, endometrio), el aparato urinario (vejiga urinaria, riñón y pelvis renal, uréter), el ojo y la órbita, el sistema endocrino (tiroides), y el cerebro y otro sistema nervioso, o
 45 cualquier combinación de los mismos.

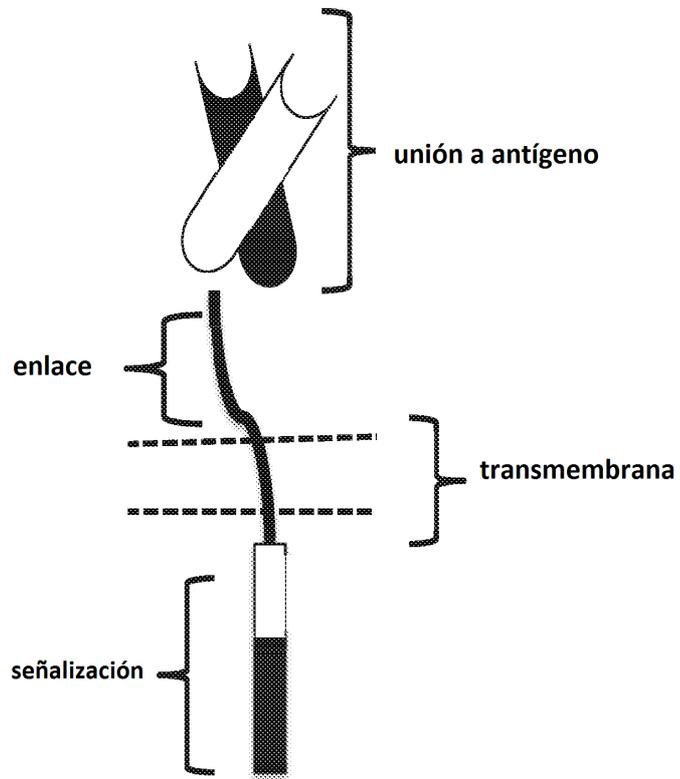


FIG. 1

ES 2 778 651 T3

Característica: 1 2 3 456 789
CD8: CDIYI**W**AP**L**AGTCGV-**LLL**SLVILYCKR
CD4: PM-**A**L-**I**VLGGVAGLL**L**FIG**L**GI**F**FCVRC
TNFRSF16: TTDNL-**I**PVYCSILAA**V**VVGLVAYIAFKR
TNFRSF19: TA--**L**-**A**AMICSALAT**V**LL**A**LLILCVIYC

FIGURA 2

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDTDIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPG
SGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR
KGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSOVFLKMNSLQTDDBTAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCKRGRKKLL
Y
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
L
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Secuencia de acidos nucleicos (ADN)

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgctgcaactgccgatccggcgttctgctg
attccgataccgatattcagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggc
gatcgcgtgaccattagctgccgcgagccaggatattagcaaatctgaactggtat
cagcagaaccggatggcaccctgaaactgctgattatcataccagccgctgcatagc
ggcgtgccgagccgcttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagc
aacctggaacaggaagatattgacactatcttccagcagggcaacaccctgccgat
acctttggcggcggcaccacaaactggaattaccggcagcaccagcggcagcggcaaccg
ggcagcggcgaagcagcaccacaaaggcgaagtgaactgcaggaagcggccgggctg
gtggcgcgagccagagcctgagcgtgacctgagcggcgtgagcctgcccggat
tatggcgtgagctggattcggcagccgccgcaaaggcctggaatggctggcgtgatt
tggggcagcgaaccacattataacagcgcgctgaaaaggcctgaccattataaa
gataacagcaaaagccaggtgttctgaaaatgaacagcctgagaccgatataccg
atattattgcgcaaacattattatattgcccggcagctatcgatgatttggggc
cagggcaccagcgtgacctgagcagcggcggcgaccaccacccggcggcggccg
ccgaccggcggcggcaccattgagcagccgctgagcctgcccgggaagcgtgccc
ccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
tggggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
tgcaaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
cagaccaccaggaagaagatggctgagcctgcccgttccggaagaagaaggcggc
tgcgaactgcgctgaaatttagccgagcgggatgcccggcgtatcagcagggccag
aaccagctgtataacgaactgaacctggcggcggcgaagaatgatgtgctggataaa
cgccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ctgtataacgaactgcagaaagataaaatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ggcgaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
aaagatacctatgatgctgcatatgaggcgtgcccggcgc

FIGURA 3A

II. SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD8 (LTI re-manipulado) (LTG1538)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLPDIQMTQTTSSLSASLGD
 RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
 GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGS
 GGGGSEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
 EWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYC
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
 ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
 Y
 IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
 L
 YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

atgctgctgctggtagaccagcctgctgctgctggaactgccgcacccggcgttctgctg
 attccggatattcagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggagatcgc
 gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggatcagcag
 aaaccggatggcaccgtgaaactgctgattatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
 ccgagccgcttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
 gaacaggaagatattgtagcactattttgcccagcagggcaacaccctgcccgtatacctt
 ggcggcggcaccaaactggaatfaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcggcggc
 ggcggcggcagcgaagtgaactgcaggaaagcggcccggcctggtggcggcggcggcggc
 agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
 attgccagccggcgcgcaaaaggcctggaatggcgtggcgtgattggggcagcgaacc
 acctattataacagcgcgctgaaaagccgctgaccattataagataacagcaaaagc
 caggigtctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgattattattgcgcg
 aaacattattattatggcggcagctatcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
 accgtgagcagcggcggcggcaccaccacccggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 accattgcgagccagccgctgagcctgagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gcggctgatacccgggcctgattttgctgctgataattatattggggcggcggcggcggc
 ggcacctgagcgtgctgctgctgagcctggtgattaccctgtattgcaaacggcggcgc
 aaaaaactgctgtatatttttaaacagccgtttatgcccggctgagaccaccaggaa
 gaagatggctgagcctgccgtttccggaagaagaagaaggcggctgcaactgcgcgtg
 aaatttagcgcagcgggatgcccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataac
 gaactgaacctgggccggcgaagaatatgatgctggataaacggcggcggcggcggcggc
 ccggaaatggggcgaaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 cagaaagataaaatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 ggcaaaaggccatgatggcctgtatcaggccctgagcaccggcggcggcggcggcggcggc
 gcgctgcatatgcaggcgtgcccggcgc

FIG. 3B

III. SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de CD4 LTG1562

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPDIQMTQTTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVICTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
EWLGVWIGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRPRR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGQLSTATKDTYDALHMQALPPR

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgctggaactgccgcatccggcgcttctgctg
 attcggatattcagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
 gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
 aaaccggatggcaccgtgaaactgctgattatcataccagccgctgcatagcggcgctg
 ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaactg
 gaacaggaagatattgcacatattttgcccagcagggcaacaccctgccgtatacctt
 ggcggcgccaccaaactggaaattaccggcgccggcgccgagcggcgccggcgccgagcggc
 ggcggcgccgagcgaagtgaactgcaggaagcggcccggcctggtggcgccgagccag
 agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgctgagcctgccggattatggcgtgagctgg
 attcggcagccggcgccgcaaaaggcctgggaatggctggcgctgatttggggcagcgaaac
 acctattataacagcgcgctgaaaagcgcctgaccattataaagataacagcaaaagc
 cagggtttctgaaaaagaacagcctgcagaccgatgataccgcgatttattattgcgcg
 aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccagggcaccagcgtg
 accgtgagcagcgcggcgccgcccggcgcccgcgcccggcggcggcggcggcggcggcggc
 agccagccgctgagcctgcgcccgaagcgtgcccggcgccggcgggcgggcgggcgggcggc
 acccgccggcctggattttgtgcagccgatggcgctgattgtgctggggcgcggtggcgggc
 ctgctgctgtttattggcctgggcatttttttgcgtgctgctgcccccgcggcggcggcggc
 aaactgctgtatattttaaacagccgtttatgcgcccgggtgcagaccaccaggaagaa
 gatggctgcagctgccgtttccggaagaagaagaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaa
 tttagccgagcgcggatgcgcccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaa
 ctgaacctgggcccggcgaagaatgatgtgctggataaacccggcgccgctgacccg
 gaaatggcgccgcaaacccgcccgaaaaaccgcaggaaggcctgtataacgaactgcag
 aaagataaaatggcggaagcgtatagcgaattggcatgaaaggcgaacccggcggcggc
 aaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgatgc
 ctgcatatgcaggcgtgcccgcgcgc

FIG. 3C

IV. SP-ligante de CD19-enlace de CD8-señales tm de TNFRSF19 LTG1563

1 MLLLVTSLLLCELPHPAFLLPDIQMTQTTSSLSASLGD
 51 RVTISCRASQDISKYLNWYQOKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
 101 GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNLTPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGS
 151 GGGGSEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
 201 EWLGVWVGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DDTAIYYC
 251 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
 301
ACRPAAGGAVHTRGLDFDTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQPRR
 351
 KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCEL RVKFSRSADAPA
 401
 YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 451
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcaactgccgcacccggcgttctgctg
 attccggatattcagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
 gtgaccattagctgccgcgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
 aaaccggatggcaccgfgaaactgctgattatcataccagccgcctgcatagcggcgtg
 ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
 gaacaggaagatattgcaacctattttgcccagcagggcaaacacctgccgtatacctt
 ggcggcggcaccaaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcggcggc
 ggcggcggcagcgaagtgaactgcaggaaagcggcccggcctggcggcggcggcggcggc
 agcctgagcgtgacctgaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
 attccagccggcggcggcgaagcctggaatggctggcgtgattggggcagcgaacc
 acctattataacagcgcgctgaaaagcgcctgaccattataagataacagcaaaagc
 caggtgttctgaaaatgaacagcctgcagaccgatgataccgcgattattattgcgcg
 aaacattattattgcccggcagctatgcgatggattatggggccagggcaccagcgtg
 accgtgagcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 agccagccgctgagcctgcgcccggagcgtgcccggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 acccggcggcctggattttgataccgcgctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gtgctgctggcggcgtgctgattctgtgctgatttatgcaaacgccagcggcggcggcggc
 aaactgctgtatattttaaacagccgttatgcgccggcgtgagaccaccaggaagaa
 gatggcctgcagctccgcttccggaagaagaaggcggcctgcgaactgcgctgaaa
 tttagccgcagcgggatgcggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaa
 ctgaacctgggcccgcgaagaatgatgtgctggataaacgccggcggcggcggcggcggc
 gaaatgggcccgaaccgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 aaagataaaatggcgaagcgtatagcgaattggcatgaaaggcgaacggcggcggcggc
 aaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaagatacctatgatgctg
 ctgcatatgcagggcgtgccggcggc

FIG. 3D

V. SP-ligante de CD19-enlace de TNFRSF19-señales tm de TNFRSF19
 LTG1564

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPDIQMTQTSSLSASLGD
RVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS
GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGS
GGGGSEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL
EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLOTDDTAIYYC
AKHYYYGGSYAMDYWGQGSVTVSSAAA VGFQDMECVPCGDP PPPPYEPHC
ASKVNLVKIASTASSPRDTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQPRR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

atgctgctgctggtagaccagcctgctgctgctgcaactgccgcacccggcgtttctgctg
 attccggatattcagatgaccagaccaccagcagcctgagcgcgagcctgggcgatcgc
 gtgaccattagctgccgcgagccaggatattagcaaatatctgaactggtatcagcag
 aaaccggatggcaccgtgaaactgctgattatcataccagccgctgcatagcggcgtg
 ccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattatagcctgaccattagcaacctg
 gaacaggaagatattgacacatttttgcagcagggcaacacctgccgtataccttt
 ggcggcggcaccacaaactggaaattaccggcggcggcggcagcggcggcggcggcggcggc
 ggc
 agcctgagcgtgacctgaccgtgagcggcgtgagcctgccggattatggcgtgagctgg
 attgccagccgccgcgcaaaaggcctggaatggctggcgtgatttggggcagcggaaacc
 acctattataacagcgcgctgaaaagccgctgaccattataaagataacagcaaaagc
 cagggtttctgaaaatgaacagcctgacagaccgatgataccgcgatttattattgctg
 aaacattattattatggcggcagctatgcgatggattattggggccaggccaccagcgtg
 accgtgagcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 ccgcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 accgcgagcagcccgcgafaccgcgctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gtgctgctggcgtgctgattctgtgctgatttattgaaacgccagccgcggcggcggcggc
 aaactgctglataltttaaacagccgltttagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 gatggctgagctgccgctttccggaagaagaagaaggcggcgtgcgaactgcgctgaaa
 tttagccgagcgcggatgcggcggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaa
 ctgaacctgggcccggcgaagaatatgatgtctggataaacgccggcggcggcggcggcggc
 gaaatggggggcgaaccgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 aaagataaatggcggagcgtatagcgaattggcatgaaaggcgaaccggcggcggcggcggc
 aaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcgaccaaagatacctatgatgctg
 ctgcatatgcagcgtgctggcggcggc

FIG. 3E

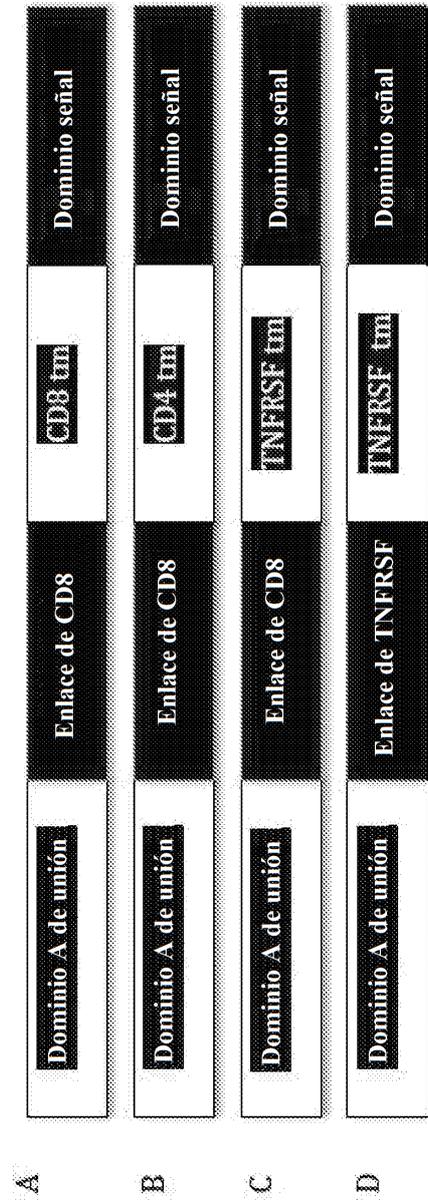


FIG. 4

Actividad lítica de CAR-T frente a células Raji

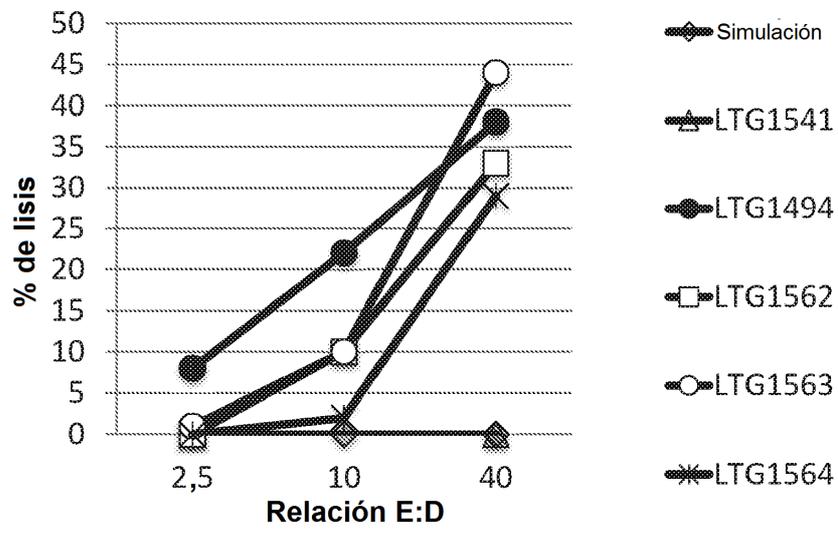


FIG. 5

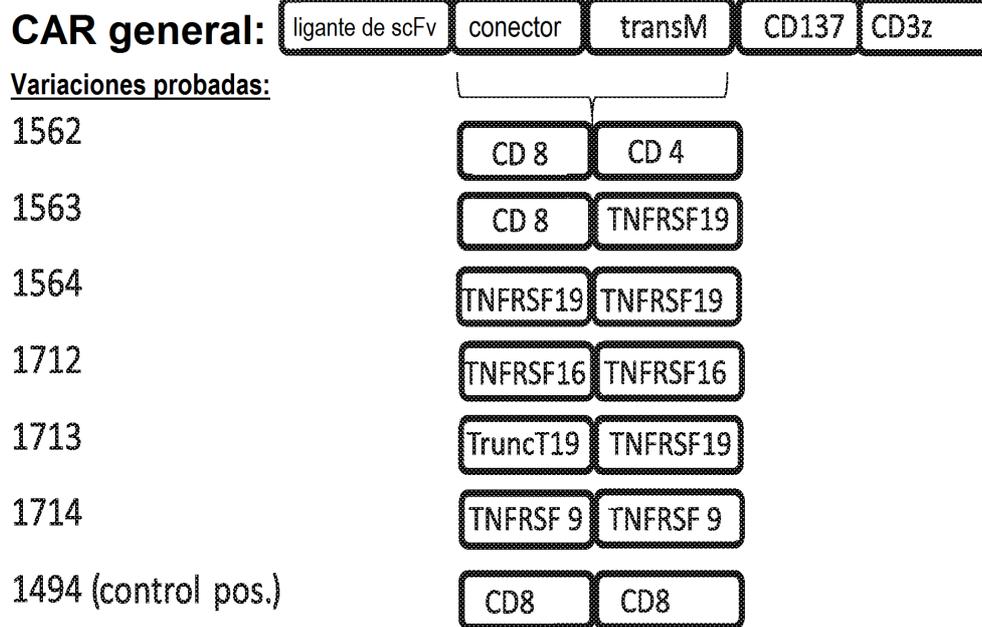


FIG.6

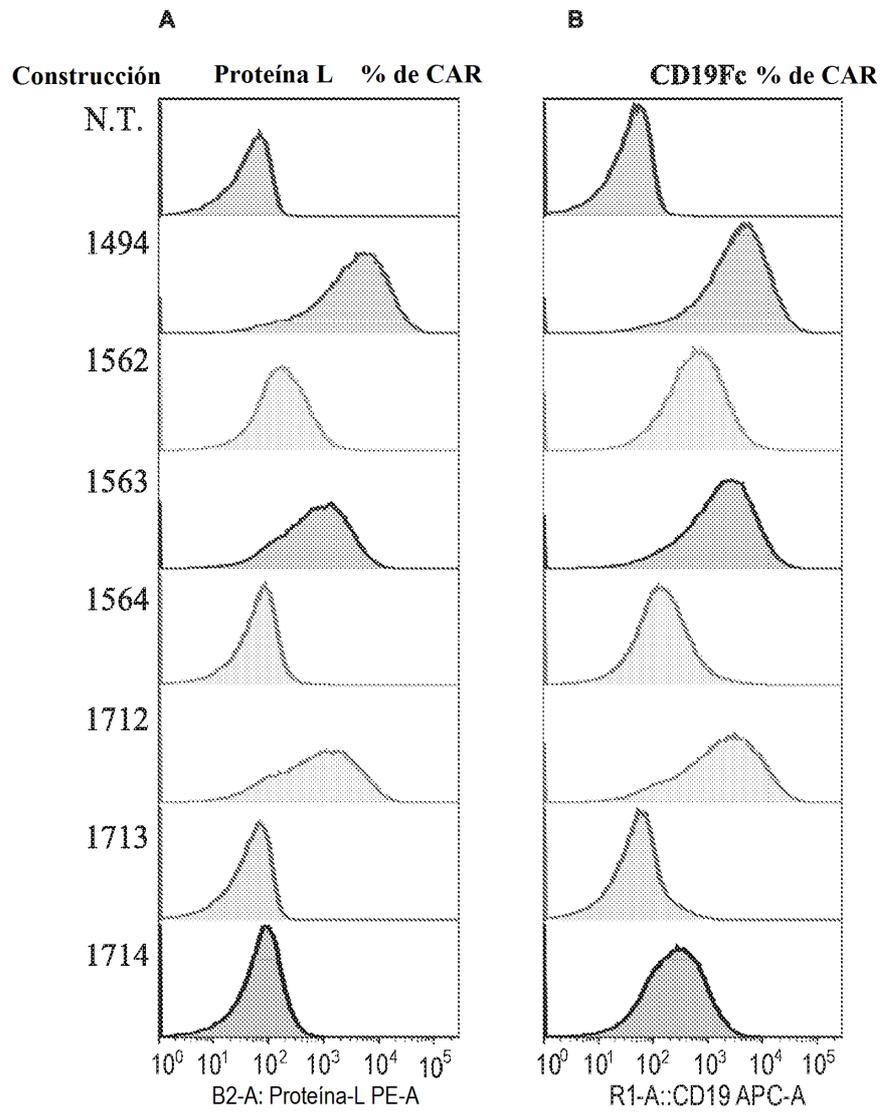


FIG.7

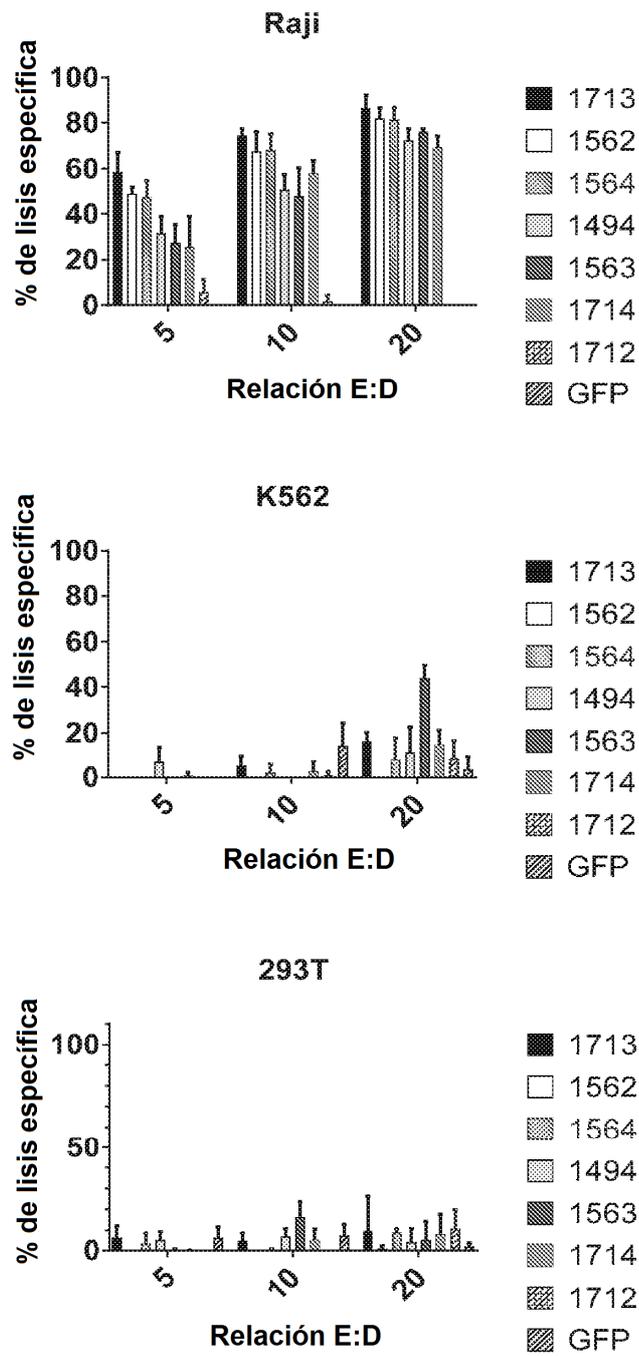


FIG. 8

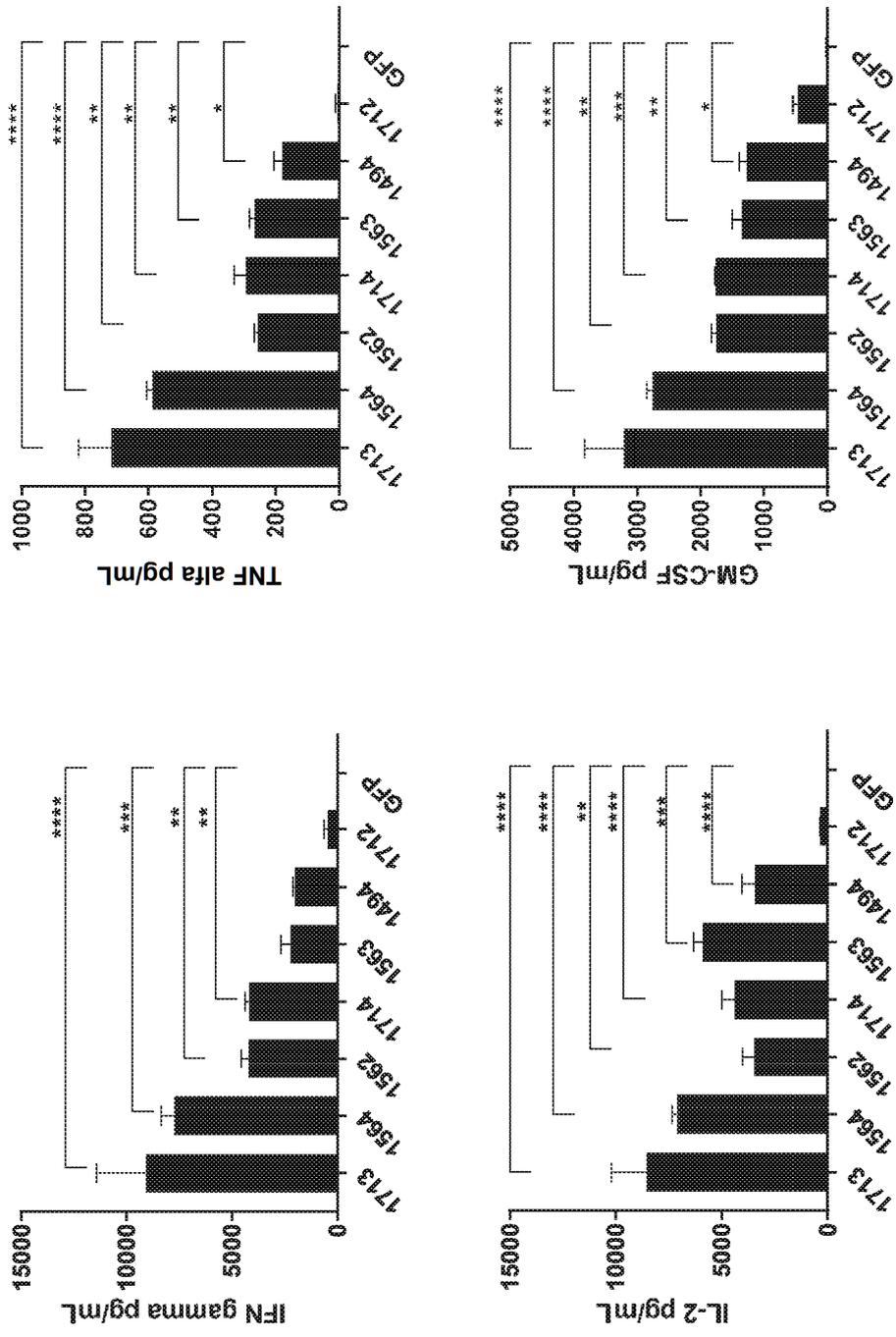


FIG. 6

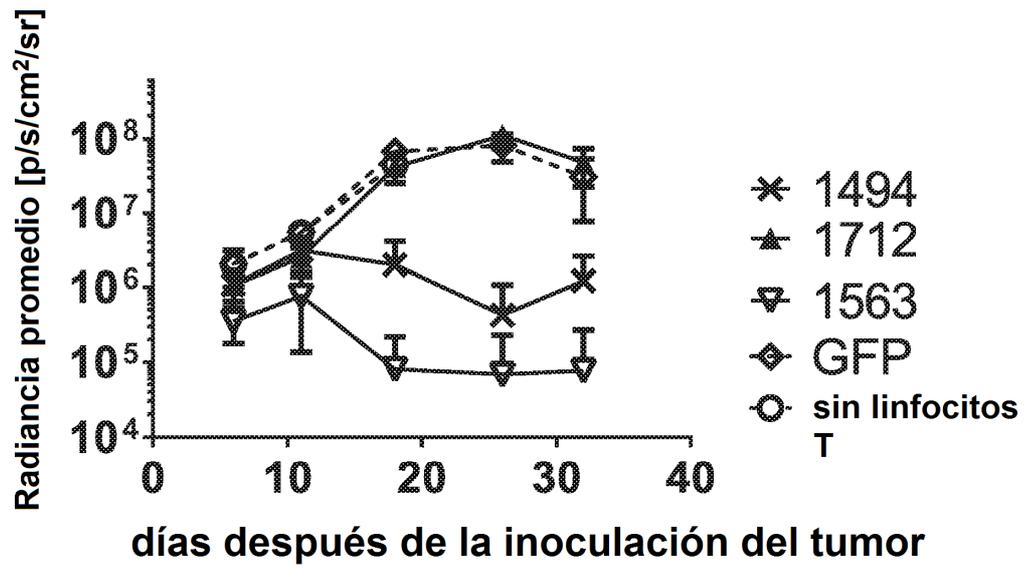


FIG. 10

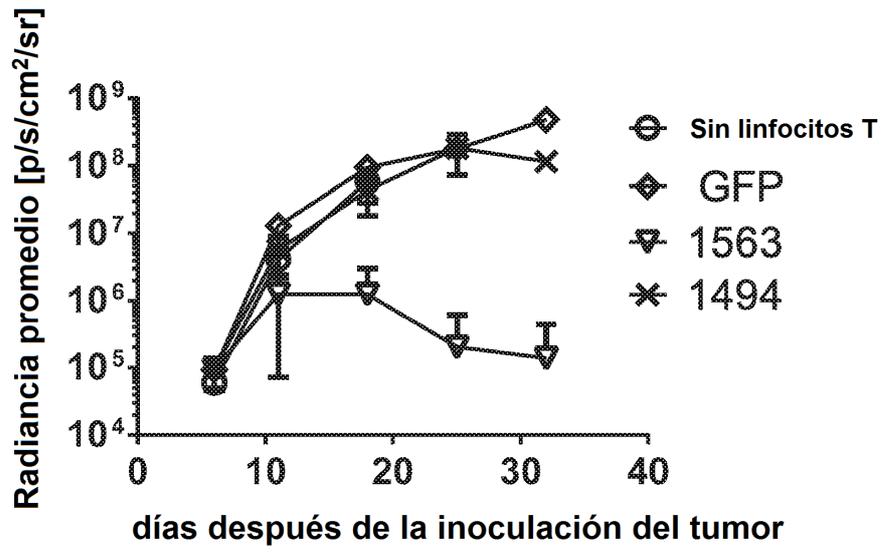


FIG. 11A

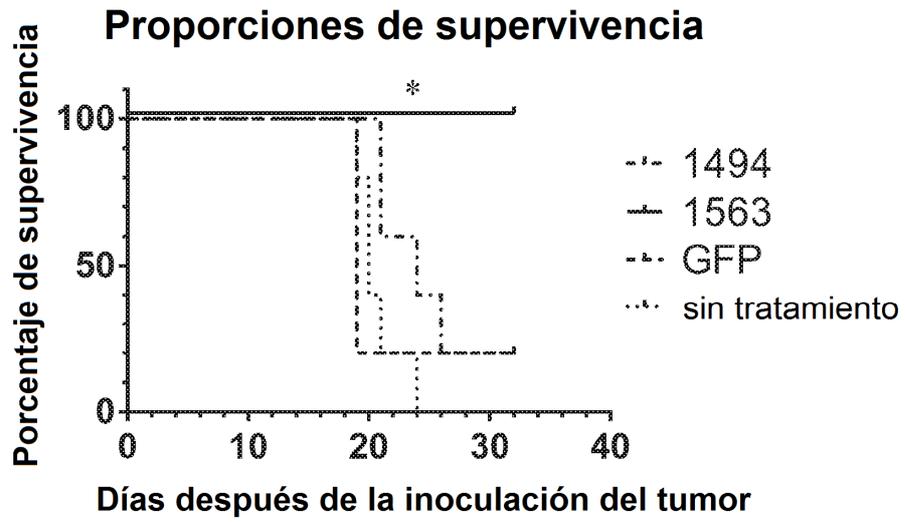


FIG. 11B