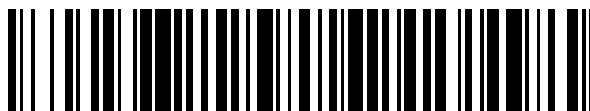


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 263**

51 Int. Cl.:

C07K 14/05 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2013 PCT/US2013/050275**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14011988**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013 E 13817144 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2872526**

54 Título: **Mejora de la actividad de los CAR de linfocitos T mediante la introducción conjunta de un anticuerpo biespecífico**

30 Prioridad:

13.07.2012 US 201261671535 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2020

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3600 Civic Center Boulevard, 9th Floor
Philadelphia PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**JUNE, CARL, H.;
ZHAO, YANGBING y
LIU, XIAOJUN**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 786 263 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

Mejora de la actividad de los CAR de linfocitos T mediante la introducción conjunta de un anticuerpo biespecífico

5 **Antecedentes de la invención**

El desarrollo de linfocitos T que se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (Chimeric Antigen Receptor, CAR) ha abierto la puerta a muchas posibles nuevas terapias para el cáncer y otros trastornos. En general, los CAR comprenden un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular y un dominio intracelular.

Algunos CAR utilizan un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular no humano, que puede introducir una respuesta inmunitaria no deseada que puede poner en peligro los beneficios terapéuticos del reconocimiento tumoral mediado por CAR y la lisis tumoral. Por ejemplo, los pacientes pueden reaccionar a los anticuerpos procedentes de ratón y crear anticuerpos que son específicos del anticuerpo extraño procedente de ratón. Esta respuesta, denominada respuesta del anticuerpo humano antimurinos (Human Anti-Mouse Antibody, HAMA), puede generar síntomas similares a una reacción alérgica que varía desde una erupción cutánea leve hasta complicaciones potencialmente mortales. Por tanto, los CAR que comprenden un dominio de reconocimiento de antígeno procedente de anticuerpos humanos o humanizados pueden ser beneficiosos porque no estimularían una respuesta inmunitaria tan peligrosa. Kochenderfer, J. T. et al. (2010) divulgaron un ensayo clínico de fase I sobre el tratamiento de tumores malignos con linfocitos B con linfocitos T de SANGRE autólogos transducidos con CAR anti-CD19, 52ª reunión anual de la Sociedad Americana de Hematología (American Society of Haematology, ASH) del 04 al 07 de diciembre de 2010, vol. 116, n.º 21, 1179- 1180.

Burrell, D. M. et al. (2011) divulgaron el tratamiento de la leucemia avanzada en ratones con linfocitos T modificados por ingeniería genética mediante ARNm y descubrieron que los linfocitos T que expresan un CAR anti-CD19 introducido mediante electroporación con ARNm optimizado eran potentes y específicos asesinos de células diana CD19. Human gene therapy, vol. 22, n.º 12, 1575 - 1586.

Los activadores de linfocitos T biespecíficos (Bispecific T-cell engagers, BiTEs) son anticuerpos biespecíficos que se unen a un antígeno de linfocitos T (por ejemplo, CD3) y un antígeno tumoral. Se ha demostrado que los BiTE inducen la lisis dirigida de las células tumorales diana y, por lo tanto, también proporcionan posibles grandes terapias para el cáncer y otros trastornos. Nagorsen, D. et al. (2011) divulgaron la terapia inmunomoduladora del cáncer con el anticuerpo blinatumomab BiTE que activa a los linfocitos T. Experimental cell research, vol. 317, n.º 9, 1255 - 1260. Sin embargo, la administración sistémica de BiTE puede provocar toxicidad y, por lo tanto, puede ser deseable una administración más dirigida de BiTE a un entorno tumoral específico.

Por tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer usando CAR humanos o humanizados y para la administración dirigida de anticuerpos biespecíficos terapéuticos. La presente invención satisface esta necesidad insatisfecha.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona una composición que comprende

- una primera molécula de ARN que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), donde el CAR comprende un dominio de unión a CD19 humano, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde la secuencia que codifica el dominio de unión a CD19 es de origen humano; y
- una segunda molécula de ARN que codifica un anticuerpo biespecífico, donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD19 humano, y un segundo dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD3.

La invención proporciona además una composición que comprende

- un primer vector lentivírico que codifica un receptor de antígeno quimérico, donde el CAR comprende un dominio de unión a CD19 humano, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde la secuencia que codifica el dominio de unión a CD19 es de origen humano; y
- un segundo vector lentivírico que codifica un anticuerpo biespecífico, donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD19 humano, y un segundo dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD3.

La invención proporciona además un método *ex vivo* o *in vitro* para generar un linfocito T modificado, que comprende introducir en un linfocito T una de las composiciones descritas anteriormente.

La invención proporciona además un método *ex vivo* o *in vitro* para mejorar la actividad antitumoral de un linfocito T, que comprende introducir en un linfocito T una de las composiciones descritas anteriormente, donde el anticuerpo biespecífico codificado por el segundo ARN o el segundo vector lentivírico se secreta por la célula.

5 En una realización, la secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un CAR como se define en las reivindicaciones adjuntas comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21. En una divulgación, la secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 22.

10 En una realización, el fragmento de unión a antígeno es un Fab o un scFv.

El dominio de unión a antígeno se une a un antígeno tumoral que es un CD19 humano.

15 El antígeno tumoral es CD19. En una divulgación, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, glucolípidos F77, EGFRvIII, GD-2, el TCR de NY-ESO-1, el TCR de MAGE A3 y cualquier combinación de los mismos.

20 En una realización, el CAR comprende además una región de señalización coestimuladora que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83 y cualquier combinación de los mismos.

25 En una realización, la secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un CAR como se define en las reivindicaciones adjuntas comprende una secuencia que codifica un anticuerpo biespecífico.

30 En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y cualquier combinación de las mismas. En una divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y cualquier combinación de las mismas.

35 En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

40 La invención proporciona además un linfocito T genéticamente modificado para expresar un CAR y un anticuerpo biespecífico, donde:

- el CAR comprende un dominio de unión a CD19 humano, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde la secuencia que codifica el dominio de unión a CD19 es de origen humano; y
- 45 - el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD19 humano, y un segundo dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD3, y donde el anticuerpo biespecífico se secreta por la célula.

50 La célula es un linfocito T.

En una realización, la célula exhibe una inmunidad antitumoral cuando el dominio de unión a antígeno se une a su antígeno correspondiente.

55 Se divulga un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en un mamífero, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR y un anticuerpo biespecífico, donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde además el dominio de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquier combinación de los mismos, estimulando así una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en el mamífero.

60 Se divulga un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en un mamífero, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno procedente de un anticuerpo biespecífico, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde además el dominio de unión a antígeno se selecciona de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un

fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquier combinación de los mismos, estimulando así una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en el mamífero.

Se divulga un método para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR y un anticuerpo biespecífico, donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde además el dominio de unión a antígeno se selecciona de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquier combinación de los mismos, proporcionando así una inmunidad antitumoral en el mamífero.

Además se divulga un método para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno procedente de un anticuerpo biespecífico, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde además el dominio de unión a antígeno se selecciona de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquier combinación de los mismos, proporcionando así una inmunidad antitumoral en el mamífero.

Además se divulga un método para tratar un mamífero que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno tumoral, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR y un anticuerpo biespecífico, donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde además el dominio de unión a antígeno se selecciona de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquier combinación de los mismos, tratando así al animal.

Además se divulga un método para tratar un mamífero que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno tumoral, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno procedente de un anticuerpo biespecífico, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde además el dominio de unión a antígeno se selecciona de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquier combinación de los mismos, tratando así al animal.

La invención proporciona además el linfocito T inventivo para su uso en un método para tratar el cáncer en un ser humano.

Además se divulga un método para tratar a un ser humano con cáncer, comprendiendo el método administrar al ser humano una célula modificada genéticamente para expresar un CAR, donde el CAR comprende un dominio de unión a antígeno procedente de un anticuerpo biespecífico, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde además el dominio de unión a antígeno se selecciona de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un fragmento de unión a antígeno del mismo y cualquier combinación de los mismos, donde la célula es un linfocito T.

Además se divulga una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo biespecífico, donde la secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.

La invención proporciona una célula como se define en las reivindicaciones adjuntas, comprendiendo una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico, donde la secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.

Además se divulga una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico, donde la secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

Además se divulga un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población celular o tejido diana en un mamífero, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un anticuerpo biespecífico.

Además se divulga un método para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un anticuerpo biespecífico.

Además se divulga un método para tratar un mamífero que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con una expresión elevada de un antígeno tumoral, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula modificada genéticamente para expresar un anticuerpo biespecífico.

- 5 Además se divulga un método para tratar a un ser humano con cáncer, comprendiendo el método administrar al ser humano una célula modificada genéticamente para expresar un anticuerpo biespecífico.

En una realización, la célula modificada genéticamente es un linfocito T autólogo.

- 10 La célula secreta el anticuerpo biespecífico.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. A fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos las realizaciones que se prefieren actualmente. Debe entenderse que, sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones precisas e instrumentos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

- 20 La Figura 1 representa mapas vectoriales de construcciones de ARN. Mapas de vectores de transcripción *in vitro* (In Vitro Transcription, IVT) para Blinatumomab (pGEM-Blina.64A), CAR con dominios de señalización 4-1BB-zeta contra Ac 21D4 humano CD19 completamente humano (pGEM.D4(CD19).BBZ.64A), HB12B humanizado (pGEM.12B(CD19).BBZ.64A) y scFv de origen de ratón CD19 a partir de Blinatumomab (pGEM.Blina.19BBZ.64A).

- 25 La Figura 2 es un gráfico que representa el diseño experimental para probar CAR de CD19 de linfocitos T electroporados con ARN de Blina. El día 10, los linfocitos T estimulados (a partir de ND200) se electroporaron como se indica. EP n.º 1 con 10 µg de ARN de FCM63 CD19 BBZ, EP n.º 2 con 5 µg de ARN de FCM63 CD19 BBZ, EP n.º 3 con 5 µg de FCM63 CD19 BBZ más 10 µg de ARN de Blina, EP n.º 4 con 10 µg de ARN de Blina y EP n.º 5 con 5 µg de ARN de GFP. El n.º 12 fue el linfocito T sin electroporación. Inmediatamente después de la electroporación, se mezclaron una alícuota de igual volumen (1 ml) de los linfocitos T electroporados como se indica del n.º 6 al n.º 8.
30 Quince horas después de la electroporación, se mezclaron otra alícuota (1 ml) de células electroporadas como se indica para el n.º 9 al n.º 11 y posteriormente, las células se sometieron a tinción con FACS para detección del CAR, ensayo de CD107a y ensayo de linfocitos T citotóxicos (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL).

- 35 La Figura 3 es una serie de gráficos que representan la tinción CAR del CAR de CD19, linfocitos T electroporados con ARN de Blina y linfocitos T electroporados con ARN de GFP incubados con linfocitos T electroporados con ARN de Blina. Quince horas después de la electroporación, los linfocitos T para todos los tratamientos como se muestra en la Figura 2 se tiñeron con un Fab de cabra antimurino. El número que se muestra arriba de cada representación se refiere a las condiciones enumeradas en la Figura 2. Los resultados muestran que no solo los linfocitos T electroporados con ARN del CAR de CD19 se tiñeron para la expresión del CAR, sino que el ARN-Bis de Blina solo (n.º 4) electroporado, y los linfocitos T electroporados con ARN de GFP que se incubaron conjuntamente con linfocitos T que habían sido electroporados con ARN-Bis de Blina (n.º 7, n.º 8, n.º 10, n.º 11) también se habrían teñido. Esto demuestra que el Ac biespecífico CD19-CD3 secretado por linfocitos T electroporados de Blina podría unirse al CD3 de linfocitos T electroporados de GFP.

- 45 La Figura 4 es una serie de gráficos que representan los resultados de los experimentos que ilustran que los "BITE" de linfocitos T electroporados con ARN-Bis de Blina podrían reconocer específicamente los tumores. Quince horas después de la electroporación, los linfocitos T se sometieron a un ensayo de desgranulación CD107a. Quince horas después de la electroporación, los linfocitos T para todas las condiciones mostradas en la Figura 2 se cultivaron conjuntamente con diferentes tipos de células que expresan CD19 (Nalm6, K562-CD19 y Raji) o el tumor K562 negativo para CD19. El número que se muestra arriba de cada representación son las condiciones enumeradas en la Figura 2. Los resultados demuestran que los linfocitos T electroporados con ARN-Bis de Blina reconocieron específicamente tumores positivos para CD19.

- 55 La Figura 5 es una serie de gráficos que representan los resultados de los experimentos que demuestran que los "BITE" de linfocitos T electroporados con el ARN anti-CD19/CD3 biespecífico Blina podrían permitir que los linfocitos T electroporados con ARN de GFP no reactivos al tumor reconozcan específicamente los tumores. Quince horas después de la electroporación, los linfocitos T para todas las condiciones mostradas en la Figura 2 se cultivaron conjuntamente con diferentes células que expresan CD19 (Nalm6, K562-CD19 y Raji) o el tumor K562 negativo para CD19 para el ensayo de desgranulación CD107a. El número que se muestra arriba de cada representación son las condiciones enumeradas en la Figura 2. Los resultados muestran que los linfocitos T electroporados con ARN-Bis de Blina reconocieron específicamente tumores. Los resultados muestran que los linfocitos T electroporados con ARN-Bis de Blina podrían permitir que linfocitos T "espectadores" electroporados con ARN de GFP no reactivos para tumores reconozcan específicamente tumores (n.º 7, n.º 8, n.º 10, n.º 11). Los linfocitos T CD8+ se cerraron.

- 65 La Figura 6 es un gráfico que representa los resultados de los experimentos que ilustran que los linfocitos T electroporados con ARN-Bis de Blina destruyen específicamente las células que expresan el antígeno CD19. Quince

horas después de la electroporación, los linfocitos T para todas las condiciones mostradas en la Figura 2 se analizaron para determinar su actividad lítica en un ensayo de CTL basado en flujo usando K.562-CD19-CFSE/K562-meso-CMRA como células diana. El número que se muestra para cada condición de linfocitos T electroporados son los números enumerados en la Figura 2. Los resultados muestran que la electroporación conjunta de ARN anti-CD19/anti-CD3 biespecífico de Blina con ARN del CAR de CD19 podría mejorar aún más la actividad de destrucción de los linfocitos T (n.º 3 frente a n.º 2). La adición de un número igual de linfocitos T electroporados de GFP no reactivos a tumores a los linfocitos T electroporados con ARN del CAR de CD19 redujo la capacidad de destrucción de los linfocitos T que expresan CAR de CD19 mediante la reducción de la relación E:T, mientras que añadir una cantidad igual de linfocitos T electroporados de GFP no reactivos a tumores a los linfocitos T electroporados con ARN-Bis de Blina (n.º 7, n.º 8, n.º 10, n.º 11) podría mantener una actividad de destrucción de linfocitos T equivalente a sus grupos no diluidos (n.º 3 y n.º 4), lo que indica que el Ac biespecífico anti-CD19/anti-CD3 secretado por los linfocitos T electroporados con ARN-Bis de Blina podría unirse a los linfocitos T electroporados con ARN de GFP y destruir eficazmente las células diana, manteniendo así eficazmente la relación E:T.

La Figura 7 es una serie de gráficos que representan la tinción de la expresión del CAR de nuevos ARN electroporados de ARN del CAR de CD19. La expresión de los CAR de CD19 recién construidos se muestra quince horas después de la electroporación de linfocitos T como se indica. Se usaron dos Fab anti-IgG diferentes: se usó Fab anti-IgGm para teñir CAR procedentes de ratón, y se usó Fab anti-IgGh para teñir CAR procedentes de seres humanos.

La Figura 8 es una serie de gráficos que representan los resultados de los experimentos que ilustran que tanto los CAR de CD19 del Ac 12D4 completamente humano como el HB12B humanizado reconocen específicamente los tumores CD19 positivos. Quince horas después de la electroporación, los linfocitos T electroporados como se indicó se cultivaron conjuntamente con dos líneas tumorales positivas para CD19 (K562-CD19 o Raji) y una línea negativa para CD19 U266B1 para un ensayo de desgranulación de CD107a. En comparación con el CAR de CD19 FMC63 (10OF) utilizado actualmente, ambos CAR de CD19 del Ac 12D4 completamente humano y HB12B humanizado reconocieron específicamente tumores positivos para CD19.

La Figura 9, que comprende la Figura 9A y la Figura 9B, es una serie de gráficos que representan los resultados de los experimentos que ilustran que los linfocitos T electroporados con ARN-Bis de Blina solo fueron más sensibles y mostraron una mayor persistencia de actividad antitumoral que los linfocitos T electroporados con ARN del CAR de CD19. Los linfocitos T electroporados con ARN-Bis de Blina a 1 µg, 5 µg o 10 µg se compararon con los linfocitos T electroporados con ARN CD19BBZ (19OF) a 10 µg. En varios días después de la electroporación, se realizó el ensayo CD107a después de que esos linfocitos T se estimularon con líneas celulares CD19+ (Naln6, K562-CD19 o Raji), o con la línea celular K562 negativa para CD19 como control. La Figura 9A muestra la expresión de CD107a en los días 3, 8 y 12 respectivamente. La figura 9B muestra la intensidad de fluorescencia media (IFM) y el porcentaje de expresión de CD107a en diferentes días después de la electroporación. La Figura 9B demuestra una mayor sensibilidad y una mayor persistencia funcional *in vitro* de los linfocitos T electroporados con ARN de CD19-CD3 (Blina), en comparación con linfocitos T con ARN del CAR.

La Figura 10 es una serie de gráficos que muestran los resultados de los experimentos que ilustran que los linfocitos T electroporados con un ARN-Bis que contiene scFv de CD19 humano (Blina-D4) funcionan igual de bien que los linfocitos T con ARN-Bis de Blina. Linfocitos T electroporados con ARN-Bis Blina-D4 a 10 µg o 20 µg, o con 10 µg de ARN-Bis de Blina y sometidos a tinción del CAR (Fab anti-IgG de ratón), panel superior (día 1 después de la electroporación) y tinción Cd107a (panel inferior).

La Figura 11, que comprende la Figura 11A y la Figura 11B, es una serie de gráficos que representan los resultados de los experimentos que ilustran que los linfocitos T electroporados con ARN-Bis contra mesotelina, cMet o PSCA funcionaron igualmente, así como los linfocitos T electroporados con ARN del CAR. Los linfocitos T electroporados con 10 µg de ARN-Bis de ss1HL-Blina, o ss1LH-Blina, o cMet-Blina, o PSCA-Blina o GD2-Blina, se compararon con los linfocitos T electroporados con 10 µg de ARN del CAR de GD2.BBZ, ss1BBZ (ss1.OF), o cMetBBZ, o PSCA.BBZ. La Figura 11A muestra los resultados de la tinción de CAR (Fab anti-IgG de ratón) de las células 1 día después de la electroporación (hay que tener en cuenta que CAR de cMet es un scFv de origen humano). La Figura 11B muestra los resultados de la tinción de Cd107a (CD8+ cerrada).

Descripción detallada

El objeto de la presente invención es como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere a composiciones, métodos para generar linfocitos T modificados y su uso en un método: para tratar el cáncer, incluyendo, pero sin limitación, neoplasias hemáticas y tumores sólidos. La presente invención se refiere a una estrategia de transferencia celular adoptiva de linfocitos T modificados para expresar un anticuerpo biespecífico y modificados para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los linfocitos T se modifican para expresar un anticuerpo biespecífico como se define en las reivindicaciones adjuntas. Un anticuerpo biespecífico comprende dos especificidades de unión diferentes y, por lo tanto, se une a dos antígenos diferentes. El anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de reconocimiento de antígeno que se une a un primer antígeno y un segundo dominio de reconocimiento de antígeno que se une a un segundo antígeno.

5 El primer dominio de reconocimiento de antígeno se une al antígeno CD19 humano asociado a tumor. La segunda región de reconocimiento de antígeno se une a CD3 en los linfocitos T. En una realización, la invención se refiere a la transferencia celular adoptiva de linfocitos T modificados para expresar un anticuerpo biespecífico humano o humanizado.

10 Los linfocitos T se modifican para expresar un CAR como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los CAR son moléculas que combinan la especificidad basada en anticuerpos para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) con un dominio intracelular que activa el receptor de linfocitos T para generar una proteína quimérica que exhibe una actividad inmunitaria celular antitumoral específica. En una realización, la invención se refiere a la transferencia celular adoptiva de linfocitos T modificados para expresar un CAR humano o humanizado.

15 En otra realización, la invención se refiere a la transferencia celular adoptiva de linfocitos T modificados para expresar un anticuerpo biespecífico y un receptor de antígeno quimérico (CAR).

20 En general, se divulga el uso de linfocitos T genéticamente modificados para expresar un CAR deseado. La presente invención se refiere al uso de linfocitos T genéticamente modificados para expresar un CAR deseado en combinación con un anticuerpo biespecífico deseado. Los linfocitos T que expresan un CAR se denominan en el presente documento linfocitos T CAR o linfocitos T modificados con CAR. Preferentemente, la célula se puede modificar genéticamente para expresar un dominio de unión a anticuerpo en su superficie, lo que confiere una especificidad de antígeno novedosa que es independiente del MHC. En algunos casos, el linfocito T se modifica genéticamente para expresar un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta o proteína FcγRI en una sola proteína quimérica. En algunos casos, el linfocito T CAR se modifica genéticamente para expresar un CAR que combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de la cadena CD3-zeta o proteína FcγRI en una sola proteína quimérica, así como un anticuerpo biespecífico.

30 El CAR de la invención comprende un dominio extracelular que tiene un dominio de reconocimiento de antígeno, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico como se define en las reivindicaciones adjuntas. En una realización, el CAR puede comprender un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo. En una realización, el CAR puede comprender un anticuerpo humano, o un fragmento del mismo. En un aspecto, se utiliza el dominio transmembrana que se asocia de forma natural a uno de los dominios en el CAR. En otro aspecto, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana superficial para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. En algunos aspectos, el dominio extracelular también comprende un dominio de bisagra. Preferentemente, el dominio de bisagra comprende el dominio de bisagra CD8α.

45 Con respecto al dominio citoplásmico, el CAR de la invención se puede diseñar para comprender cualquier dominio citoplásmico deseado útil en el contexto del CAR de la invención. El dominio citoplásmico del CAR comprende el dominio de señalización de CD3-zeta. En una realización, el dominio citoplásmico del CAR se puede diseñar para comprender además los dominios de señalización de 4-1BB y/o CD28. Por ejemplo, el dominio citoplásmico del CAR puede incluir, pero sin limitación, módulos de señalización CD3-zeta, 4-1BB y CD28 y combinaciones de los mismos. En consecuencia, se divulgan linfocitos T CAR del arc y su uso para la terapia adoptiva.

50 Los linfocitos T se modifican para expresar un anticuerpo biespecífico, en combinación con un CAR como se define en las reivindicaciones adjuntas. En una realización, la expresión conjunta del anticuerpo biespecífico y el CAR mejora el reconocimiento tumoral y la lisis tumoral.

55 En una divulgación, los linfocitos T modificados se pueden generar mediante la introducción de un vector lentivírico que comprende un anticuerpo biespecífico deseado en un linfocito T. En una divulgación, los linfocitos T modificados se pueden generar mediante la introducción de un vector lentivírico que comprende un CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende dominios de señalización anti-CD19, bisagra CD8α y CD3zeta en un linfocito T. En una realización, los linfocitos T modificados de la invención se pueden generar mediante la introducción de un vector lentivírico que comprende un anticuerpo biespecífico deseado en combinación con un vector lentivírico que comprende un CAR deseado en un linfocito T. En otra realización, los linfocitos T modificados de la invención se pueden generar mediante la introducción de un vector lentivírico que comprende un CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende dominios de señalización anti-CD19, bisagra CD8α y Cd3zeta, y un anticuerpo biespecífico deseado en un linfocito T. En una realización, los linfocitos T modificados de la invención son capaces de replicarse *in vivo* dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control tumoral sostenido.

65 En una divulgación, los linfocitos T modificados se pueden generar mediante la transfección de un ARN que codifica un anticuerpo biespecífico deseado en un linfocito T. En una divulgación, los linfocitos T modificados se pueden

generar mediante la transfección de un ARN que codifica un CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende dominios de señalización anti-CD19, bisagra CD8 α y CD3zeta en un linfocito T. En una realización, los linfocitos T modificados de la invención se pueden generar mediante la transfección de un ARN que codifica un anticuerpo biespecífico deseado en combinación con un ARN que codifica el CAR deseado en un linfocito T. En otra realización, los linfocitos T modificados de la invención se pueden generar mediante la transfección de un ARN que codifica el CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende dominios de señalización anti-CD19, bisagra CD8 α y Cd3zeta, y que codifica además un anticuerpo biespecífico deseado en las células. En una realización, tanto el CAR como el anticuerpo biespecífico se expresan transitoriamente en los linfocitos T genéticamente modificados.

En una realización, los linfocitos T modificados de la invención se pueden generar mediante la transfección de un ARN que codifica el CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende dominios de señalización anti-CD19, bisagra CD8 α y CD3zeta en un linfocito T, y que introduce un vector lentivírico que comprende el anticuerpo biespecífico deseado. En otra realización, los linfocitos T modificados de la invención se pueden generar mediante la introducción de un vector lentivírico que comprende un CAR deseado, por ejemplo, un CAR que comprende dominios de señalización anti-CD19, bisagra CD8 α y Cd3zeta en un linfocito T, y la transfección de un ARN que codifica un anticuerpo biespecífico deseado en la célula.

En una realización, la invención se refiere a un linfocito T modificado genéticamente, como se define en las reivindicaciones adjuntas, que expresa un anticuerpo biespecífico humanizado y un CAR humanizado para su uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene cáncer usando infusión de linfocitos. En otra realización, la invención se refiere a un linfocito T modificado genéticamente, como se define en las reivindicaciones adjuntas, que expresa un anticuerpo biespecífico, un CAR o una combinación de los mismos para su uso en un método de tratamiento del cáncer usando infusión de linfocitos. Preferentemente, la infusión de linfocitos autólogos se usa en el tratamiento. Las PBMC autólogas se recogen de un paciente que necesita tratamiento y los linfocitos T se activan y expanden usando los métodos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica y luego se infunden nuevamente en el paciente.

En una realización, la invención se refiere a un CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas, que comprende anticuerpos humanos o humanizados, o fragmentos de los mismos. En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico, como se define en las reivindicaciones adjuntas, que comprende anticuerpos humanos o humanizados, o fragmentos de los mismos. La invención se basa en el descubrimiento de que las construcciones procedentes de anticuerpos humanos o humanizados reconocen específicamente los antígenos tumorales. Por tanto, dichas construcciones humanas o humanizadas se pueden usar para tratar cánceres y otros trastornos y evitar el riesgo de inducir una respuesta inmunitaria.

En una realización, la invención se refiere a linfocitos T genéticamente modificados que expresan un CAR y un anticuerpo biespecífico, como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se basa en el hallazgo de que la expresión conjunta de un CAR y un anticuerpo biespecífico aumentó significativamente la reactividad tumoral y la lisis tumoral. Adicionalmente, la inducción de linfocitos T para producir un CAR y un anticuerpo biespecífico recluta linfocitos T no reactivos para volverse reactivos a tumores.

Esto permite un método para localizar la administración de agentes antitumorales al microambiente específico del tumor utilizando linfocitos T. En una realización, los linfocitos T CAR transportan el anticuerpo biespecífico al sitio del tumor, reduciendo así la toxicidad asociada con la administración sistémica de anticuerpos biespecíficos.

En una divulgación, la solicitud se refiere a linfocitos T genéticamente modificados que expresan un anticuerpo biespecífico. La presente invención se basa en parte en el hallazgo de que un linfocito T modificado para expresar un anticuerpo biespecífico se realiza igual de bien que un linfocito T modificado para expresar un CAR.

En otra divulgación, la solicitud se refiere generalmente al tratamiento de un paciente con riesgo de desarrollar cáncer. La invención también incluye usos en el tratamiento de una neoplasia maligna en la que la quimioterapia y/o inmunoterapia en un paciente da como resultado una inmunosupresión significativa en el paciente, aumentando así el riesgo de que el paciente desarrolle cáncer.

La divulgación incluye el uso de linfocitos T que expresan un CAR anti-CD19 y un anticuerpo biespecífico. Los linfocitos T que expresan el CAR anti-CD19 y el anticuerpo biespecífico, como se define en las reivindicaciones adjuntas, muestran un mayor reconocimiento tumoral y actividad lítica tumoral en comparación con los linfocitos T que expresan el CAR anti-CD19. En algunos casos, los linfocitos T modificados de la invención infundidos en un paciente pueden eliminar células cancerosas *in vivo* en pacientes con cáncer.

Definiciones

A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque en la práctica para el análisis de la invención también se puede usar cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen en el presente

documento los materiales y métodos preferentes. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante.

Los artículos "un" y "uno/a" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

"Aproximadamente", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$, y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

"Activación", como se usa en el presente documento, se refiere al estado de un linfocito T que ha sido suficientemente estimulado para inducir una proliferación celular detectable. La activación también puede estar asociada con la producción inducida de citocinas y funciones efectoras detectables. La expresión "linfocitos T activados" se refiere, entre otras cosas, a los linfocitos T que están en división celular.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas procedentes de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son normalmente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, en: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, en: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426).

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Una "cadena pesada de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus configuraciones de origen natural.

Una "cadena ligera de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere al menor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus configuraciones de origen natural. Las cadenas ligeras κ y λ se refieren a los dos isotipos principales de cadena ligera de los anticuerpos.

Un "anticuerpo biespecífico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. En una divulgación, los epítopos son del mismo antígeno. En otra realización, los epítopos son de dos antígenos diferentes. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden producir de forma recombinante usando la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Milstein et al. (1983) *Nature* 305: 537-39. Como alternativa, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Véase, por ejemplo, Brennan et al. (1985) *Science* 229:81. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Véase, por ejemplo, Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48, Gruber et al. (1994) *J. Immunol.* 152:5368.

Por la expresión "anticuerpo sintético", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado mediante un bacteriófago como se describe en el presente documento. La expresión también debe interpretarse como un anticuerpo que ha sido generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y que la molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido usando tecnología de ADN sintético o de secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

El término "antígeno" o "Ag", como se usa en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la materia comprenderá que cualquier macromolécula, incluidas prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Adicionalmente, los antígenos pueden proceder de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia comprenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos

parcial que codifica una proteína que provoca una respuesta inmunitaria, por lo tanto, codifica un "antígeno" como se usa ese término en el presente documento. Adicionalmente, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es evidente que la presente invención contempla el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en varias combinaciones para provocar la respuesta inmunitaria deseada. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es evidente que un antígeno se puede generar sintetizado o proceder de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero sin limitación, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un líquido biológico.

La expresión "efecto antitumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar mediante una disminución en el volumen tumoral, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida o mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar mediante la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención en la prevención de la aparición de tumores en primer lugar.

El término "autoantígeno" significa, de acuerdo con la presente invención, cualquier autoantígeno que el sistema inmunitario reconozca como extraño. Los autoantígenos comprenden, pero sin limitación, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de la superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glucoproteínas, incluyendo receptores de superficie celular.

La expresión "enfermedad autoinmunitaria", como se usa en el presente documento, se define como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmunitaria. Una enfermedad autoinmunitaria es el resultado de una respuesta inapropiada y excesiva a un autoantígeno. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, parotiditis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes (Tipo I), epidermólisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa, colitis ulcerativa, entre otros.

Como se usa en el presente documento, el término "autólogo" se refiere a cualquier material procedente del mismo individuo al que luego se reintroduce en el individuo.

"Alogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal diferente de la misma especie.

"Xenogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal de una especie diferente.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de varios cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

El "ligando coestimulador" como se usa el término en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, célula dendrítica, linfocito B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora relacionada en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media en una respuesta de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (Intercellular Adhesion Molecule, ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (Lymphocyte function-associated antigen, LFA-1.), CD2, CD7, LIGHT, NK.G2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83.

Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo en una respuesta coestimuladora mediante el linfocito T, tal como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

Una "señal coestimuladora", como se usa en el presente documento, se refiere a una señal, que, en combinación con una señal primaria, tal como la unión de TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o aumento o disminución de moléculas clave.

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal donde el animal no puede mantener la homeostasis y donde si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa deteriorándose. En cambio, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no necesariamente causa una disminución adicional en el estado de salud del animal.

Una "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico.

"Codificante" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y, por lo general, se proporciona en listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, se pueden denominar codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Como se usa en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

Como se usa en el presente documento, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por su promotor.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción *cis* para la expresión; la célula hospedadora puede suministrar otros elementos para la expresión o pueden suministrarse en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos aquellos conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

"Homólogo" se refiere a la similitud de secuencia o identidad de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad de monómero de aminoácido, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas X 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes u homólogas, entonces las dos secuencias son un 60 % homólogas. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten un 50 % de homología. En general, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para proporcionar la máxima homología.

El término "inmunoglobulina" o "Ig", como se usa en el presente documento, se define como una clase de proteínas, que funcionan como anticuerpos. Los anticuerpos expresados por los linfocitos B a veces se denominan BCR (receptor de linfocitos B) o receptor de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el anticuerpo primario que está presente en las secreciones corporales, tales como saliva, lágrimas, leche materna, secreciones gastrointestinales y secreciones de moco de las vías respiratorias y genitourinarias. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmunitaria primaria en la mayoría de los sujetos. Es la inmunoglobulina más eficaz en aglutinación, fijación de complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene una función de anticuerpo conocida, pero puede servir como un receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata al provocar la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos tras la exposición al alérgeno.

Como se usa en el presente documento, un "material de formación" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de formación del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que

contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Como alternativa, el material de formación puede enviarse por separado desde el recipiente con la intención de que el material de formación y el compuesto se utilicen cooperativamente por el receptor.

"Aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Una molécula de ácido nucleico o proteína aislada puede existir en forma sustancialmente purificada o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

En el ámbito de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácido nucleico que se producen comúnmente. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a la citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina, y "U" se refiere a uridina.

Salvo que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener, en alguna versión, uno o más intrones.

Un "lentivirus", como se usa en el presente documento, se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus en la capacidad de infectar células que no se dividen; pueden administrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula hospedadora, por lo que son uno de los métodos más eficaces de un vector de administración de genes. El VIH, SIV y FIV son ejemplos de lentivirus. Los vectores procedentes de lentivirus ofrecen los medios para lograr niveles significativos de transferencia génica *in vivo*.

Por el término "modulación", como se usa en el presente documento, se entiende la mediación de un aumento o disminución detectable en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico pero no tratado. El término abarca perturbar y/o afectar una señal o respuesta nativa, por lo tanto, la mediación de una respuesta terapéutica beneficiosa en un sujeto, preferentemente, un ser humano.

Salvo que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

La expresión "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son arc contiguos y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteína, están en el mismo marco de lectura.

El término antígeno tumoral "sobrexexpresado" o "sobrexexpresión" de un antígeno tumoral está destinado a indicar un nivel anormal de expresión de un antígeno tumoral en una célula de un área de enfermedad como un tumor sólido dentro de un tejido u órgano específico del paciente en relación con el nivel de expresión en una célula normal de ese tejido u órgano. Los pacientes que tienen tumores sólidos o una neoplasia hemática caracterizada por la sobreexpresión del antígeno tumoral se pueden determinar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, o técnicas de infusión.

Los términos "paciente", "sujeto", "individuo", y similares se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a cualquier animal, o células del mismo, *in vitro* o *in situ*, susceptibles de los métodos descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el paciente, sujeto o individuo es un ser humano.

El término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se define como una cadena de nucleótidos. Adicionalmente, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por tanto, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos, como se usan en el presente documento, son intercambiables. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se usa en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen mediante cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando

tecnología de clonación ordinaria y PCR, y similares, y mediante medios sintéticos.

Como se usa en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto comprendido por restos de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se limita el número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos.

Como se usa en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica proteínas, de las cuales existen muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

El término "promotor", como se usa en el presente documento, se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede, por ejemplo, ser una que exprese el producto génico de una manera específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula en la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la célula.

Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo tisular correspondiente al promotor.

Por la expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, se entiende un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies. Pero, dicha reactividad entre especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, las expresiones "unión específica" o "que se une específicamente", se pueden usar en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general. En caso de que un anticuerpo sea específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

Por el término "estimulación", se entiende una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (*por ejemplo*, un complejo TCR/CD3) con su ligando afin mediando así un evento de transducción de señal, tal como, pero sin limitación, transducción de señal a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de determinadas moléculas, tal como la disminución de TGF- β , y/o la reorganización de las estructuras del citoesqueleto, y similares.

Una "molécula estimuladora", como se usa el término en el presente documento, significa una molécula en un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulante relacionado presente en una célula presentadora de antígeno.

Un "ligando estimulador", como se usa en el presente documento, significa un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (*por ejemplo*, una aAPC, una célula dendrítica, un linfocito B y similares) se

puede unir específicamente con un compañero de unión afín (referido en el presente documento como una "molécula estimuladora") en un linfocito T, mediando de este modo en una respuesta primaria mediante el linfocito T, incluyendo, pero sin limitación, activación, iniciación de una respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Los ligandos estimuladores son bien conocidos en la técnica y comprenden, entre otras cosas, una molécula del MHC de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo superagonista anti-CD28 y un anticuerpo superagonista anti-CD2.

El término "sujeto", "paciente" e "individuo" se usan indistintamente en el presente documento y pretenden incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos). Ejemplos de sujeto incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos.

Como se usa en el presente documento, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos de células con la que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, esta expresión se refiere simplemente a las células que se han separado de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan *in vitro*. En otros aspectos, las células no se cultivan *in vitro*.

El término "terapéutico", como se usa en el presente documento, significa un tratamiento y/o profilaxis. Se obtiene un efecto terapéutico mediante supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto objeto que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema o sujeto que está buscando el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye que la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para evitar el desarrollo de, o aliviar en cierta medida, uno o más de los signos o síntomas del trastorno o enfermedad que se está tratando. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad y la edad, el peso, etc., del sujeto que se va a tratar.

"Tratar" una enfermedad, como se usa el término en el presente documento, significa reducir la frecuencia o gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso mediante el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o introduce en la célula hospedadora. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es aquella que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula sujeto principal y su progenie.

La frase "bajo control transcripcional" o "unido operativamente", como se usa en el presente documento, significa que el promotor está en la ubicación y orientación correcta en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede usar para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector" incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plasmídicos y no víricos que faciliten la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores asociados con adenovirus, vectores víricos y similares.

Intervalos: a lo largo de esta divulgación, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. En consecuencia, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos específicamente divulgados tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

La presente invención proporciona composiciones, métodos para generar linfocitos T modificados y su uso en un método para tratar el cáncer como se establece en las reivindicaciones. El cáncer puede ser una neoplasia hemática, un tumor sólido, un tumor primario o metastásico.

Además se divulga una célula (por ejemplo, linfocito T) modificada por ingeniería genética para expresar un CAR donde el linfocito T CAR presenta una propiedad antitumoral.

En una divulgación, el CAR es un CAR humanizado. El CAR de la invención se puede modificar por ingeniería genética para comprender un dominio extracelular que tiene un dominio de unión a antígeno fusionado a un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo receptor de antígeno de linfocitos T (por ejemplo, CD3 zeta). El CAR de la invención cuando se expresa en un linfocito T es capaz de redirigir el reconocimiento de antígeno basado en la especificidad de unión al antígeno. Un antígeno ejemplar es CD19 porque este antígeno se expresa en linfomas de linfocitos B.

La solicitud divulga cualquier dominio de unión a antígeno que, cuando se une a su antígeno afín, afecta a una célula tumoral de modo que la célula tumoral deja de crecer, se le induce a morir o se ve afectada de otro modo para que la carga tumoral en un paciente disminuya o se elimine. El dominio de unión a antígeno se fusiona preferentemente con un dominio intracelular de una o más de una molécula coestimuladora y una cadena zeta. Preferentemente, el dominio de unión a antígeno se fusiona con uno o más dominios intracelulares seleccionados del grupo de un dominio de señalización de CD137 (4-1BB), un dominio de señalización de CD28, un dominio de señal de CD3zeta y cualquier combinación de los mismos.

Además se divulga un linfocito T modificado por ingeniería genética para expresar un anticuerpo biespecífico. En una divulgación, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo humano, o un fragmento del mismo. En una divulgación, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo. El anticuerpo biespecífico comprende dos especificidades de unión diferentes. En una divulgación, el anticuerpo biespecífico comprende una región que se une a un antígeno tumoral. En una divulgación, el anticuerpo biespecífico comprende una región que se une a un antígeno de linfocitos T. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo biespecífico se une a CD3.

En una realización, la invención proporciona un linfocito T modificado por ingeniería genética para expresar un CAR y un anticuerpo biespecífico, como se define en las reivindicaciones adjuntas. En algunas realizaciones, el CAR es un CAR humanizado. El anticuerpo biespecífico reconoce el mismo antígeno que reconoce el CAR. En otras divulgaciones, el anticuerpo biespecífico reconoce un antígeno diferente. La presente invención se basa en el descubrimiento de que los linfocitos T modificados para expresar tanto un CAR como un anticuerpo biespecífico muestran un reconocimiento tumoral mejorado y una actividad lítica tumoral. Adicionalmente, la expresión conjunta o introducción conjunta de un CAR y un anticuerpo biespecífico permite que los linfocitos T no reactivos se vuelvan reactivos a los tumores. Por tanto, la presente divulgación proporciona la administración específica del anticuerpo biespecífico a un microambiente tumoral, aliviando así la toxicidad asociada con la administración sistémica de anticuerpos biespecíficos.

En algunas realizaciones, la presente invención se dirige a vectores lentivíricos, como se define en las reivindicaciones adjuntas, que codifican un CAR y/o anticuerpo biespecífico que se integra de manera estable en un linfocito T y se expresa de manera estable en el mismo. La divulgación también se dirige al ARN que codifica un CAR y/o un anticuerpo biespecífico que se transfecta en un linfocito T y se expresa de forma transitoria en el mismo. La expresión transitoria no integrada del CAR y el anticuerpo biespecífico en una célula mitiga las preocupaciones asociadas con la expresión permanente e integrada en una célula.

En algunas realizaciones, la presente invención incluye la introducción de un anticuerpo biespecífico junto con un CAR de CD19, como se define en las reivindicaciones adjuntas, con el fin de mejorar la actividad antitumoral del linfocito T modificado por ingeniería genética mediante el CAR. En un aspecto, el anticuerpo biespecífico está en forma de ARN. En otro aspecto, el CAR de CD19 está en forma de ARN.

En otra realización más, el anticuerpo biespecífico y el CAR de CD19, como se define en las reivindicaciones adjuntas, están en forma de ARN.

En una realización, la introducción de ARN de anticuerpos biespecíficos, como se define en las reivindicaciones adjuntas, junto con los CAR de CD19 mejora la actividad antitumoral de los linfocitos T modificado por ingeniería genética por CAR. Adicionalmente, la introducción de ARN de anticuerpos biespecíficos en los linfocitos T recluta linfocitos T no reactivos al tumor para volverse reactivos al tumor, lo que proporciona una nueva forma de administrar y transportar un fármaco antitumoral en pacientes con cáncer mediante el uso de linfocitos T. Esto reduce la toxicidad de los BiTE sistémicos, mediante el enfoque de la administración del anticuerpo biespecífico al microambiente tumoral en virtud del linfocito T CAR que transporta la carga (BiTE) al sitio del tumor.

Composiciones

La presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas, implica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio extracelular e intracelular. En algunas realizaciones, el CAR de la invención está humanizado. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de diana, también denominado dominio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el dominio extracelular también comprende un dominio de

bisagra. El dominio intracelular o, de otro modo, el dominio citoplásmico comprende una región de señalización coestimuladora y una porción de cadena zeta. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígeno o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de los linfocitos al antígeno.

Entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana del CAR, o entre el dominio citoplásmico y el dominio transmembrana del CAR, puede incorporarse un dominio espaciador. Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio espaciador" generalmente significa cualquier oligo o polipéptido que funciona para unir el dominio transmembrana a, tanto el dominio extracelular como, el dominio citoplásmico, en la cadena polipeptídica. Un dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y mucho más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos.

La presente invención incluye construcciones de vectores lentivíricos que expresan un CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas, que pueden transducirse directamente en una célula. La presente invención también se refiere a una construcción de ARN que se puede transfectar directamente en una célula. Un método para generar ARNm para su uso en la transfección implica la transcripción *in vitro* (In Vitro Transcription, IVT) de una plantilla con cebadores especialmente diseñados, seguida de la adición de poliA, para producir una construcción que contiene la secuencia no traducida (Untranslated Sequence, "UTR") en 3' y 5', una caperuza en 5' y/o sitio interno de entrada al ribosoma (Internal Ribosome Entry Site, IRES), el gen que se va a expresar y una cola de PoliA, normalmente de 50 a 2000 bases de longitud. El ARN así producido puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En un aspecto, la plantilla incluye secuencias para el CAR.

Preferentemente, el CAR comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. El dominio extracelular y el dominio transmembrana pueden proceder de cualquier fuente deseada de dichos dominios. En algunos casos, el dominio de bisagra del CAR de la invención comprende el dominio de bisagra de CD8 α . En una realización, el CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de 20-21. En una divulgación, el CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 22. En una realización, el CAR comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las SE ID NO: 20-21. En una divulgación, el CAR comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 22.

El CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas, comprende un elemento de unión específico a diana al que se hace referencia como un dominio de unión a antígeno. La elección de la fracción depende del tipo y el número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con una patología particular. Así, los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de la fracción antigénica en el CAR incluyen aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.

El CAR, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, se puede modificar por ingeniería genética para atacar un antígeno tumoral de interés mediante la genomanipulación de un dominio de unión a antígeno deseado que se una específicamente a un antígeno en una célula tumoral. En el ámbito de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo", se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos como el cáncer. Los antígenos discutidos en el presente documento se incluyen simplemente a modo de ejemplo. La lista no pretende ser exclusiva y más ejemplos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Los antígenos tumorales son proteínas producidas por células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria, particularmente, respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T. La selección del dominio de unión a antígeno dependerá del tipo particular de cáncer a tratar. Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (Carcinoembryonic Antigen, CEA), gonadotropina coriónica humana β , alfafetoproteína (AFP), AFP sensible a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxilo esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno prostático específico (Prostate-Specific Antigen, PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteína, PSMA, HER2/neu, survivina y telomerasa, antígeno 1 de tumor de carcinoma prostático (Prostate-Carcinoma Tumor Antigen-1, PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, ephrinB2, CD22, factor de crecimiento de insulina (Insulin Growth Factor, IGF-I, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina. Como se discute anteriormente en el presente documento, el antígeno tumoral, de acuerdo con la invención, es el CD19 humano.

El tipo de antígeno tumoral divulgado en el presente documento puede ser un antígeno específico de tumor (Tumor-Specific Antigen, TSA) o un antígeno asociado a tumor (Tumor-Associated Antigen, TAA). Un TSA es exclusivo de células tumorales y no ocurre en otras células del cuerpo. Un antígeno asociado a TAA no es exclusivo de una célula tumoral y, en cambio, también se expresa en una célula normal en condiciones que no inducen un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor puede ocurrir en condiciones que permiten que el sistema inmunitario responda al antígeno. Los TAA 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 en niveles mucho más altos en células tumorales.

- 5 Los ejemplos no limitantes de antígenos TSA o TAA incluyen los siguientes: Antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y antígenos multilíneaje específicos de tumor tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados tales como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos víricos, tales como los antígenos del virus Epstein Barr (Epstein Barr Virus Antigens, EBVA) y los antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH). Otros antígenos grandes basados en proteínas 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\PI, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, proteína de unión a TA-90\Mac-2\proteína asociada a la ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS. La porción del dominio de unión a antígeno del CAR se dirige al antígeno CD19, como se define en las reivindicaciones adjuntas. Además se divulga la porción del dominio de unión a antígeno de los CAR que se dirigen a un antígeno que incluye, pero sin limitación, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33\IL3Ra, c-Met, PSMA, glucolípido F77, EGFRvIII, GD-2, TCR de MY-ESO-1, TCR de MAGE A3, y similares.

Dependiendo del antígeno deseado a ser dirigido, el CAR se puede modificar por ingeniería genética para incluir la fracción de unión a antígeno apropiada que sea específica para la diana de antígeno deseada. Por ejemplo, dado que CD19 es el antígeno deseado que se va a dirigir, se puede usar un anticuerpo para CD19 como la fracción de unión a antígeno para su incorporación en el CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas. La porción del dominio de unión a antígeno del CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas, se dirige a CD19.

El dominio de unión a antígeno puede ser cualquier dominio que se una al antígeno, incluidos, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y fragmentos de los mismos. En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a antígeno proceda de la misma especie en la que finalmente se utilizará el CAR. Por ejemplo, para su uso en seres humanos, puede ser beneficioso para el dominio de unión a antígeno del CAR comprender un anticuerpo humano o fragmento del mismo. Por tanto, en una realización, la porción del dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo humano o un fragmento del mismo. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno de SEQ ID NO: 20 es completamente de origen humano.

Para el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos, puede ser preferible usar anticuerpos humanos. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo los métodos de presentación en fagos usando bibliotecas de anticuerpos procedentes de secuencias de inmunoglobulina humana, que incluyen mejoras a estas técnicas. Véase, también, las patentes de Estados Unidos n.º 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Un anticuerpo humano también puede ser un anticuerpo donde las cadenas pesada y ligera están codificadas por una secuencia de nucleótidos procedente de una o más fuentes de ADN humano.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían luego para producir descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos anti-CD19 dirigidos contra el antígeno CD19 humano se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana hospedados por los ratones transgénicos se redisponen durante la diferenciación de los linfocitos B y experimentan posteriormente cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles, incluyendo, pero sin limitación, IgG1 (gamma 1) e IgG3. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase, Lonberg y Huszar (Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)). Para una descripción

detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, las publicaciones PCT números WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y las Patentes de Estados Unidos n.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; y 5.939.598. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, California) y Genpharm (San Jose, California) pueden participar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente. Para una descripción específica sobre la transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal que dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el desafío al antígeno véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); y Duchosal et al., Nature, 355:258 (1992).

Los anticuerpos humanos también pueden proceder de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al., Nature Biotech., 14:309 (1996)). La tecnología de visualización de fagos (McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína recubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una serie de diversos anticuerpos antioxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V procedentes de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), o Griffith et al., EMBO J., 12:725-734 (1993). Véase, también, las patentes de Estados Unidos n.º 5.565.332 y 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante linfocitos B activados *in vitro* (véase, las patentes de Estados Unidos n.º 5.567.610 y 5.229.275). Los anticuerpos humanos también pueden generarse *in vitro* usando técnicas de hibridoma tales como, pero sin limitación, las descritas por Roder et al. (Methods Enzymol., 121:140-167 (1986)).

Como alternativa, un anticuerpo no humano se humaniza, donde las secuencias o regiones específicas del anticuerpo se modifican para aumentar la similitud con un anticuerpo producido naturalmente en un ser humano. En un aspecto, la porción de dominio de unión a antígeno se humaniza. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno de SEQ ID NO: 21 está humanizado.

Un anticuerpo humanizado se puede producir usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, injerto con CDR (véase, por ejemplo, patente europea n.º EP 239.400; la Publicación Internacional n.º WO 91/09967; y las patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), enchapado o rebarnizado (véase, por ejemplo, las patentes europeas n.º EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973, transposiciones de cadenas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.565.332), y técnicas divulgadas en, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º US2005/0042664, la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º US2005/0048617, la patente de Estados Unidos n.º 6.407.213, la patente de Estados Unidos n.º 5.766.886, la Publicación Internacional n.º WO 9317105, Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002)), Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994), y Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994). A menudo, los restos marco en las regiones marco se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para modificar, preferentemente, mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región marco conservada se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la modelización de las interacciones de los restos de CDR y de la región marco conservada para identificar los restos marco importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar los restos marco poco habituales en posiciones específicas. (Véase, por ejemplo, Queen et al., la patente de Estados Unidos n.º 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323).

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". Por tanto, los anticuerpos humanizados comprenden uno o más CDR de moléculas de inmunoglobulina no humanas y regiones marco de seres humanos. La humanización de los

anticuerpos es bien conocida en la técnica y se puede realizar prácticamente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedores por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano, es decir, injerto de CDR (documento EP 239.400; Publicación Internacional n.º WO 91/09967; y Patentes de Estados Unidos n.º 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6,548,640). En dichos anticuerpos quiméricos humanizados, se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor. La humanización de los anticuerpos también se puede lograr mediante enchapado o rebarnizado (Documento EP 592.106; documento EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994); y Roguska et al., *PNAS*, 91:969-973 (1994)) o transposición de cadenas (Patente de Estados Unidos n.º 5.565.332).

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la preparación de los anticuerpos humanizados es para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina respecto a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa un marco particular procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligera o pesada. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Los anticuerpos se pueden humanizar con la retención de alta afinidad para el antígeno diana y otras propiedades biológicas favorables. De acuerdo con un aspecto, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles habitualmente y son familiares para aquellos expertos en la técnica. Se dispone de programas informáticos que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite un análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al antígeno diana. De este modo, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el antígeno diana. En general, los restos de la CDR están implicados directa y más sustancialmente en influenciar la unión al antígeno.

Un anticuerpo "humanizado" retiene una especificidad antigénica similar al anticuerpo original, es decir, en la presente invención, la capacidad de unirse al antígeno CD19 humano. Sin embargo, usando determinados métodos de humanización, la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo para el antígeno CD19 humano puede aumentarse usando métodos de "evolución dirigida", como describe Wu et al., *J. Mol. Biol.*, 294:151 (1999).

Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, el CAR puede diseñarse para comprender un dominio transmembrana que se fusione con el dominio extracelular del CAR. En un aspecto, se utiliza el dominio transmembrana que se asocia de forma natural a uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana superficial para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

El dominio transmembrana puede proceder de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede proceder de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana de uso particular en esta invención pueden proceder de (es decir, comprender al menos la región (regiones) transmembrana 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, ICOS. Como alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá predominantemente restos hidrófobos tales como leucina y valina. Preferentemente, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplásmico del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador en particular adecuado.

Dominio citoplásmico

El dominio citoplásmico o de otro modo el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención es

responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha colocado el CAR. La expresión "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, incluida la secreción de citocinas. Por tanto, la expresión "dominio de señalización intracelular" se refiere a la parte de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige la célula para realizar una función especializada. Aunque generalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar la cadena completa. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de función efectora. Por lo tanto, la expresión dominio de señalización intracelular está destinada a 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 de la invención incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de linfocitos T (T cell Receptor, TCR) y los correceptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después de la activación del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación total del linfocito T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por tanto, se puede decir que la activación de los linfocitos T está mediada por dos clases distintas de secuencia de señalización citoplásmica: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplásmicas primarias) y las que actúan de manera independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplásmicas secundarias).

Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias regulan la activación primaria del complejo TCR, ya sea de manera estimulante o inhibitoria. Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina o ITAM.

Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplásmicas primarias que son de uso particular en la invención incluyen las procedentes de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. La molécula de señalización citoplásmica en el CAR de la invención comprende una secuencia de señalización citoplásmica procedente de CD3 zeta.

En una realización preferida, el dominio citoplásmico del CAR se puede diseñar para comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o combinarse con cualquier otro dominio (dominios) citoplásmico deseado útil en el contexto del CAR de la invención. Por ejemplo, el dominio citoplásmico del CAR puede comprender una porción de cadena de CD3 zeta y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que es necesaria para una respuesta eficaz de los linfocitos a un antígeno. Entre dichas moléculas 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 con CD83 y similares. Por tanto, aunque la invención se ejemplifica principalmente con 4-1BB como elemento de señalización coestimulador, otros elementos coestimuladores están dentro del alcance de la invención.

Las secuencias de señalización citoplásmicas dentro de la porción de señalización citoplásmica del CAR de la invención pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o específico. Opcionalmente, un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud puede formar la unión. Un doblete glicina-serina proporciona un enlazador en particular adecuado.

En una realización, el dominio citoplásmico está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta. En otra realización, el dominio citoplásmico está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB.

Anticuerpos biespecíficos

La presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas, también implica un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico comprende dos especificidades de unión diferentes y, por lo tanto, se une a dos antígenos diferentes. El anticuerpo biespecífico, como se define en las reivindicaciones adjuntas, comprende un primer dominio de reconocimiento de antígeno que se une a un primer antígeno y un segundo dominio de reconocimiento de antígeno que se une a un segundo antígeno. El primer dominio de reconocimiento de antígeno se une a un antígeno asociado a tumor que es el CD19 humano. Tal como se describe en otra parte en el presente documento, el anticuerpo biespecífico reconoce el mismo antígeno tumoral reconocido por el CAR como se define en las reivindicaciones adjuntas. La segunda región de reconocimiento de antígeno se une a un antígeno de linfocitos T. El anticuerpo biespecífico, como se define en las reivindicaciones adjuntas, reconoce CD3. En algunos

casos, un anticuerpo biespecífico que reconoce un antígeno de linfocitos T se conoce como un activador de linfocitos T biespecíficos (BiTE). Un BiTE ejemplar es Blinatumomab (obtenible de Amgen) que comprende un dominio anti-CD19 y un dominio anti-CD3. Blinatumomab (Blina) está codificado por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizados y fragmentos de los mismos. Las técnicas para fabricar anticuerpos humanos y humanizados se describen en otra parte del presente documento.

Las técnicas para fabricar anticuerpos biespecíficos incluyen, pero sin limitación, expresión conjunta recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen especificidades diferentes (véase Milstein y Cuello, Nature 305:537 (1983), el documento WO 93/08829 y Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)) y genomanipulación "knob-in-hole" (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden fabricarse mediante genomanipulación de efectos de dirección electrostática para producir moléculas heterodiméricas Fc de anticuerpos (documento WO 2009/089004A1); reticulación de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980 y Brennan et al., Science 229:81 (1985)); uso de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)); uso de la tecnología "diacuerpo" para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); y uso de dímeros de cadena simple Fv (single-chain variable fragment, scFv) (véase, por ejemplo, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); y preparar anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991). Los anticuerpos modificados por ingeniería genética con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluidos los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1). Los anticuerpos biespecíficos se pueden construir mediante la unión de dos anticuerpos diferentes, o porciones de los mismos. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico puede comprender Fab, F(ab')₂, Fab', scFv y sdAc de dos anticuerpos diferentes.

Vectores

La presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas, implica una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias de un CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas, donde la secuencia comprende la secuencia de ácido nucleico de un dominio de unión a antígeno unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico de un dominio intracelular. Un dominio intracelular ejemplar que se puede usar en el CAR de la invención incluye, pero sin limitación, el dominio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB, y similares también pueden estar presentes. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de Cd3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. La presente invención también abarca una construcción de ácido nucleico que comprende secuencias de anticuerpo biespecífico como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención abarca además una construcción de ácido nucleico, como se define en las reivindicaciones adjuntas, que comprende secuencias de un CAR, donde la secuencia comprende la secuencia de ácido nucleico de un dominio de unión a antígeno unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico de un dominio intracelular, y donde la construcción de ácido nucleico también comprende la secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo biespecífico.

En una realización, el CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas, comprende el dominio de unión a antígeno anti-CD19, la bisagra de CD8 humano y los dominios de señalización de CD3zeta. En una realización, el CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas, comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las SEQ ID NO: 20 - 21. En una divulgación, el CAR comprende la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 22.

En una realización, el anticuerpo biespecífico del anticuerpo comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las SEQ ID NO: 1, 2, 8-19. En una divulgación, el anticuerpo biespecífico del anticuerpo comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las SEQ ID NO: 3-7.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener usando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante selección de bibliotecas de células que expresan el gen, mediante la derivación del gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o mediante el aislamiento directo de células y tejidos que lo contienen, usando técnicas estándar. Como alternativa, el gen de interés se puede producir sintéticamente, en lugar de clonarse.

La presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas, también implica vectores en los que se inserta un ácido nucleico de la presente invención. Los vectores procedentes de retrovirus, tales como el lentivirus, son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgen y su propagación en las células hijas. Los vectores lentivíricos tienen la ventaja adicional sobre los vectores procedentes de onco-retrovirus, tales como los virus de la leucemia murina, en que pueden transducir células no proliferativas, tales como los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de baja inmunogenicidad.

En resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican CAR se logra normalmente mediante la unión operativa de un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o porciones del mismo a un

promotor, y la incorporación de la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para replicación e integración eucariotas. Los vectores de clonación normales contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

Las construcciones de expresión de la presente invención también se pueden usar para la inmunización de ácidos nucleicos y la terapia génica, usando protocolos de administración génica estándar. Los métodos para la administración génica son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otra realización, la invención se refiere a un vector de terapia génica.

El ácido nucleico se puede clonar en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluye, pero sin limitación, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

Adicionalmente, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de un vector vírico. La tecnología de vectores víricos es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, los documentos WO 01/96584; WO 01/29058; y la patente de Estados Unidos n.º 6.326.193).

Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia génica a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración génica. Un gen seleccionado se puede insertar en un vector y empaquetarse en partículas retrovíricas usando técnicas conocidas en la técnica. Los virus recombinantes se pueden aislar y administrar a las células del sujeto *in vivo* o *ex vivo*. Se usan vectores de lentivirus, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, estos se encuentran en la región de 30-110 pb cadena arriba del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores también contienen elementos funcionales cadena abajo del sitio de inicio. El espacio entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven uno con respecto al otro. En el promotor de timidina cinasa (thymidine kinase, tk), el espacio entre los elementos del promotor se puede aumentar a 50 pb de separación antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción.

Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia del promotor de citomegalovirus (CMV) temprano inmediato. Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de conducir altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica unida operativamente a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el factor de crecimiento de alargamiento -1 α (EF-1 α). Sin embargo, también se pueden usar otras secuencias promotoras constitutivas, incluyendo, pero sin limitación, el promotor temprano del virus simio 40 (Simian Virus 40, SV40), el virus de tumor mamario de ratón (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV), el promotor de repetición terminal largo (Long Terminal Repeat, LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, pero sin limitación, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. Adicionalmente, la divulgación no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia polinucleotídica que está unida operativamente cuando se desea dicha expresión, o apagar la expresión cuando no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitación, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

Para evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células de expresión de la población de células que se busca transfectar o infectar a través de los vectores víricos. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede transportarse en un fragmento separado de ADN y usarse en un procedimiento de transfección conjunta. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células hospedadoras. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

Los genes indicadores se utilizan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la

funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen indicador es un gen que no está presente en o expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta mediante alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. La expresión del gen indicador se analiza en un momento adecuado después de que el ácido nucleico se haya introducido en las células receptoras. Los genes indicadores adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína fluorescente verde (por ejemplo, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y pueden prepararse usando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente. En general, la construcción con la región flanqueante mínima en 5' que muestra el nivel más alto de expresión del gen indicador se identifica como el promotor. Dichas regiones promotoras pueden estar unidas a un gen indicador y usarse para evaluar a los agentes para la capacidad de modular la transcripción dirigida por el promotor.

Los métodos para introducir y expresar genes en una célula son conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector se puede introducir fácilmente en una célula hospedadora, por ejemplo, células de mamífero, bacteriana, de levadura o de insectos mediante cualquier método en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula hospedadora mediante medios físicos, químicos o biológicos.

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un método preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedadora es la transfección con fosfato de calcio.

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores víricos, y especialmente los vectores retrovíricos, se han convertido en el método más utilizado para insertar genes en mamíferos, por ejemplo, células humanas. Otros vectores víricos pueden proceder de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados y similares. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.350.674 y 5.585.362.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidal, tal como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para su uso como vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

En el caso de que se utilice un sistema de administración no vírico, un vehículo de administración ejemplar es un liposoma. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula hospedadora (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido puede encapsularse en el interior acuoso de un liposoma, intercalado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma a través de una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, formando complejo con un liposoma, disperso en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o formando complejo con una micela, o asociado con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, tal como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden simplemente intercalarse en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos de origen natural o sintético. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotas de grasa que ocurren naturalmente en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes y aldehídos.

Los lípidos adecuados para su uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, se puede obtener dimiristil fosfatidilcolina (Dimyristyl Phosphatidylcholine, "DMPC") de Sigma, St. Louis, MO; se puede obtener fosfato de dicetilo (Dicetyl Phosphate, "DCP") de K & K Laboratories (Plainview, NY); se puede obtener colesterol ("Choi") de Calbiochem-Behring; se puede obtener dimiristil fosfatidilglicerol (Dimyristyl Phosphatidylglycerol, "DMPG") y otros lípidos de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20 °C. El cloroformo se usa como el único disolvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos simples y multilamelares formados mediante la generación de bicapas o agregados lipídicos cerrados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas de lípidos separadas mediante medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, también se incluyen composiciones que tienen diferentes estructuras en solución que la estructura vesicular normal.

Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas de lípidos. También se contemplan los complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora o de otra manera exponer una célula al inhibidor para confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula hospedadora, se pueden realizar una variedad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como transferencia Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, mediante medios inmunológicos (ELISA y transferencias Western) o mediante ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que caen dentro del alcance de la invención.

Transfección de ARN

En una realización, los linfocitos T genéticamente modificados de la invención se modifican mediante la introducción de ARN. En un aspecto, un ARN transcrito *in vitro* del CAR puede introducirse en una célula como una forma de transfección transitoria. En otra realización, el ARN del CAR se introduce junto con un ARN transcrito *in vitro* que codifica un anticuerpo biespecífico como se define en las reivindicaciones adjuntas. El ARN se produce mediante transcripción *in vitro* utilizando una plantilla generada por reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). El ADN de interés de cualquier fuente puede convertirse directamente mediante PCR en una plantilla para la síntesis de ARNm *in vitro* usando cebadores y ARN polimerasa apropiados. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. La plantilla deseada para la transcripción *in vitro* es el CAR y/o el anticuerpo biespecífico de la presente invención. A modo de ejemplo, la plantilla comprende un dominio extracelular que comprende un dominio variable de cadena sencilla de un anticuerpo antitumoral; un dominio transmembrana que comprende la bisagra y el dominio transmembrana de CD8a; y un dominio citoplásmico comprende el dominio de señalización de CD3-zeta. A modo de otro ejemplo, la plantilla comprende un anticuerpo biespecífico. A modo de otro ejemplo, la plantilla comprende un dominio extracelular que comprende un dominio variable de cadena sencilla de un anticuerpo antitumoral; un dominio transmembrana que comprende la bisagra y el dominio transmembrana de CD8a; y un dominio citoplásmico comprende el dominio de señalización de Cd3-zeta y un anticuerpo biespecífico.

En una realización, la plantilla para el ARN-CAR es una de SEQ ID NO: 20 - 21. En una divulgación, la plantilla para el ARN-CAR es una de SEQ ID NO: 22. En una realización, la plantilla para un ARN que codifica un anticuerpo biespecífico es una de las SEQ ID NO: 1, 2, 8-19. En una divulgación, la plantilla para un ARN que codifica un anticuerpo biespecífico es una de las SEQ ID NO: 3-7. En una realización, el ADN que se utilizará para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede ser de una secuencia de ADN de origen natural del genoma de un organismo. En un aspecto, el ADN es un gen de interés de longitud completa de una porción de un gen. El gen puede incluir algunas o todas las regiones no traducidas (UTR) en 5' y/o en 3'. El gen puede incluir exones e intrones. En un aspecto, el ADN que se utilizará para la PCR es un gen humano. En otro aspecto, el ADN que se utilizará para la PCR es un gen humano que incluye las UTR en 5' y 3'. El ADN puede ser alternativamente una secuencia de ADN artificial que normalmente no se expresa en un organismo de origen natural. Una secuencia de ADN artificial ejemplar es aquella que contiene porciones de genes que se unen para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que están ligadas juntas pueden ser de un solo organismo o de más de un organismo.

Los genes que se pueden usar como fuentes de ADN para PCR incluyen genes que codifican polipéptidos que proporcionan un efecto terapéutico o profiláctico a un organismo o que se pueden usar para diagnosticar una enfermedad o trastorno en un organismo. Los genes preferidos son genes que son útiles para un tratamiento a corto plazo, o cuando existen problemas de seguridad con respecto a la dosis o el gen expresado. Por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, trastornos autoinmunitarios, infecciones parasitarias, víricas, bacterianas, fúngicas u otras, el transgen (transgenes) a expresar puede codificar un polipéptido que funciona como un ligando o receptor para células del sistema inmunitario, o puede funcionar para estimular o inhibir el sistema inmunitario de un organismo. En algunos aspectos, no es deseable tener una estimulación continua y prolongada del sistema inmunitario, ni es necesario producir cambios que duren después de un tratamiento exitoso, ya que esto puede provocar un nuevo problema. Para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario, puede ser deseable inhibir o suprimir el sistema inmunitario durante un brote, pero no a largo plazo, lo que podría dar como resultado que el paciente se vuelva demasiado sensible a una infección.

La PCR se usa para generar una plantilla para la transcripción *in vitro* de ARNm que se usa para la transfección. Los métodos para realizar PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para su uso en PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a las regiones del ADN que se utilizarán como plantilla para la PCR. "Sustancialmente complementarias", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos donde una mayoría o todas las bases en la secuencia de cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias o no coinciden. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de aparearse o hibridarse con el ADN diana pretendido en condiciones de apareamiento usadas para PCR. Los cebadores se pueden diseñar para ser sustancialmente complementarios a cualquier parte de la plantilla de ADN. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar para amplificar la porción de un gen que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluidos las UTR en 5' y en 3'. Los cebadores también se

pueden diseñar para amplificar una porción de un gen que codifica un dominio particular de interés. En un aspecto, los cebadores están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluidas todas o partes de las UTR en 5' y en 3'. Los cebadores útiles para PCR se generan mediante métodos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. Los "cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos en la plantilla de ADN que están cadena arriba de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Cadena arriba" se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación en 5', a la secuencia de ADN a amplificar con relación a la cadena codificante. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a una plantilla de ADN bicatenario que está cadena abajo de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Cadena abajo" se usa en el presente documento para referirse a una ubicación en 3' de la secuencia de ADN a amplificar en relación con la cadena codificante.

Cualquier ADN polimerasa útil para PCR se puede usar en los métodos divulgados en el presente documento. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente en varias fuentes.

También se pueden usar estructuras químicas con la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficacia de la traducción. El ARN tiene preferentemente UTR en 5' y en 3'. En una realización, la UTR en 5' tiene una longitud entre cero y 3000 nucleótidos. La longitud de las secuencias UTR en 5' y en 3' que se añadirán a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, incluyendo, pero sin limitación, el diseño de cebadores para PCR que se unen a diferentes regiones de las UTR. Usando este enfoque, un experto en la técnica puede modificar las longitudes de UTR en 5' y en 3' requeridas para lograr una eficacia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

Las UTR en 5' y en 3' pueden ser las UTR en 5' y en 3' endógenas de origen natural para el gen de interés. Como alternativa, las secuencias de UTR que no son endógenas al gen de interés se pueden añadir mediante la incorporación de las secuencias de UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualquier otra modificación de la plantilla. El uso de secuencias de UTR que no son endógenas al gen de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en las secuencias de UTR en 3' pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por tanto, las UTR en 3' se pueden seleccionar o diseñar para aumentar la estabilidad del ARN transcrito en función de las propiedades de las UTR que son bien conocidos en la técnica.

En un aspecto, la UTR en 5' puede contener la secuencia Kozak del gen endógeno. Como alternativa, cuando se añade una UTR en 5' que no es endógena al gen de interés mediante PCR como se describió anteriormente, se puede rediseñar una secuencia Kozak de consenso mediante la adición de la secuencia UTR en 5'. Las secuencias Kozak pueden aumentar la eficacia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parece ser necesario para todos los ARN para permitir una traducción eficaz. El requisito para las secuencias Kozak para muchos ARNm es conocido en la técnica. En otros aspectos, la UTR en 5' puede proceder de un ARN vírico cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otros aspectos, se pueden usar varios análogos de nucleótidos en la UTR en 3' o en 5' para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

Para permitir la síntesis de ARN a partir de una plantilla de ADN sin la necesidad de clonar genes, se debe unir un promotor de la transcripción a la plantilla de ADN cadena arriba de la secuencia a transcribir. Cuando una secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa se añade al extremo 5' del cebador directo, el promotor de ARN polimerasa se incorpora al producto de PCR cadena arriba del marco de lectura abierto que se transcribirá. En un aspecto preferido, el promotor es un promotor de polimerasa T7, tal como se describe en otras partes del presente documento. Otros promotores útiles incluyen, pero sin limitación, promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias consenso de nucleótidos para los promotores T7, T3 y SP6 son conocidas en la técnica.

En un aspecto preferido, el ARNm tiene una caperuza en el extremo 5' y una cola de poli(A) en 3' que determina la unión al ribosoma, el inicio de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En una plantilla circular de ADN, por ejemplo, ADN plasmídico, la ARN polimerasa produce un producto concatémico largo que no es adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN plasmídico linealizado al final de la UTR en 3' da como resultado un ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariota, incluso si se poliadenila después de la transcripción.

En una plantilla lineal de ADN, la ARN polimerasa del fago T7 puede extender el extremo 3' de la transcripción más allá de la última base de la plantilla (Schenborn y Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003).

El método convencional de integración de estiramientos de poliA/T en una plantilla de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede causar inestabilidad plasmídica, por lo que las plantillas de ADN plasmídico obtenidas de células bacterianas a menudo están altamente contaminadas con eliminaciones y otras aberraciones. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean laboriosos y lentos, sino que a menudo no sean fiables. Es por eso que un método que permite la construcción de plantillas de ADN con estiramiento de poliA/T en 3' sin clonación es altamente deseable.

El segmento poliA/T de la plantilla de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR mediante el uso de un cebador inverso que contiene una cola poliT, tal como la cola 100T (el tamaño puede ser 50-5000 T), o después de la PCR mediante cualquier otro método, incluyendo, pero sin limitación, unión de ADN o recombinación *in vitro*. Las colas poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. En general, la longitud de una cola de Poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de Poli(A) está entre 100 y 5000 adenosinas.

Las colas de Poli(A) de ARN se pueden extender aún más después de la transcripción *in vitro* con el uso de una polimerasa de Poli(A), tal como la polimerasa de PoliA de *E. coli* (E-PAP). En una realización, aumentar la longitud de una cola de Poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos da como resultado un aumento de aproximadamente dos veces en la eficacia de traducción del ARN. Adicionalmente, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Dicha unión puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP se pueden incorporar en la cola de Poli(A) utilizando la polimerasa de poli (A). Los análogos de ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN.

Las caperuzas en 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En un aspecto preferido, los ARN producidos mediante los métodos divulgados en el presente documento incluyen una caperuza en 5'. La caperuza en 5' se proporciona usando técnicas conocidas en la técnica y descritas en el presente documento (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

Los ARN producidos mediante los métodos divulgados en el presente documento también pueden contener una secuencia de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). La secuencia de IRES puede ser cualquier secuencia vírica, cromosómica o artificialmente diseñada que inicie la unión del ribosoma independiente de la caperuza al ARNm y facilite el inicio de la traducción. Se puede incluir cualquier soluto adecuado para la electroporación celular, que puede contener factores que faciliten la permeabilidad y la viabilidad celular, tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

El ARN se puede introducir en las células diana utilizando cualquiera de varios métodos diferentes, por ejemplo, métodos disponibles en el mercado que incluyen, pero sin limitación, electroporación (Amara Nucleofector-II (Amara Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o el Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colorado), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), transfección mediada por liposomas catiónicos mediante lipofección, encapsulación de polímeros, transfección mediada por péptidos o sistemas de administración de partículas biolísticas tal como "cañón de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70(2001).

Linfocitos T modificados genéticamente

En algunos aspectos, las secuencias de CAR y las secuencias de anticuerpos biespecíficos, como se define en las reivindicaciones adjuntas, se administran en las células usando un vector retroviral o lentiviral. Los vectores retrovirales y lentivirales que expresan CAR y que expresan anticuerpos biespecíficos se pueden administrar en diferentes tipos de células eucariotas, así como a tejidos y organismos completos usando células transducidas como vehículos o administración local o sistémica sin células de vectores encapsulados, unidos o desnudos. El método utilizado puede ser para cualquier propósito donde se requiera o sea suficiente una expresión estable.

En otras realizaciones, las secuencias de CAR y las secuencias de anticuerpos biespecíficos, como se define en las reivindicaciones adjuntas, se administran en las células usando ARNm transcrito *in vitro*. El ARNm transcrito *in vitro* del CAR se puede administrar en diferentes tipos de células eucariotas, así como en tejidos y organismos completos utilizando células transfectadas como vehículos o administración local o sistémica libre de células de ARNm encapsulado, unido o desnudo. El método utilizado puede ser para cualquier propósito donde se requiera o sea suficiente una expresión transitoria.

Los métodos divulgados se pueden aplicar a la modulación de la actividad de los linfocitos T en la investigación y terapia básica, en los campos del cáncer, las células madre, las infecciones agudas y crónicas y las enfermedades autoinmunitarias, incluida la evaluación de la capacidad de los linfocitos T genéticamente modificados para destruir una célula cancerosa diana.

Los métodos también proporcionan la capacidad de controlar el nivel de expresión en un amplio intervalo mediante el cambio de, por ejemplo, el promotor o la cantidad de ARN de entrada, lo que permite regular individualmente el nivel de expresión. Adicionalmente, la técnica basada en PCR de producción de ARNm facilita enormemente el diseño de los ARNm de receptores quiméricos con diferentes estructuras y la combinación de sus dominios. Por ejemplo, la variación de diferentes dominios efectores/coestimuladores intracelulares en múltiples receptores quiméricos en la misma célula permite la determinación de la estructura de las combinaciones de receptores que evalúan el nivel más alto de citotoxicidad contra dianas multiantigénicas y, al mismo tiempo, la citotoxicidad más baja

hacia las células normales.

Una ventaja de los métodos de transfección de ARN es que la transfección de ARN es esencialmente transitoria y libre de vectores: Un transgén de ARN se puede administrar a un linfocito y expresarse en él después de una breve activación celular *in vitro*, como un casete de expresión mínimo sin la necesidad de secuencias víricas adicionales. En estas condiciones, la integración del transgen en el genoma de la célula hospedadora es poco probable. La clonación de células no es necesaria debido a la eficacia de la transfección del ARN y su capacidad para modificar uniformemente toda la población de linfocitos.

La modificación genética de linfocitos T con ARN transcrito *in vitro* (ARN-IVT) hace uso de dos estrategias diferentes, que se han probado sucesivamente en varios modelos animales. Las células se transfectan con ARN transcrito *in vitro* mediante lipofección o electroporación. Preferentemente, es deseable estabilizar el ARN-IVT usando diversas modificaciones para lograr la expresión prolongada del ARN-IVT transferido.

Algunos vectores IVT son conocidos en la bibliografía que se utilizan de manera estandarizada como plantilla para la transcripción *in vitro* y que se han modificado genéticamente de tal manera que se producen transcripciones de ARN estabilizadas. Actualmente, los protocolos utilizados en la técnica se basan en un vector plasmídico con la siguiente estructura: un promotor de ARN polimerasa en 5' que permite la transcripción de ARN, seguido de un gen de interés que está flanqueado en 3' y/o en 5' mediante regiones no traducidas (UTR), y un casete de poliadenilo en 3' que contiene 50-70 nucleótidos A. Antes de la transcripción *in vitro*, el plásmido circular se linealiza cadena abajo del casete de poliadenilo mediante enzimas de restricción de tipo II (la secuencia de reconocimiento corresponde al sitio de escisión). El casete de poliadenilo corresponde, por lo tanto, a la secuencia posterior de poli(A) en la transcripción. Como resultado de este procedimiento, algunos nucleótidos permanecen como parte del sitio de escisión enzimática después de la linealización y extienden o enmascaran la secuencia de poli(A) en el extremo 3'. No está claro, si este saliente no fisiológico afecta la cantidad de proteína producida intracelularmente a partir de dicha construcción.

El ARN tiene varias ventajas sobre los enfoques más tradicionales de plásmidos o víricos. La expresión génica de una fuente de ARN no requiere transcripción y el producto proteico se produce rápidamente después de la transfección. Adicionalmente, dado que el ARN solo tiene que acceder al citoplasma, en lugar del núcleo y, por lo tanto, los métodos de transfección típicos dan como resultado una tasa de transfección extremadamente alta. Además, los enfoques basados en plásmidos requieren que el promotor que impulsa la expresión del gen de interés esté activo en las células en estudio.

En otro aspecto, la construcción de ARN se puede administrar en las células mediante electroporación. Véase, por ejemplo, las formulaciones y la metodología de electroporación de construcciones de ácido nucleico en células de mamífero como se enseña en los documentos US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1. Los diversos parámetros, incluida la intensidad de campo eléctrico requerida para la electroporación de cualquier tipo de célula conocida, se conocen generalmente en la bibliografía de investigación relevante, así como en numerosas patentes y solicitudes en el campo. Véanse por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.678.556, la patente de Estados Unidos n.º 7.171.264 y la patente de Estados Unidos n.º 7.173.116. Los aparatos para la aplicación terapéutica de la electroporación están disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema de terapia de electroporación de ADN MedPulser™ (Inovio/Genetronics, San Diego, California), y se describen en patentes como la patente de Estados Unidos n.º 6.567.694; la patente de Estados Unidos n.º 6.516.223, la patente de Estados Unidos n.º 5.993.434, la patente de Estados Unidos n.º 6.181.964, la patente de Estados Unidos n.º 6.241.701 y la patente de Estados Unidos n.º 6.233.482; La electroporación también se puede usar para la transfección de células *in vitro* como se describe, por ejemplo, en el documento US20070128708A1. La electroporación también se puede utilizar para administrar ácidos nucleicos en las células *in vitro*. En consecuencia, la administración mediada por electroporación en células de ácidos nucleicos, que incluyen las construcciones de expresión que utilizan cualquiera de los muchos dispositivos disponibles y sistemas de electroporación conocidos por los expertos en la materia, presenta un nuevo y emocionante medio para administrar un ARN de interés a una célula diana.

Fuentes de linfocitos T

Antes de la expansión y modificación genética de los linfocitos T de la invención, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. Los linfocitos T se pueden obtener de varias fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas realizaciones de la presente invención, se puede usar cualquier número de líneas de linfocitos T disponibles en la técnica. En determinadas realizaciones de la presente invención, los linfocitos T se pueden obtener de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquier variedad de técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como la separación mediante Ficoll™. Las células de la sangre circulante de un individuo pueden obtenerse mediante aféresis. El producto de aféresis generalmente contiene linfocitos, que incluyen linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas mediante aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para las

etapas de procesamiento posteriores. En una divulgación, se lavaron células con solución salina tamponada con fosfato (Phosphate-Buffered Saline, PBS). En un aspecto alternativo, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, cationes divalentes. De nuevo, de manera sorprendente, las etapas de activación iniciales en ausencia de calcio conducen a una activación magnificada. Como los expertos en la técnica apreciarían fácilmente, una etapa de lavado se puede lograr mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tal como mediante el uso de una centrífuga semiautomática de "flujo continuo" (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras el lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS sin Ca^{2+} , sin Mg^{2+} , PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis se pueden eliminar y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

En otro aspecto, los linfocitos T se aíslan de los linfocitos de sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o mediante elutriación centrífuga de contraflujo. Una subpoblación específica de linfocitos T, tal como los linfocitos T CD3^+ , CD28^+ , CD4^+ , CD8^+ , CD45RA^+ y CD45RO^+ , se puede aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positivas o negativas. Por ejemplo, en un aspecto, los linfocitos T se aíslan mediante incubación con perlas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3x28), tal como T CD3/CD28 M-450 DYNABEADS®, durante un período de tiempo suficiente para una selección positiva de los linfocitos T deseados. En un aspecto, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En un aspecto adicional, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto adicional, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En otro aspecto preferido más, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. En un aspecto preferido, el período de tiempo de incubación es de 24 horas. Para el aislamiento de linfocitos T de pacientes con leucemia, el uso de tiempos de incubación más largos, tal como 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular. Se pueden usar tiempos de incubación más largos para aislar linfocitos T en cualquier situación donde haya pocos linfocitos T en comparación con otros tipos de células, como aislar linfocitos infiltrantes de tumores (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TIL) del tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Adicionalmente, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficacia de captura de linfocitos T CD8^+ . Por tanto, simplemente mediante el acortamiento o alargamiento del tiempo en que se permite que los linfocitos T se unan a las perlas CD3/CD28 y/o mediante el aumento o disminución de la proporción de perlas a linfocitos T (como se describe más adelante en el presente documento), se pueden seleccionar preferentemente subpoblaciones de linfocitos T a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros momentos durante el proceso. Adicionalmente, mediante el aumento o disminución de la proporción de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, las subpoblaciones de linfocitos T se pueden seleccionar preferentemente a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros momentos deseados. El experto en la técnica reconocería que también se pueden usar múltiples rondas de selección en el contexto de esta invención. En determinados aspectos, puede ser deseable realizar el procedimiento de selección y utilizar las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también se pueden someter a rondas adicionales de selección.

El enriquecimiento de una población de linfocitos T mediante selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4^+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14 , CD20 , CD11b , CD16 , HLA-DR y CD8 . En determinados aspectos, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente los linfocitos T reguladores que normalmente expresan CD4^+ , CD25^+ , CD62L^{hi} , GITR^+ y FoxP3^+ . Como alternativa, en determinados aspectos, los linfocitos T reguladores se agotan mediante perlas anti- CD25 conjugadas u otro método de selección similar.

Para el aislamiento de una población de células deseada mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas). En determinados aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (es decir, aumentar la concentración de las células), para garantizar el máximo contacto de las células y las perlas. Por ejemplo, en un aspecto, se usa una concentración de 2 mil millones de células/ml. En un aspecto, se usa una concentración de mil millones de células / ml. En una realización adicional, se usan más de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otro aspecto más, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml.

El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento del rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular. Adicionalmente, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tal como linfocitos T CD28 negativos, o de muestras donde hay muchas células tumorales presentes (es decir, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Dichas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y serían deseables de obtener. Por ejemplo, el uso de alta

concentración de células permite una selección más eficaz de linfocitos T CD8⁺ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En un aspecto relacionado, puede ser deseable usar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de linfocitos T y la superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona las células que expresan altas cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan de manera más eficaz que los linfocitos T CD8⁺ en concentraciones diluidas. En un aspecto, la concentración de células utilizada es 5×10^6 /ml. En otros aspectos, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a 1×10^6 /ml, y cualquier valor entero en el medio.

En otros aspectos, las células pueden incubarse en un rotador durante períodos de tiempo variables a velocidades variables a 2-10 °C o a temperatura ambiente.

Los linfocitos T para la estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. Sin desear estar limitado por la teoría, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme mediante la eliminación de los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien muchas soluciones y parámetros de congelación son conocidos en la técnica y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contiene 20 % de DMSO y 8 % de albúmina sérica humana o medios de cultivo que contienen 10 % de Dextrano 40 y 5 % de Dextrosa, 20 % de albúmina sérica humana y 7,5 % de DMSO o 31,25 % de Plasmalyte-A, 31,25 % de dextrosa al 5 %, 0,45 % NaCl, 10 % de Dextrano 40 y 5 % de Dextrose, 20 % de albúmina sérica humana, y 7,5 % de DMSO u otros medios de congelación celular adecuados que contienen, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A. Luego, las células se congelan a -80 °C a una velocidad de 1 ° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden usar otros métodos de congelación controlada, así como la congelación incontrolada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

En determinados aspectos, las células criopreservadas se descongelan y se lavan como se describe en el presente documento y se deja reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación usando los métodos de la presente invención.

También se contempla en el contexto de la invención la recolección de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior a cuándo podrían necesitarse las células expandidas como se describe en el presente documento. Como tal, la fuente de las células a expandir se puede recolectar en cualquier momento necesario, y las células deseadas, tal como los linfocitos T, se pueden aislar y congelar para su uso posterior en la terapia con linfocitos T para cualquier número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia de linfocitos T, tales como las descritas en el presente documento.

En un aspecto, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En determinados aspectos, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y congelan para su uso posterior. En determinados aspectos, los linfocitos T pueden expandirse, congelarse y usarse en un momento posterior. En determinados aspectos, se recogen muestras de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular como se describe en el presente documento pero antes de cualquier tratamiento. En un aspecto adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o de una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, pero sin limitación, tratamiento con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivíricos, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresivos, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunosupresivos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK.506) o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993).

En un aspecto adicional, las células se aíslan para un paciente y se congelan para su uso posterior junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) un trasplante de médula ósea o células madre, terapia ablativa de linfocitos T usando agentes de quimioterapia tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otro aspecto, las células se aíslan antes y se pueden congelar para su uso posterior para el tratamiento después de la terapia ablativa de linfocitos B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, los linfocitos T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento. A este respecto, se ha observado que después de determinados tratamientos contra el cáncer, en particular, tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el período en que los pacientes normalmente se recuperarían del tratamiento, la calidad de los linfocitos T obtenidos

puede ser óptima o mejorada por su capacidad de expandirse *ex vivo*. Del mismo modo, después de la manipulación *ex vivo* utilizando los métodos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para un injerto mejorado y una expansión *in vivo*. Por tanto, se contempla dentro del contexto de la presente invención recolectar células sanguíneas, que incluyen linfocitos T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Adicionalmente, en determinados aspectos, la movilización (por ejemplo, la movilización con GM-CSF) y los regímenes de acondicionamiento se pueden usar para crear una condición en un sujeto donde se favorezca la repoblación, la recirculación, la regeneración y/o la expansión de tipos de células particulares, especialmente durante una franja de tiempo definida después de la terapia. Los tipos celulares ilustrativos incluyen linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

Activación y expansión de linfocitos T

Ya sea antes o después de la modificación genética de los linfocitos T para expresar un CAR deseable, los linfocitos T se pueden activar y expandir generalmente usando métodos como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20060121005.

En general, los linfocitos T de la invención se expanden mediante contacto con una superficie que se ha unido a un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. En particular, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse como se describe en el presente documento, tal como mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o mediante contacto con un activador de proteína cinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la estimulación conjunta de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se usa un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T se puede poner en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD8⁺, se usa un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Se pueden usar ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 que incluye 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besançon, Francia) al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30 (8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

En determinados aspectos, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para el linfocito T se pueden proporcionar mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes se pueden acoplar a la misma superficie (es decir, en formación "*cis*") o a superficies separadas (es decir, en formación "*trans*"). Como alternativa, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En un aspecto, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinados aspectos, ambos agentes pueden estar en solución. En otro aspecto, los agentes pueden estar en forma soluble y luego reticularse a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígeno artificiales (artificial Antigen Presenting Cells, aAPCs) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de linfocitos T en la presente invención.

En un aspecto, los dos agentes se inmovilizan en perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "*cis*", o en perlas separadas, es decir, "*trans*". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes se movilizan conjuntamente a la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un aspecto, se usa una proporción 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la expansión de linfocitos T CD4⁺ y el crecimiento de linfocitos T. En una determinada divulgación, se usa una proporción de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas de manera que se observa un aumento en la expansión de linfocitos T en comparación con la expansión observada usando una proporción de 1:1. En un aspecto particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada usando una proporción de 1:1. En un aspecto, la proporción de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En una divulgación, se une más anticuerpo anti-CD28 a las partículas que el anticuerpo anti-CD3, es decir, la proporción de CD3:CD28 es menor que uno. En otra divulgación, la proporción de anticuerpo anti-CD28 a anticuerpo anti-CD3 unido a las perlas es mayor que 2:1. En un aspecto particular, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:100 de anticuerpo unido a perlas. En otro aspecto, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:75 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto adicional, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:50 de anticuerpo unido a perlas. En otro aspecto, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:30 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto preferido, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:10 de anticuerpo unido a perlas. En otro aspecto, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:3 de anticuerpo unido a perlas. En otro aspecto más, se usa una proporción CD3:CD28 de 3:1 de

anticuerpo unido a perlas.

Se pueden usar proporciones de partículas a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero en el medio para estimular los linfocitos T u otras células diana. Como pueden apreciar fácilmente los expertos en la técnica, la proporción de partículas a células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula diana. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño solo podrían unir unas pocas células, mientras que las perlas más grandes podrían unir muchas. En determinados aspectos, la proporción de células a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero intermedio, y en aspectos adicionales, la proporción comprende de 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero intermedio, también se puede usar para estimular linfocitos T. La proporción de partículas acopladas anti-CD3 y anti-CD28 a los linfocitos T que dan como resultado la estimulación de los linfocitos T puede variar como se indicó anteriormente, sin embargo, determinados valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, y 15:1 con una proporción preferida de al menos 1:1 partículas por linfocito T. En un aspecto, se usa una proporción de partículas a células de 1:1 o menos. En un aspecto particular, una proporción partícula/célula preferida es 1:5. En aspectos adicionales, la proporción de partículas a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, la proporción de partículas a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células todos los días o cada dos días a partir de entonces durante un máximo de 10 días, en proporciones finales de 1:1 a 1:10 (según el recuento celular en el día de la adición). En un aspecto particular, la proporción de partículas a células es 1:1 en el primer día de estimulación y ajustada a 1:5 en el tercer y quinto día de estimulación. En otro aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días a una proporción final de 1:1 el primer día y 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En otro aspecto, la proporción de partículas a células es 2:1 en el primer día de estimulación y ajustada a 1:10 en el tercer y quinto día de estimulación. En otro aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días a una proporción final de 1:1 el primer día y 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la técnica apreciará que una variedad de otras proporciones pueden ser adecuadas para su uso en la presente invención. En particular, las proporciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula.

En otra divulgación, las células, tal como los linfocitos T, se combinan con perlas recubiertas con agente, separándose posteriormente las perlas y las células, y cultivándose luego las células. En un aspecto alternativo, antes del cultivo, las perlas recubiertas con agente y las células no se separan sino que se cultivan juntas. En un aspecto adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, que da como resultado un aumento de la unión de los marcadores de la superficie celular, lo que induce la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (3x28 perlas) entren en contacto con los linfocitos T. En un aspecto, las células (por ejemplo, de 10^4 a 10^9 linfocitos T) y las perlas (por ejemplo, las perlas paramagnéticas T CD3/CD28 M-450 DYNABEADS® en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente que se puede usar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo el 0,01 % de la muestra o toda la muestra (es decir, el 100 %) puede comprender la célula diana de interés. En consecuencia, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente divulgación. En determinados aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las partículas y las células (es decir, aumentar la concentración de las células), para garantizar el máximo contacto de las células y las partículas. Por ejemplo, en una realización, se usa una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En otra realización, se usan más de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otro aspecto más, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento del rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular. Adicionalmente, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como linfocitos T CD28 negativos. Dichas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y serían deseables de obtener en determinados aspectos. Por ejemplo, el uso de alta concentración de células permite una selección más eficaz de linfocitos T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En una divulgación, la mezcla se puede cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor horario entero intermedio. En otro aspecto, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. En un aspecto, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante aproximadamente ocho días. En otro aspecto, las perlas y linfocitos T se cultivan juntos durante 2-3 días. También pueden desearse varios ciclos de estimulación de modo que el tiempo de cultivo de los linfocitos T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI

1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20, Optimizador, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, libres de suero o complementados con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de linfocitos T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomicina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (por ejemplo, 37 °C) y una atmósfera (por ejemplo, aire más CO₂ al 5 %).

Los linfocitos T que se han expuesto a tiempos de estimulación variados pueden exhibir características diferentes. Por ejemplo, los productos celulares mononucleares de sangre normal o sangre periférica aferisada tienen una población de linfocitos T auxiliares (T_H, CD4⁺) que es mayor que la población de linfocitos T citotóxicos o supresores (T_C, CD8⁺). La expansión *ex vivo* de los linfocitos T mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de linfocitos T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en linfocitos T_H, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de linfocitos T comprende una población cada vez mayor de linfocitos T_C. En consecuencia, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajoso infundir un sujeto con una población de linfocitos T que comprende predominantemente linfocitos T_H. De forma similar, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de linfocitos T_C, puede ser beneficioso expandir este subconjunto en mayor grado.

Adicionalmente, además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de forma reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por tanto, dicha reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de linfocitos T activado para fines específicos.

Aplicación terapéutica

La presente invención abarca un linfocito T, como se define en las reivindicaciones adjuntas, modificado para expresar un anticuerpo biespecífico y un CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas, donde el CAR, como se define en las reivindicaciones adjuntas, combina un dominio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo específico con un dominio intracelular de Cd3-zeta, CD28, 4-1BB, o cualquier combinación de los mismos. Por tanto, en algunos casos, el linfocito T transducido puede provocar una respuesta de linfocitos T mediada por CAR.

En una divulgación, se proporciona el uso de un CAR para redirigir la especificidad de un linfocito T primario a un antígeno tumoral. Por tanto, se divulga también un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población o tejido de células diana en un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero un linfocito T que expresa un CAR, donde el CAR comprende una fracción de unión que interactúa específicamente con una diana predeterminada, una porción de cadena zeta que comprende, por ejemplo, el dominio intracelular de CD3-zeta humano, y una región de señalización coestimuladora.

En una divulgación se incluye un tipo de terapia celular donde los linfocitos T se modifican genéticamente para expresar un anticuerpo biespecífico y un CAR, y el linfocito T se usa en un método para tratar el cáncer. La célula infundida es capaz de destruir células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, en algunas realizaciones, los linfocitos T modificados son capaces de replicarse *in vivo*, lo que da como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control tumoral sostenido.

En un aspecto, los linfocitos T de la divulgación pueden experimentar una sólida expansión de linfocitos T *in vivo* y pueden persistir durante un período prolongado de tiempo. En otro aspecto, los linfocitos T de la invención evolucionan en linfocitos T de memoria específicos que se pueden reactivar para inhibir cualquier formación o crecimiento tumoral adicional.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la respuesta de inmunidad antitumoral provocada por los linfocitos T modificados puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva. Además, la respuesta inmunitaria mediada puede ser parte de un enfoque de inmunoterapia adoptiva en el que los linfocitos T modificados inducen una respuesta inmunitaria específica para el antígeno dirigido reconocido por el CAR y/o el anticuerpo biespecífico.

En un aspecto, los linfocitos T modificados de la invención secretan el anticuerpo biespecífico en el espacio extracelular del microambiente tumoral. Este método de administración eficaz reduce la toxicidad asociada con la administración sistémica de anticuerpos biespecíficos.

En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de un linfocito T modificado para administrar eficazmente un anticuerpo biespecífico a una región particular (es decir, un microambiente tumoral). En una realización, los linfocitos T modificados para expresar un CAR y un anticuerpo biespecífico, como se define en las reivindicaciones adjuntas, se dirigen a un microambiente tumoral específico a través del dominio de unión a antígeno del CAR expresado en la superficie del CAR. Adicionalmente, en una realización, la administración mediada por CAR de anticuerpos biespecíficos provee los linfocitos T no modificados del microambiente tumoral con el anticuerpo biespecífico terapéutico. En una realización, el anticuerpo biespecífico se une a un linfocito T y un antígeno tumoral. Esta forma de anticuerpo biespecífico, conocido como BiTE, trabaja junto con el CAR para reconocer y destruir tumores

específicamente. En una realización, los linfocitos T modificados para expresar un CAR y un anticuerpo biespecífico se usan de acuerdo con las reivindicaciones para mejorar el reconocimiento tumoral, la respuesta inmunitaria y la lisis tumoral, en comparación con la administración de linfocitos T modificados con solo un CAR.

- 5 Si bien los datos divulgados en el presente documento describen específicamente ARN IVT del CAR que comprende una región anti-CD19, una bisagra CD8 α humana y una región transmembrana, y dominios de señalización de 4-1BB y Cd3zeta, la invención debe interpretarse para incluir cualquier número de variaciones para cada uno de los componentes de la construcción como se describe en otra parte en el presente documento, dentro de los límites de las reivindicaciones adjuntas. Se divulga el uso de cualquier dominio de unión a antígeno en el CAR para generar una respuesta de linfocitos T mediada por CAR específica para el dominio de unión a antígeno. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno en el CAR de la invención puede dirigirse a un antígeno tumoral con el propósito de tratar un cáncer.

- 10 Los cánceres que pueden tratarse incluyen tumores que no están vascularizados, o que aún no están sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos (tales como tumores hemáticos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres a tratar con los CAR de la invención incluyen, pero sin limitación, carcinoma, blastoma y sarcoma, y determinadas leucemias o neoplasias linfoides, tumores benignos y malignos, y neoplasias, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. También se incluyen tumores/cánceres de adultos y tumores/cánceres pediátricos.

- 15 Los cánceres hemáticos son cánceres de la sangre o la médula ósea. Los ejemplos de cánceres hemáticos (o hematógenos) incluyen leucemias, incluyendo leucemias agudas (tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloide aguda y mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

- 20 Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que generalmente no contienen quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Se nombran diferentes tipos de tumores sólidos por el tipo de células que los forman (tales como sarcomas, carcinomas y linfomas). Ejemplos de tumores sólidos, tales como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfóide, cáncer pancreático, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, melanoma y tumores del SNC (tal como un glioma (tal como el glioma de tronco encefálico y los gliomas mixtos), astrocitoma de glioblastoma (también conocido como glioblastoma multiforme), linfoma del SNC, germinoma, meduloblastoma, craneofaringioma de Schwannoma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma y metástasis cerebrales).

- 45 El CAR y el anticuerpo biespecífico, como se define en las reivindicaciones adjuntas, están diseñados para tratar un cáncer particular. Por ejemplo, el CAR y el anticuerpo biespecífico diseñados para dirigirse a CD19 se pueden usar para tratar cánceres y trastornos que incluyen, pero sin limitación, LLA pre-B (indicación pediátrica), LLA en adultos, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, rescate post-trasplante alogénico de médula ósea, y similares.

En una divulgación, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse a CD22 para tratar el linfoma difuso de linfocitos B grandes.

- 55 En una realización del linfocito T para su uso como se define en las reivindicaciones adjuntas, los cánceres y trastornos, que incluyen, pero sin limitación, LLA pre-B (indicación pediátrica), LLA en adultos, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, rescate post-trasplante alogénico de médula ósea, y similares se pueden tratar usando una combinación de CAR que se dirigen a CD19, CD20, CD22 y ROR1.

- 60 En una divulgación, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse a la mesotelina para tratar el mesotelioma, cáncer pancreático, cáncer de ovario y similares. En otra divulgación, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse a CD33/IL3Ra para tratar la leucemia mielógena aguda y similares. En una divulgación adicional, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse a c-Met para tratar el cáncer de mama triple negativo, el cáncer de pulmón no microlítico y similares.

- 65 En una divulgación, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse a PSMA para tratar el

cáncer de próstata y similares. En otra divulgación, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse al glucolípidio F77 para tratar el cáncer de próstata y similares. En una divulgación adicional, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse a EGFRvIII para tratar glioblastoma y similares.

En una divulgación, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse a GD-2 para tratar neuroblastoma, melanoma y similares. En otra divulgación, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse al TCR NY-ESO-1 para tratar el mieloma, sarcoma, melanoma y similares. En una divulgación adicional, el CAR y el anticuerpo biespecífico se pueden diseñar para dirigirse al TCR MAGE A3 para tratar el mieloma, sarcoma, melanoma y similares.

Los linfocitos T modificados de la invención también pueden servir como un tipo de vacuna para inmunización *ex vivo* y/o terapia *in vivo* en un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a la inmunización *ex vivo*, al menos uno de los siguientes ocurre *in vitro* antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR y/o anticuerpo biespecífico para las células, y/o iii) criopreservación de las células.

Los procedimientos *ex vivo* son bien conocidos en la técnica y se analizan más detalladamente a continuación. En resumen, se aíslan células de un mamífero (preferentemente un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan *in vitro*) con un vector que expresa las composiciones divulgadas en el presente documento. La célula modificada se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada puede ser autóloga con respecto al receptor. Como alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

El procedimiento para la expansión *ex vivo* de células madre y progenitoras hematopoyéticas se describe en la patente de Estados Unidos 5.199.942, y se puede aplicar a las células de la presente invención. Se conocen otros métodos adecuados en la técnica, por lo tanto, la presente divulgación no se limita a ningún método particular de expansión *ex vivo* de las células. En resumen, el cultivo y la expansión *ex vivo* de los linfocitos T comprende: (1) recolectar células madre hematopoyéticas CD34+ y células progenitoras de un mamífero de la extracción de sangre periférica o de explantes de médula ósea; y (2) expandir dichas células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la patente de Estados Unidos n.º 5.199.942, se pueden usar otros factores tales como Flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, para el cultivo y la expansión de las células.

Además de usar una vacuna basada en células en términos de inmunización *ex vivo*, también se proporcionan composiciones y métodos para la inmunización *in vivo* para provocar una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno en un paciente.

En general, las células activadas y expandidas, como se describe en el presente documento, pueden utilizarse en el tratamiento y prevención de enfermedades que surgen en individuos inmunocomprometidos. En particular, los linfocitos T modificados de la invención se usan en el tratamiento del cáncer. En determinadas divulgaciones, las células de la invención se usan en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar cáncer. Por tanto, la presente solicitud divulga métodos para el tratamiento o prevención del cáncer que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de los linfocitos T modificados de la invención.

Los linfocitos T modificados de la presente invención pueden administrarse solos, o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población de células diana como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina neutra tamponada, solución salina tamponada con fosfato y similares; hidratos de carbono tal como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferentemente para administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y la frecuencia de la administración estarán determinadas por factores tales como la condición del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque los ensayos clínicos pueden determinar las dosis apropiadas.

Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad antitumoral eficaz", "una cantidad inhibidora de tumores eficaz" o "cantidad terapéutica", se puede determinar la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar por un médico con consideración de las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis, y la condición del paciente (sujeto). En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T descritos en el presente documento se puede administrar a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferentemente de 10^5 a 10^6 células/kg

de peso corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos T también pueden administrarse múltiples veces a estas dosis. Las células se pueden administrar utilizando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). La dosis óptima y el régimen de tratamiento para un paciente en particular se pueden

5 determinar fácilmente por un experto en la técnica de la medicina mediante el monitoreo del paciente en busca de signos de enfermedad y el ajuste del tratamiento en consecuencia.

En determinadas realizaciones que implican el linfocito T, como se define en las reivindicaciones adjuntas, para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un ser humano, puede desearse administrar linfocitos T activados a

10 un sujeto y luego volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar los linfocitos T a partir de ellos de acuerdo con la presente invención, y reinfundir al paciente con estos linfocitos T activados y expandidos. Este proceso se puede llevar a cabo varias veces cada pocas semanas. En determinadas realizaciones, los linfocitos T se pueden activar a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En determinados aspectos, los linfocitos T se activan a

15 partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc o 100 cc. Sin limitarse a la teoría, el uso de este protocolo de extracción múltiple de sangre/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar determinadas poblaciones de linfocitos T.

La administración de las composiciones en cuestión puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo mediante inhalación por aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las

20 composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (*i.v.*) o intraperitoneal. En una realización del linfocito T para su uso como se define en las reivindicaciones adjuntas, las composiciones de linfocitos T de la presente invención se administran en un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En otra realización del linfocito T para su uso como se define en las reivindicaciones adjuntas, las

25 composiciones de linfocitos T de la presente invención se administran preferentemente mediante inyección *i.v.* Las composiciones de linfocitos T pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

En determinadas realizaciones del linfocito T para su uso, como se define en las reivindicaciones adjuntas, las células activadas y expandidas usando los métodos descritos en el presente documento, u otros métodos conocidos

30 en la técnica donde los linfocitos T se expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) cualquier cantidad de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, pero sin limitación, el tratamiento con agentes tales como terapia antivírica, cidofovir e interleucina-2, citarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizumab para pacientes con EM o tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En realizaciones adicionales, los linfocitos T de la invención pueden usarse en un método para tratar el cáncer en combinación con quimioterapia,

35 radiación, agentes inmunosupresivos, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras tratamiento con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun, 73:316-321, 1991; Bierer et al, Curr, Opin, Immun, 5:763-773, 1993). En una realización adicional del linfocito T para su uso como se define en las reivindicaciones adjuntas, las composiciones celulares de la presente invención se administran en un paciente junto con (por ejemplo, antes,

45 simultáneamente o después) un trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T usando agentes de quimioterapia tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra realización del linfocito T para su uso como se define en las reivindicaciones adjuntas, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de linfocitos B, tal como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.

Por ejemplo, en una realización del linfocito T para su uso como se define en las reivindicaciones adjuntas, los

50 sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con dosis altas de quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas realizaciones del linfocito T para su uso, como se define en las reivindicaciones adjuntas, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una realización adicional del linfocito T para su uso como se define en las

55 reivindicaciones adjuntas, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosificación de los tratamientos anteriores que se administrarán a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se está tratando y el receptor del tratamiento. La escala de dosificación para la administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por

60 ejemplo, generalmente estará en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, generalmente administrado diariamente durante un período entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos se pueden usar dosis más grandes de hasta 40 mg por día (descrita en la Patente de Estados Unidos n.º 6.120.766).

65 Ejemplos experimentales

La invención se describe adicionalmente en detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos. Sin una descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplo 1: Mejora de la actividad antitumoral de los linfocitos T con ARN del CAR mediante la introducción conjunta del ARN del anticuerpo biespecífico (ARN-Bis)

El tratamiento de pacientes con cáncer con transferencia adoptiva de linfocitos T redirigidas por CAR ha mostrado resultados prometedores. La electroporación de ARN que codifica los CAR en los linfocitos T proporciona una forma alternativa más segura, más fácil y probablemente más eficaz a las terapias basadas en la administración génica basada en lenti- o retrovíricos comúnmente utilizados en la actualidad. Los hallazgos de ensayos clínicos recientes demostraron que los CAR procedentes de Ac de ratón mostraron evidencia de respuesta de anticuerpos humanos antimurinos (HAMA), lo que podría poner en peligro la terapia. Por tanto, los CAR procedentes de Ac humanos o humanizados proporcionan una alternativa deseable a las secuencias procedentes de ratones, especialmente cuando se necesitan infusiones repetidas mediante el uso de linfocitos T electroporados con ARN para tratar pacientes con cáncer.

Los estudios divulgados en el presente documento describen: 1) la generación de CAR antihumanos CD19 procedentes de origen humano que eliminan el posible HAMA cuando se usan CAR mediante transducción lentivírica o electroporación de ARN; 2) la introducción conjunta de un gen (o ARNm) que codifica un Ac biespecífico procedente de Ac humanos (o humanizados). En el presente documento se construyeron CAR ejemplares (Figura 1) con dominios de señalización de 4-1BB-zeta contra CD19 humano a partir de Ac anti-CD19 que es completamente de origen humano (clon 21D4; solicitud de patente de Estados Unidos n.º: 2010/0104509 A1), o humanizado (clon HB12B; solicitud de patente de Estados Unidos n.º: US2008/0138336 A1) o de origen murino (CD19 scFv) a partir de Blinatumomab (Ac biespecífico anti-CD19/anti-CD3); patente de Estados Unidos n.º: US 7,575,923 B2). Además de analizar ARN de Ac biespecífico CD19-CD3 (ARN-Bis), se construyeron mesotelina (ss1) -CD3 (ss1HL-Blina y ss1-BlinaLH), cMet-CD3 (cMet-Blina), PSCA-CD3 (PSCA-Blina) y ARN-Bis GD2-CD3 (Gd2-Blina). Para humanizar ARN-Bis de Blina, se realizaron construcciones y se sustituyeron scFv murino CD19 y CD3 por scFv humano o humanizado contra CD19 (21D4) y CD3 (27H5 VL1, 27H5 VL2, 28F11, DIVHv5, DIVHv6 y DIVHv7) respectivamente, lo que dio lugar a 13 construcciones: D4-Blina, D4-VL1, D4-VL2, D4-F11, D4-Hv5, D4-Hv6, D4-Hv7, Blina-VL1, Blina-VL2, Blina-F11, Blina-Hv5, Blina-Hv6 y Blina-Hv7.

El ARN IVT generado a partir de las construcciones que codifican estos CAR de CD19 se electroporó en linfocitos T. La expresión de CAR y la actividad antitumoral se compararon con CAR de CD19 procedente de FMC63 (actualmente utilizado para ensayos CART19). El diseño experimental de los resultados presentados en el presente documento se muestra en la Figura 2. Los resultados mostraron que todos los nuevos CAR de CD19 podrían expresarse de manera eficaz. A pesar de la expresión ligeramente reducida en comparación con el CAR FMC63, su actividad antitumoral ensayada por la detección de CD107a fue comparable al control CAR FMC63.

Para examinar si la introducción conjunta de un gen (o ARNm) que codifica Ac biespecífico anti-CD19/anti-CD3 aumenta aún más la actividad antitumoral de los linfocitos T modificado por ingeniería genéticas con CAR, el gen que codifica Blinatumomab (Blina) se sintetizó mediante PCR, que luego se construyó en el vector pGEM.64A IVT para generar pGEM-Blina.64A. Los linfocitos T se electroporaron conjuntamente con el ARN que codifica Blinatumomab (Blina) y con ARN del CAR de CD19 (CAR FCM63), o alternativamente se electroporaron con ARN de Blina solo, y se compararon con los linfocitos T electroporados con ARN del CAR de CD19 FCM63 solo. Las células se tiñeron por la presencia de IgG de ratón, lo que demostró que no solo las células electroporadas con ARN del CAR de CD19 se tiñeron positivamente para la expresión del CAR, sino que también la incubación conjunta de células electroporadas de ARN-Bis de Blina con células electroporadas de ARN de GFP dio como resultado una tinción positiva en la mayoría de las células (Figura 3). Este dato es consistente con la explicación de que el Ac biespecífico CD19-CD3 secretado por los linfocitos T electroporados de Blina podría unirse al CD3 de los linfocitos T electroporados de GFP.

Las células electroporadas se cultivaron conjuntamente con células que expresan CD19 (Nalm6, K562-CD19 y Raji) o con las células negativas para CD19 (K562). Se realizó un ensayo de desgranulación de CD107a, que demostró que ARN-Bis de Blina solo podría permitir que los linfocitos T electroporados detecten específicamente el tumor de manera tan eficaz como los linfocitos T electroporados con ARN de CD19 FMC63 (Figura 4). La electroporación conjunta de ARN de Blina con ARN del CAR de CD19 podría mejorar aún más la reactividad tumoral, como lo demuestra el ensayo CD107a (Figura 4).

Adicionalmente, cuando se mezclan linfocitos T electroporados conjuntamente con ARN del CAR de CD19 y ARN de Blina o ARN de Blina solo con linfocitos T electroporados con solo GFP, se descubrió que el Ac biespecífico secretado por los linfocitos T electroporados con ARN de Blina podía proveer los linfocitos T GFP+ que no reconocen el tumor para reconocer eficazmente tumores CD19+ (Figura 5).

Las células electroporadas se examinaron para determinar su actividad lítica en un ensayo CTL basado en flujo usando K562-CD19-CFSE/K562-meso-CMRA como células diana. La electroporación conjunta de ARN de Blina con ARN del CAR de CD19 podría mejorar aún más la actividad de destrucción de los linfocitos T (Figura 6). Adicionalmente, la incubación conjunta de células electroporadas con ARN de Blina con células GFP+ que no reconocen el tumor mantuvo la actividad de destrucción en comparación con los homólogos no diluidos, lo que demuestra que el ARN-Bis secretado podría unirse a los linfocitos T electroporados con ARN de GFP para destruir eficazmente los tumores CD19+, en una forma específica de antígeno (Figura 6).

Las nuevas construcciones de ARN del CAR de CD19 se evaluaron mediante el examen de su expresión 15 horas después de la electroporación mediante tinción para IgG de ratón o IgG humana, lo que mostró que todas las construcciones inducían la expresión del CAR (Figura 7). Cuando se cultivan conjuntamente con líneas tumorales CD19+ (K562-CD19 o Raji) o con una línea CD negativa (U266B1), los linfocitos T electroporados con las nuevas construcciones muestran la capacidad de reconocer específicamente tumores CD19 positivos, como lo demuestra el ensayo CD107a (Figura 8).

Los linfocitos T se electroporaron con ARN-Bis de Blina a 1 µg, 5 µg o 10 µg y se compararon con los linfocitos T electroporados con ARN del CAR de CD19 FCM63 a 10 µg. Después se realizó un ensayo de Cd107a, se estimularon las células electroporadas con células CD19+ (Nalm6, K.562-CD19 o Raji), o con la línea de células CD19 (K562). Se descubrió que los linfocitos T con 1 µg de ARN-Bis de Blina funcionaban casi tan bien como los linfocitos T con 10 µg de ARN del CAR de CD19. Los linfocitos T con 10 µg de ARN del CAR de CD19 perdieron su función en el día 8-10 después de la electroporación, que es similar a los linfocitos T con 1 µg de ARN-Bis de Blina, mientras que los linfocitos T con 5 µg o 10 µg de ARN-Bis de Blina continuaron funcionando hasta el día 14 después de la electroporación (Figura 9B).

Para evaluar la funcionalidad de las formas humanas y humanizadas de ARN-Bis, los linfocitos T se electroporaron con ARN-Bis de Blina-D4, en el que scFv de CD19 a partir de Blina se reemplazó por scFv 21D4. Las células se sometieron a tinción CAR y tinción CD107a, lo que demostró que las células electroporadas de Blina-D4 funcionaban igual de bien que los linfocitos T con ARN-Bis de Blina (Figura 10).

Se diseñaron y construyeron construcciones de ARN-Bis específicas para otros marcadores de antígeno. En comparación con los linfocitos T que expresan ARN del CAR para mesotelina (ss1), cMet o PSCA, se encontró que los linfocitos T que expresan ARN-Bis de ss1-Blina, cMet-Blina o PSCA-Blina solo podrían funcionar igual de bien que los linfocitos T con ARN del CAR. Además, los linfocitos T con ARN-Bis de ss1-Blina mostraron una activación de linfocitos T más específica de antígeno que los linfocitos T con ARN del CAR ss1 (Figura 11).

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que la introducción de ARN de anticuerpos biespecíficos junto con CAR de CD19 mejora la actividad antitumoral de los linfocitos T modificado por ingeniería genética con CAR. Adicionalmente, la introducción de ARN de anticuerpos biespecíficos en los linfocitos T recluta linfocitos T no reactivos al tumor para volverse reactivos al tumor, lo que proporciona una nueva forma de administrar y transportar un fármaco antitumoral en pacientes con cáncer mediante el uso de linfocitos T. Esto podría reducir la toxicidad de los BiTE sistémicos, mediante el enfoque de la administración del anticuerpo biespecífico al microambiente tumoral en virtud del linfocito T CAR que transporta la carga (BiTE) al sitio del tumor.

Blinatumomab ORF (SEQ ID NO: 1)

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccgactacaaagatgatgacgataagg
 atatccagctgacccagctcagcttcttggctgtgtcttagggcagagggccaccatctctgcaaggccagccaaag
 tgttgattatgatggtgatagttatftgaactggtaccaacagattccaggacagccacccaaactcctcatctatgatgcatcc
 aatctagtttctgggatccacccaggtttagtggcagtggtctgggacagacttcaccccaacatccatcctgtggagaa
 ggtggatgctgcaacctatcactgtcagcaaaagtactgaggatccgtggacgttcggtggagggaccaagctcgagatca
 aaggtggtggtggttctggcggcggcggtccggtggtggtggttctcaggtgcagctgcagcagctctgggctgagctg
 gtgagggcctgggtcctcagtgaaagtctcctgcaaggcttctggtatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaagc
 agagggcctggacagggctttagtggatggacagatttggcctggagatggtgatactaactacaatggaaagtcaagg
 gtaaagccactctgactgcagacgaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctagcatctgaggactctgcg
 gtctatttctgtgcaagacgggagactacgacggtaggccgttattactatgctatggactactggggccaagggaccacg
 gtcaccgtctcctccggaggtggtggatccgatatcaaaactgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctggggcctc
 agtgaagatgtcctgcaagacttctggctacaccttactaggtacacgatgcactgggtaaaacagagggcctggacaggg
 tctggaatggattggatacattaatcctagccgtggttatactaattacaatcagaagttcaaggacaaggccacattgactac
 agacaaatcctccagcacagcctacatgcaactgagcagcctgacatctgaggactctgcagctctattactgtgcaagatatt
 atgatgatcattactgccttgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcagtcgaaggtggaagtggaggttct
 ggtggaagtggaggttcaggtggagtgcagcagccgccattcagctgaccagctcagcaatcatgtctgcatctcca
 ggggagaaggtcacctgacctgcagagccagtcaagtgttaagtacatgaactggtaccagcagaagtcaggcacctc
 cccaaaaagatggatttatgacacatccaaagtggcttctggagtccttatcgttcagtggcagtggtctgggacctcat
 actctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccaacagtggagtagtaacccgctcacgtt
 cgggtgctgggaccaagctggagctgaaacatcatccatcatcattaataa

Blin-D4 (SEQ ID NO: 2)

atgggctggcttgcacatcctgttctcgtggccaccgccaccggcgtccacagcgccatccagctcaccagagcccc
tcgagcttgagtgccctcgtgggagaccgggtcactatcacctgccgagccagtcagggcacatcctccgcccttgccctg
taccagcagaagccccgggaaggcccccaagctgctgatctacgacgctagtagtctggagagtggcgtgccttcgcgctt
ctcgggcagtgaggagtgccaccgacttcacctgaccatctccagcttacagccggaagattcgcgacctactactgtcag
caattcaactcttaccatacactttcggccaggggacaaaagctggagatcaaggcgggggggggagtgccggcggag
ggctccggaggggggggctccgaggtgcaactagtcagagcggagccgaggtgaagaagccccggggagagtctaaa
gatctcttgcaagggtccggttactccttctcagttcctggatcgggtgggtgcgacagatgccgggcaaggccctgga
gtggatgggcattatctaccccgacgactccgatacccggttagtccatcgttccaggagcaggtgaccatttccgccgac
aagtctatcagaaccgcctatctcagtggtccagctcgaaggcctctgacactgccatgtattattgccaggcacgttac
gatgatctgggggggtgatcagcttctggggccagggcacactcgtaccgtcagttctggaggtgggtgatccgatat
caaaactgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctggggcctcagtgaaagtgtcctgcaagacttctggctacacctt
tactaggtacacgatgcactgggtaaaacagaggcctggacagggtctggaatggattggatacattaatcctagccgtgg
ttatactaattacaatcagaagttcaaggacaaggccacattgactacagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactg
agcagcctgacatctgaggactctgcagctattactgtgcaagataattatgatgatcattactgccttgactactggggccaa
ggcaccactctcacagctcctcagtcgaaggtggaagtggaggttctgggtggaagtggaggttcaggtggagtcgacga
cgccgccattcagctgaccagctcagcaatcatgtctgcactcaggggagaaggtccatgatctgcagagcca
gttcaagtgttaagttacatgaactggtaccagcagaagtcaggcacctcccccaaaagatggatttatgacacatccaaagt
ggcttctggagtccttctcgttcagtggcagtggggtctgggacctacactctctcacaatcagcagcatggaggctgaa
gatgctgccacttattactgccaacagtggaagttagtaaccgctcaggttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacat
catcacatcatcattaa

Ss1.HL.CD3 (SEQ ID NO: 3)

atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggatcccaggtacaactg
cagcagcttgggcctgagctggagaagcctggcgcttcagtgaaagatctcgaaggcttctgggttactcattcactggct
acaccatgaactgggtgaaagcagagccatggaaagagccttgagtgattggacttattactccttacaatggtgctttagc
tacaaccagaagttcaggggcaaggccacattaactgtagacaagtcacccagcacagcctacatggacctcctcagctg
acatctgaagactctgcagcttatttctgtgcaaggggggggttacgacgggaggggttttgactactggggccaagggacc
acggtcacctctcctcaggtggagggcgggtcaggcgccggtggctctagcgggtggcggatcggacatcgagctcactc
agttccagcaatcatgtctgcactcaggggagaaggtccatgatctcagtgccagctcaagtgaagtacatgca
ctggtaccagcagaagtcaggcacctcccccaaaagatggatttacgacacatccaaactggcttctggagtcaggtcg
cttcagtggcagtggtctggaactcttactctcacaatcagcagcgtggaggctgaagacgacgcaacttattactgc
cagcagtggaagtaagcacctctcacgtacggtgctgggacaaaagttggaatcaaaggaggtggtgatccgatatcaa
actgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctggggcctcagtgaaagtgtcctgcaagacttctggctacacctttac

taggtacacgatgcactgggtaaaacagaggcctggacaggggtctggaatggattggatacattaatcctagccgtggttat
actaattacaatcagaagttcaaggacaagggcacattgactacagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactgagc
agcctgacatctgaggactctgcagtctattactgtgcaagatattatgatgacttactgccttgactactggggccaaggc
accactctcacagtctcctcagtcgaaggtggaagtggaggttctggtggaagtggaggttcaggtggagtcgacgacgc
cgccattcagctgaccagctcctcagcaatcatgtctgcattcctcaggggagaaggtcacctgacctgcagagccagttc
aagtgttaagttacatgaactggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggatttatgacacatccaaagtggct
tctggagtccttatcgttcagtggcagtggtctgggacctatactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatg
ctgccacttattactgccaacgtggagtagtaaccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacatcatca
ccatcatcattaataa

Ss1.LH.CD3 (SEQ ID NO: 4)

Atggccttaccagtgcaccgtctcctgccgtggccttgcctccacgccgccaggccgggatccgacatcgagct
cactcagctcctcagcaatcatgtctgcattcctcaggggagaaggtcacctgacctgcagtgcagctcaagtgttaagttac
atgcactggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggatttacgacacatccaaactggcttctggagtccca
ggtcgttcagtggcagtggtctggaaactcttactctctcacaatcagcagcgtggaggtgaagacgacgcaacttatt
actgccagcagtgagtaagcacctctcacgtacggtgctgggacaaagtggaaatcaaaggtggtggtggttctggc
ggcggcggtcctcggtggtggtggttctcaggtacaactgcagcagctctgggctgagctggagaagcctggcgcttcagt
gaagatacctgcaaggcttctggttactcattcactggctacacatgaactgggtgaagcagagccatggaaagagcctt
gagtggttggacttattactccttacaatggtgcttctagctacaaccagaagttcaggggcaaggccacattaactgtaga
caagtcattccagcacagcctacatggacctcctcagctctgacatctgaagactctgcagtctatttctgtgcaagggggggtt
acgacgggagggggttggactactggggccaagggaccacgggtcacctgtcctcaggaggtggtggatccgatatcaaa
ctgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctggggcctcagtgaagatgtcctgcaagacttctggctacaccttact
agggtacacgatgcactgggtaaaacagaggcctggacaggggtctggaatggattggatacattaatcctagccgtggttat
actaattacaatcagaagttcaaggacaagggcacattgactacagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactgagc
agcctgacatctgaggactctgcagtctattactgtgcaagatattatgatgacttactgccttgactactggggccaaggc
accactctcacagtctcctcagtcgaaggtggaagtggaggttctggtggaagtggaggttcaggtggagtcgacgacgc
cgccattcagctgaccagctcctcagcaatcatgtctgcattcctcaggggagaaggtcacctgacctgcagagccagttc
aagtgttaagttacatgaactggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggatttatgacacatccaaagtggct
tctggagtccttatcgttcagtggcagtggtctgggacctatactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatg
ctgccacttattactgccaacgtggagtagtaaccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacatcatca
ccatcatcattaataa

cMet.CD3 (SEQ ID NO: 5)

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgtgagctgccccacccgcctttctgctgatccccgacatccagatgacc
 agagccccagcagcgtgagcgccagcgtggcgaccgggtgaccatcacctgccgggcccagccaggcatcaacac
 ctggctggcctggtatcagcagaagcccggcaaggcccccaagctgctgatctacccgccagcagcctgaagagcgg
 cgtgcccagccggttagcggtctggtctggcgccgacttaccctgaccatcagcagcctgcagcccaggacttcg
 ccactactactgccagcaggccaacagcttccccctgaccttggcgccggaacaaaggtggagatcaagggcagcac
 ctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccgaaggccaggtgcagctggtgcagagcggagccga
 ggtgaagaagcctggcgctccgcaaggtgtctgagggccagcggctacaccttaccagctacggcttcagctgg
 gtgcccagcagcaccaggccagggtcgaatggatgggctggatcagcgccagcaacggcaacactactacgccc
 gaagctgcagggcagggtcaccatgaccaccgacaccagcagcgcctacatggaactgcggagcctgagaa
 gcgacgacaccgccgtgtactactgcgccagggtgtacgccgactacgccgattactggggccagggcaccctggtgac
 cgtgagcagcggagggtggtggtatccgatatcaactgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctggggcctcagtg
 aagatgtcctgcaagacttctggctacacctttactaggtacacgatgcactgggtaaaacagaggcctggacaggggtctg
 gaatggattggatataatcctagccgtggttatactaattacaatcagaagtcaaggacaaggccacattgactacaga
 caaatctccagcacagcctacatgcaactgagcagcctgacatctgaggactctgcagcttattactgtgcaagatattatg
 atgatcattactgccttgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcagtcgaaggtggaggtggttctgg
 tggaggtggaggttcagggtggagtcgacgacgccgcaatcagctgaccagtcctccagcaatcatgtctgcattccagg
 ggagaaggctccatgacctgcagagccagttcaagtgaagtacatgaactggtaccagcagaagtcaggcacctccc
 ccaaaagatggatttatgacacatccaaagtggcttctggagtcccttatcgcttcagtggcagtggtctgggacctatc
 tctctacaatcagcagcatggaggctgaagatgtgccacttattactgccaacagtggagtagtaacccgctcacgttcg
 gtgctgggaccaagctggagctgaaacatcatcaccatcatcattaataa

PSCA.CD3 (SEQ ID NO: 6)

atggcgctaccggtgaccgcactcctgctgccactcgccctcctgctccacgccgcccgcctgatatccagctgacca
 atcaccgtcgtccctgtctgcctcctggcgaccgggtgacgatcacctgtagtgcctcagcagtgtaggttaccac
 tggatcaaacagaagcccggcaaggcaccaaagcggctgatctacgacaccagcaagctggcgctctgggggtgccagc
 aggttctcgggaagtggtagtggtgacagacttcactctaccatcagttcactccagccggaggactttgccactactattg
 ccagcagtggtcctcgtccccctttaccttcggccagggaacaaaggtggaaattaagggttcgacctccggggggggct
 ccggtgggggctccggcggggggggctcatcgagggttcagctggtggagagcggcgccggtggtgcagccggg
 cgggagctctcggtctgtcctgtgccgccagcggctcaacatcaaggactactacattcactgggtgcggcaagccccag
 gcaagggtctggagtggtgggttgattgacctgaaaacggcgacactgagttcgtgcaaaattccagggcggggc
 gaccatctccggacacctccaagaatagccctacctgcagatgaactccctgcgcgccgaagacacagcggcttact
 actgcaagacagggggtttctggggccagggcaccctcgtgaccgttctgagtgccgccggcgagggtggtggtatccga
 tatcaactgcagcagtcaggggtgaactggcaagacctggggcctcagtgaaagtgtcctgcaagacttctggctacac
 ctctactaggtacacgatgcactgggtaaaacagaggcctggacagggtctggaatggattggatataatcctagccgt

gggtataactaattacaatcagaaggtcaaggacaaggccacattgactacagacaatcctccagcacagcctacatgcaac
 tgagcagcctgacatctgaggactctgcagcttattactgtgcaagatattatgatgatcattactgccttgactactggggcc
 aaggcaccactctcacagtctcctcagtcgaaggtggaagtggaggttctggtggaagtggaggttcaggtggagtcgac
 gacgccgccattcagctgaccagctcagcaatcatgtctgcacatccaggggagaaggtcaccatgacctgcagagc
 cagttcaagtgttaattacatgaactggtagcagagaagtcaggcacctccccaaaagatggatttatgacacatccaaa
 gtggcttctggagtccttatcgcttcagtggcagtggtctgggacctacatctctcacaatcagcagcatggaggctga
 agatgctgccacttattactgccaacagtgagtagtaacccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaaca
 tcacacacatcatcattaataa

GD2-CD3 (SEQ ID NO: 7)

atggagtttgggctgagctggcttttctgtggctattttaaagggtgtccagtgctctagagatatttctgacccaaactcc
 actctccctgcctgtcagcttggagatcaagcctccatctcttcagatctagtcagagcttcttacaccgtaattggaacac
 ctatttacattggtacctgcagaagccaggccagctcctcaagctcctgattcacaagttccaaccgatttctgggggtccc
 agacaggttcagtggcagtggtacagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgagggtgaggatctgggagttt
 atttctgttctcaagtacacatgttctccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacgggctgatgctgca
 ccaactgtatccatcttcccaggctcggcggtggtgggtcgggtggcgaggtgaagcttcagcagctctggacctagcctg
 gtggagcctggcgcttcagtgatgatatacctgcaaggcttctggttctcattcactggctacaacatgaactgggtgaggca
 gaacattggaagagccttgaatggattggagctattgatccttactatggtggaactagctacaaccagaagtcaagggc
 agggccacattgactgtagacaatcgtccagcacagcctacatgcacctcaagagcctgacatctgaggactctgcagtc
 tattactgtgtaagcggatggagtactgggtcaaggaaacctcagtcaccgtctctcagccaaaacgacacccccatca
 gtctatggaggtggtggatccgatatcaaaactgcagcagtcaggggctgaactggcaagacctggggcctcagtgaaagt
 gtcctgcaagactctggctacaccttactaggtacacgatgcactgggtaaaacagaggcctggacagggtctggaatg
 gattggatacattaatctagcctggttataactaattacaatcagaagtcaaggacaaggccacattgactacagacaat
 cctccagcacagcctacatgcaactgagcagcctgacatctgaggactctgcagcttattactgtgcaagatattatgatgat
 cattactgccttgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctcagtcgaaggtggaagtggaggttctggtggaa
 gtggaggttcaggtggagtcgacgacgccattcagctgacctcagctcagcaatcatgtctgcacatccaggggag
 aaggtcaccatgacctgcagagccagttcaagtgttaagtacatgaactggtaccagcagaagtcaggcacctccccaa
 aagatggatttatgacacatccaaagtggcttctggagtccttatcgcttcagtggcagtggtgctgggacctacatctct
 cacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccaacagtgagtagtaacccgctcacgttcggtgct
 gggaccaagctggagctgaaacatcatcacatcatcattaataa

5

D4-27H5 VL1 (D4-VL1) (SEQ ID NO: 8)

Atgggctggtcttgcacatcctgttctcgtggccaccgccaccggcgtccacagcggcatccagctcaccagagccc
 ctcgagcttgagtgccctgggtgggagaccgggtcactatcacctgccgagccagtcagggcacatcctccgcccttgctg

10

gtaccagcagaagcccggaaggccccaagctgctgatctacgacgctagtagtctggagagtggcgtgccttcgcgc
 ttctcgggcagtgaggagtgaccgacttcaccttgaccatctccagctctacagccggaagatttcgcgacactactactgtc
 agcaattcaactcttatccatacactttcggccaggggacaaagctggagatcaagggcggggcgggagtggcggcgg
 aggggtccggagggcgggggctccgaggtgcaactagtccagagcggagccgaggtgaagaagcccggggagagtcta
 aagatctcttgaagggctccggttactccttctcagttcctggatcgggtgggtgcgacagatgccgggcaagggcctg
 gagtggatgggcattatctaccccgacgactccgatacccggtatagtcctcgttccagggacaggtgaccatttcgccg
 acaagtctatcagaaccgcctatctgcagtggtccagcttgaaggcctctgacactgccatgtattattgcgccaggcacgtt
 acgatgatctggggggtgatcatcgacttctggggccaggggcacactcgtaaccgtcagttcggaggtggtggatcccag
 GTG cag ctc gtg gag TCC ggc GGC ggc GTT GTC cag CCT GGC cgc TCG ctg cgc
 ctg tca tgc GCC GCT TCG ggt ttc ACG ttc agg TCG TAC GGG atg cac tgg GTC
 AGG cag GCG CCG gga AAA GGC CTG gag tgg GTG GCT atc ATC tgg TAC
 GAC ggc TCC aag aag AAT TAT GCT gac TCC GTC aag gga CGG ttc ACA atc tgc
 CGT GAT aac tgc aag aac acc CTC TAC CTG cag atg AAT TCC CTC AGA GCC
 GAA gac ACA GCC gtg TAT TAT tgc GCC AGG ggc ACC ggc tat aac tgg TTC
 GAT CCA tgg ggc cag GGG ACC ctg GTT acc GTC tcc tcc GGA GGG GGG GGT
 agt gag atc gtg ctg acc cag tgc CCT CGC ACC CTG tcc CTG tcc CCT GGG gag
 CGC gcc ACC CTC tgc tgc AGG GCA tgc cag TCC gtc agt TCC TCC TAT ctg GCC
 tgg tac CAG cag aaa CCT ggc cag GCA cca AGG CTG ctg ATC tac GGA GCT tcc
 TCG AGG GCA ACC GGG ATC CCC gac AGA TTT tcc GGA agc GGA AGT
 GGC ACA gac ttc ACC ctg acc ATC AGT AGG CTT GAC CCC gaa GAT ttc GCC
 GTG tac TAT tgc cag cag tac GGC TCC TCC ccc atc acc ttc ggc cag GGC ACA
 AGA ctg gag atc aag cac CAT cac cac cac cac TAA TAA gcggccgc

D4-27H5 VL2 (D4-VL2) (SEQ ID NO: 9)

Atgggctggtcttgcacatcctgttctcgtggccaccgccaccggcgtccacagcggcatccagctcaccagagccc
 ctgcagcttgagtgccctgggtgggagaccgggtcactatcacctgccgagccagtcagggcattctcctccccccttgctg
 gtaccagcagaagcccggaaggccccaagctgctgatctacgacgctagtagtctggagagtggcgtgccttcgcgc
 ttctcgggcagtgaggagtgaccgacttcaccttgaccatctccagctctacagccggaagatttcgcgacactactactgtc
 agcaattcaactcttatccatacactttcggccaggggacaaagctggagatcaagggcggggcgggagtggcggcgg
 aggggtccggagggcgggggctccgaggtgcaactagtccagagcggagccgaggtgaagaagcccggggagagtcta
 aagatctcttgaagggctccggttactccttctcagttcctggatcgggtgggtgcgacagatgccgggcaagggcctg
 gagtggatgggcattatctaccccgacgactccgatacccggtatagtcctcgttccagggacaggtgaccatttcgccg
 acaagtctatcagaaccgcctatctgcagtggtccagcttgaaggcctctgacactgccatgtattattgcgccaggcacgtt
 acgatgatctggggggtgatcatcgacttctggggccaggggcacactcgtaaccgtcagttcggaggtggtggatccCA

G GTA CAG ctg GTC GAG tcc GGT ggg GGC gtg GTC cag CCC ggc CGG tcc
 CTG CGC CTG TCG tgc GCT GCC TCC ggc TTT ACC ttc CGG TCG TAT GGC
 atg CAT tgg gtg cgc cag GCC CCC GGG aag ggg ctg gag tgg GTC gcc ATT ATC
 tgg tac gat GGC TCC AAG aag aac TAC gct GAT TCG GTT aag ggc cgc TTC ACC
 att AGT CGG GAT aat TCG aag aat ACG CTG TAT CTC CAG atg aac TCC ctg
 AGG GCC GAG gac act gcc GTG TAC TAC tgc gcc CGG GGC ACA GGC TAT
 aac tgg ttc gat ccc tgg GGT cag ggc ACC CTA gtg ACC GTC TCG TCT GGG GGC
 GGA ggg TCA GAT att ctc atg ACA cag TCG ccc TCT AGT CTT tcc GCC tcc gtg
 GGG GAC CGC GTG acc atc ACA tgc AGA GCT TCC CAG GGG atc tcc TCT
 GCG CTG gcc tgg TAT cag cag aag ccc GGG aag GCA CCC AAG ctg CTC ATC
 TAT TAC GCT tct TCG CTG CAA AGT GGG gtg ccg TCC CGC TTC tcc gga AGC
 ggc TCC ggc ACG GAC tac acc CTC acc atc tcc TCC CTG CAG CCT GAG GAT
 ttc GCC acc TAT tac tgc cag cag TAT tac TCC acg ctg ACC TTC GGA GGA GGC
 ACG AAA GTG gag atc aag CAC cac cac cac cac cac TAA TAA gcggccgc

D4-28F11 (D4-F11) (SEQ ID NO: 10)

Atgggctggtcttgcacatcctgttcctcgtggccaccgccaccggcggtccacagcgccatccagctcaccagagccc
 ctgagcttgagtgccctgggtgggagaccgggtcactatcacctgccgagccagtcagggtcctcctccgcccttgctgc
 gtaccagcagaagcccgggaaggcccccaagctgctgatctacgacgctagtagtctggagagtggcgtgccttcgcgc
 ttctcgggcagtgagggtggcaccgacttcaccttgacctctccagttctacagccggaagatttcgcgacctactactgtc
 agcaattcaactcttatccatacaccttcggccaggggacaaagctggagatcaagggcgggggcggggagtgccggcg
 aggggtccggagggcgggggtccgaggtgcaactagtcagagcgagccgaggtgaagaagcccggggagagtcta
 aagatctcttgaagggtccggttactccttctcaggttcttgatcgggtgggtgcgacagatgccgggcaaggcgctg
 gagtggatgggcattatctaccccagcactccgatacccggttatagtcacgttccagggacaggtgacctttccgccg
 acaagtctatcagaaccgcctatctgcagtggtccagttgaaggcctctgacactgccatgtattattgcgccaggcacgtt
 acgatgatctggggggtgatcatcgacttctggggccaggggcacactcgtaaccgtcagttcggaggtggtggatccag
 GTC cag ctg GTT gag TCT GGT GGC GGA gtg gtc cag CCC ggc CGG TCT CTC
 CGC ctg TCC tgc GCC GCT tcc GGG ttc AAG TTC TCC ggc TAC gga atg cac tgg
 gtg AGG cag GCG CCA GGT aag GGG CTC GAG tgg GTC GCG gtg ATA tgg
 TAT gac GGT AGC aag aag tat tac gtg gac AGT GTG AAA ggc CGC TTT acc atc
 TCA CGC GAC AAT TCT aag aac acc ctg TAC CTC CAG atg aac TCC ctg CGC
 gct gag GAC ACG GCG GTG TAC tac TGC GCT AGG cag atg GGG tac tgg cac
 TTC gac CTT tgg ggc AGG GGT acc CTG GTG acc gtc TCA TCC GGC ggc ggc
 GGG TCT gag ATC GTT CTG ACC CAA AGT CCG gcc ACA ctg tcc CTC TCC

CCA GGA gag cgc GCT ACG CTT AGC tgc CGC gcc tcc cag AGC GTG TCC tcc
tac ctg gca tgg TAT cag cag aag CCG GGG cag GCG CCT CGA ctg CTG atc tac gac
gcc TCG aac CGC GCG ACA GGT atc ccc gcg CGC ttc AGC GGC TCC GGT TCG
GGG ACT GAT ttc acc ctg ACC atc tcc TCC CTC GAG cct gag GAT ttc GCA gtg
tac tac tgc cag cag aga TCC AAT tgg ccc CCC CTC acc ttc ggc GGG GGA acc aag
GTG gag atc aag cac cac cac CAT cac TAATAA

D4-DIVHv5 (D4-Hv5) (SEQ ID NO: 11)

Atgggctggtcttgcacatcctgttcctcgtggccaccgccaccggcgtccacagcgccatccagctcaccagagccc
ctcgagcttgagtgccctgggtgggagaccgggtcactatcacctgccgagccagtcaggcgcatctcctccgcccttgccctg
gtaccagcagaagcccgggaaggcccccaagctgctgatctacgacgctagtagtctggagagtggcgtgccttcgcgc
ttctcgggcagtgaggagtgccaccgacttcaccttgaccatctccagctctacagccggaagatttcgcgacctactactgtc
agcaattcaactcttattccatacactttcggccaggggacaaagctggagatcaaggcgggggcgaggagtgccggcg
agggtccggaggcggggggtccgaggtgcaactagtccagagcgaggccgaggtgaagaagcccggggagagtcta
aagatctcttgaagggtccggttactccttctcaggttcttgatcgggtgggtgacagatgccgggcaaggggcctg
gagtggtgggcattatctaccccagcactccgatacccggtatagtcacgttccagggacaggtgaccatttccgccg
acaagtctatcagaaccgcctatctgcagtggtccagctgaaggcctctgacactgccatgtattattgcgccaggcacgtt
acgatgatctggggggtgatcatcgacttctggggccaggggcacactcgtaccgtcagttcggaggtggtggtatcccag
gtt cag ctg gtg cag tcc ggc gcc gag gtg aag aag ccg ggc gct tct gtg aag gtc agc tgt aaa
gcc agt ggc tac aca ttc acc agg tac act atg cac tgg gtg cgc cag gca ccc ggg cag ggg ctg
gaa tgg atc ggg tac atc aat cct tcc cgc ggt tat act aac tat aat caa aag ttc aaa gac cgc gtg
aca att acg acc gat aag agt tca tcc acc gct tac tta cag atg aac tcc ctc aag aca gag gac acc
gcc gtg tac tac tgt gcc cgc tac tac gac gac cat tac tgc ctg gac tac tgg ggc cag ggg acc
acc gta acc gtc agt agt ggc ggg ggc ggc agt cag atc gtg ctg acc cag agt ccg gcg acc ctg
agt ctg tct cct ggt gag cgc gca acg ctg acg tgc tca gcc tcc tgc agt gcc tct tat atg aac tgg
tac cag cag aag ccc ggc aag gcc cct aag cgc tgg atc tac gac acc tgc aag cta gct tgc ggc
gtc ccc tcc cgg ttc tgc ggc tgc ggg tgc ggc acg gac tat tct ctg acc atc aac agt ctg gag
gca gag gac gcc gca acc tac tac tgc cag cag tgg agt tgc aat cct ttc acg ttt ggg cag ggg
acc aag gtg gaa atc aaa cac cat cac cac cat cac TAA TAA gcggccgc

5

D4-DIVHv6 (D4-Hv6) (SEQ ID NO: 12)

Atgggctggtcttgcacatcctgttcctcgtggccaccgccaccggcgtccacagcgccatccagctcaccagagccc
ctcgagcttgagtgccctgggtgggagaccgggtcactatcacctgccgagccagtcaggcgcatctcctccgcccttgccctg
gtaccagcagaagcccgggaaggcccccaagctgctgatctacgacgctagtagtctggagagtggcgtgccttcgcgc

10

ttctcgggcagtgaggagtgccaccgacttcaccttgaccatctccagctctacagccggaagatttcgcgacctactactgtc
agcaattcaactcttatccatacactttcggccaggggacaaagctggagatcaaggcgggggcgggagtgccggcg
aggggtccggaggcgggggctccgaggtgcaactagtccagagcgagccgaggtgaagaagcccggggagagtcta
aagatctcttgaagggtccggttactccttctcaggttcttgatcggttggtgacagatgccgggcaagggcctg
gagtggtgggcattatctaccccgacgactccgatacccggtatagtccatcgttcaggggacaggtgaccattccgccg
acaagtctatcagaaccgcctatctgcagtggtccagctgaaggcctctgacactgccatgtattattgccccaggcacgtt
acgatgatctggggggtgatcatcgacttctggggccaggggcacactcgtaccgtcagttcggaggtggtgatccag
gttcagctggtgcagtcggcgccgaggtgaagaagccggggcgttctgtgaaggtcagctgtaaaggcagtggttaca
cattcaccagggtacactatgcactgggtgcgccaggcacccgggcaggggctggaatggatcgggtacatcaatccttc
cgcggttatactaactatGtcaaaaagttcCaagaccgcgtgacaattacgaccgataagagttcatccaccgcttacttac
agatgaactccctcaagacagaggacaccgctgtactactgtgcccgtactacgacgaccattactgcctggactact
ggggccaggggaccaccgtaaccgtcagtagtgccggggcgccagtcagatcgtgctgaccagagtcggcgacc
ctgagctctgtcctggtgagcgcgcaacgctgacgtgctcagcctcctcagtgcccttctatgaactggtaccagcaga
agcccggcaaggcccttaagcgtggatctacgacacctgaagctagcttcggggcgtcccctcccgttctcgggctcg
gggtcgggcacggactattcttgaccatcaacagctctggaggcagaggacgccgcaacctactactgccagcagtgga
gttcgaatcctttcacgtttgggcaggggaccaaggtggaatcaaacaccatcaccaccatcacTAATAAagcgcc
gc

D4-DIVHv7 (D4-Hv7) (SEQ ID NO: 13)

Atgggctggtcttgcacatcctgttctcgtggccaccgccaccggcgccacagcgccatccagctcaccagagccc
ctcgagcttgagtgccctgggtgggagaccgggtcactatcacctgccgagccagtcagggcattcctccgcccttgcctg
gtaccagcagaagcccgggaaggcccccagctgtgtatctacgacgctagtagtctggagagtggtgctccttcgcgc
ttctcgggcagtgaggagtgccaccgacttcaccttgaccatctccagctctacagccggaagatttcgcgacctactactgtc
agcaattcaactcttatccatacactttcggccaggggacaaagctggagatcaaggcgggggcgggagtgccggcg
aggggtccggaggcgggggctccgaggtgcaactagtccagagcgagccgaggtgaagaagcccggggagagtcta
aagatctcttgaagggtccggttactccttctcaggttcttgatcggttggtgacagatgccgggcaagggcctg
gagtggtgggcattatctaccccgacgactccgatacccggtatagtccatcgttcaggggacaggtgaccattccgccg
acaagtctatcagaaccgcctatctgcagtggtccagctgaaggcctctgacactgccatgtattattgccccaggcacgtt
acgatgatctggggggtgatcatcgacttctggggccaggggcacactcgtaccgtcagttcggaggtggtgatccag
gttcagctggtgcagtcggcgccgaggtgaagaagccggggcgttctgtgaaggtcagctgtaaaggcagtggttaca
cattcaccagggtacactatgcactgggtgcgccaggcacccgggcaggggctggaatggatcgggtacatcaatccttc
cgcggttatactaactataatcaaaagGtcaaaagaccgcTtgacaattacgaccgataagagttcatccaccgcttacttac
agatgaactccctcaagacagaggacaccgctgtactactgtgcccgtactacgacgaccattactgcctggactact
ggggccaggggaccaccgtaaccgtcagtagtgccggggcgccagtcagatcgtgctgaccagagtcggcgacc

ctgagctgtctcctggtgagcgcgcaacgctgacgtgctcagcctcctcagtgccctcttatgaactggtaccagcaga
agcccggcaagggcccctaagcgtggtatctacgacacctcgaagctagcttcgggcgtcccctcccggttctcgggctcg
gggtcgggcacggactattctctgaccatcaacagctctggaggcagaggacgccgcaacctactactgccagcagtggga
gttcgaatcctttcacgtttgggcaggggaccaaggtggaatcaaacaccatcaccaccatcacTAATAAgcggcc
gc

Blina-27H VL1 (Blina-VL1) (SEQ ID NO: 14)

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccgactacaaagatgatgacgataagg
atatccagctgaccagctccagcttcttggctgtgtctctagggcagagggccaccatctcctgcaagggccagccaaag
tgttgattatgatggtgatagttatttgaactggtaccaacagattccagagccacccaaactcctcatctatgatgcatcc
aatctagtttctgggatcccacccaggttagtggcagtggtctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtggagaa
ggtggatgctgcaacctatcactgtcagcaagtagttaggatccgtggacgttcggtggagggaccaagctcgagatca
aagggtggtggtgtcttgccggcggcggcctccggtggtggtggttctcaggtgcagctgcagcagctcgggctgagctg
gtgaggcctgggtcctcagtgaaagtctcgaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaagc
agaggcctggacaggggtcttgagtggttgacagatttgccctggagatggtgataactaactacaatggaaagtcaagg
gtaaagccactctgactgcagacgaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctagcatctgaggactctgcg
gtctatttctgtgcaagacgggagactacgacggtaggccgttattactatgctatggactactggggccaaggggaccacg
gtcaccgtctcctccggaggtggtggatccag GTG cag ctc gtg gag TCC ggc GGC ggc GTT
GTC cag CCT GGC cgc TCG ctg cgc ctg tca tgc GCC GCT TCG ggt ttc ACG ttc agg
TCG TAC GGG atg cac tgg GTC AGG cag GCG CCG gga AAA GGC CTG gag tgg
GTG GCT atc ATC tgg TAC GAC ggc TCC aag aag AAT TAT GCT gac TCC GTC
aag gga CGG ttc ACA atc tcg CGT GAT aac tcg aag aac acc CTC TAC CTG cag atg
AAT TCC CTC AGA GCC GAA gac ACA GCC gtg TAT TAT tgc GCC AGG ggc
ACC ggc tat aac tgg TTC GAT CCA tgg ggc cag GGG ACC ctg GTT acc GTC tcc
tcc GGA GGG GGG GGT agt gag atc gtg ctg acc cag tcg CCT CGC ACC CTG tcc
CTG tcc CCT GGG gag CGC gcc ACC CTC tcg tgc AGG GCA tcg cag TCC gtc agt
TCC TCC TAT ctg GCC tgg tac CAG cag aaa CCT ggc cag GCA cca AGG CTG ctg
ATC tac GGA GCT tcc TCG AGG GCA ACC GGG ATC CCC gac AGA TTT tcc
GGA agc GGA AGT GGC ACA gac ttc ACC ctg acc ATC AGT AGG CTT GAC
CCC gaa GAT ttc GCC GTG tac TAT tgc cag cag tac GGC TCC TCC ccc atc acc ttc
ggc cag GGC ACA AGA ctg gag atc aag cac CAT cac cac cac TAA TAA
gcggccgc

Blina-27H VL2 (Blina-VL2) (SEQ ID NO: 15)

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccgactacaaagatgatgacgataagg
 atatccagctgacccagctcctcagctcttcttggtgtgtctctagggcagagggccaccatctcctgcaaggccagccaaag
 tgttgattatgatggtgatagttattgaactggtaccaacagattccaggacagccacccaaactcctcatctatgatgcatcc
 aatctagtttctgggatcccccaggttagtggcagtggtctgggacagacttcacctcaacatccatcctgtggagaa
 ggtggatgctgcaacctatcactgtcagcaaagtactgaggatccgtggacgttcggtggagggaccaagctcgagatca
 aaggtggtggtggttctggcggcggcggctccggtggtggtggttctcaggtgcagctgcagcagctctgggctgagctg
 gtgaggcctgggtcctcagtgaaagtctcgaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaagc
 agaggcctggacaggggtcttgagtggttgacagatttggcctggagatggtgataactaataatgaaagttaagg
 gtaaagccactctgactgcagacgaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctagcatctgaggactctgcg
 gtctatttctgtgcaagacgggagactacgacggtagggcgttattactatgctatggactactggggccaaggggaccacg
 gtcaccgtctcctccggagggtggtggatccCAG GTA CAG ctg GTC GAG tcc GGT ggg GGC
 gtg GTC cag CCC ggc CGG tcc CTG CGC CTG TCG tgc GCT GCC TCC ggc TTT
 ACC ttc CGG TCG TAT GGC atg CAT tgg gtg cgc cag GCC CCC GGG aag ggg ctg
 gag tgg GTC gcc ATT ATC tgg tac gat GGC TCC AAG aag aac TAC gct GAT TCG
 GTT aag ggc cgc TTC ACC att AGT CGG GAT aat TCG aag aat ACG CTG TAT
 CTC CAG atg aac TCC ctg AGG GCC GAG gac act gcc GTG TAC TAC tgc gcc
 CGG GGC ACA GGC TAT aac tgg ttc gat ccc tgg GGT cag ggc ACC CTA gtg ACC
 GTC TCG TCT GGG GGC GGA ggg TCA GAT att ctc atg ACA cag TCG ccc TCT
 AGT CTT tcc GCC tcc gtg GGG GAC CGC GTG acc atc ACA tgc AGA GCT TCC
 CAG GGG atc tcc TCT GCG CTG gcc tgg TAT cag cag aag ccc GGG aag GCA
 CCC AAG ctg CTC ATC TAT TAC GCT tct TCG CTG CAA AGT GGG gtg ccg
 TCC CGC TTC tcc gga AGC ggc TCC ggc ACG GAC tac acc CTC acc atc tcc TCC
 CTG CAG CCT GAG GAT ttc GCC acc TAT tac tgc cag cag TAT tac TCC acg ctg
 ACC TTC GGA GGA GGC ACG AAA GTG gag atc aag CAC cac cac cac cac
 TAA TAA gcggccgc

Blina-28F11 (Blina-F11) (SEQ ID NO: 16)

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccgactacaaagatgatgacgataagg
 atatccagctgacccagctcctcagctcttcttggtgtgtctctagggcagagggccaccatctcctgcaaggccagccaaag
 tgttgattatgatggtgatagttattgaactggtaccaacagattccaggacagccacccaaactcctcatctatgatgcatcc
 aatctagtttctgggatcccccaggttagtggcagtggtctgggacagacttcacctcaacatccatcctgtggagaa
 ggtggatgctgcaacctatcactgtcagcaaagtactgaggatccgtggacgttcggtggagggaccaagctcgagatca
 aaggtggtggtggttctggcggcggcggctccggtggtggtggttctcaggtgcagctgcagcagctctgggctgagctg
 gtgaggcctgggtcctcagtgaaagtctcgaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaagc

agaggcctggacagggctcttgagtgattggacagatttggcctggagatggtgataactacaatgaaagtcaagg
 gtaaagccactctgactgcagacgaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctagcatctgaggactctgcg
 gtctatttctgtgcaagacgggagactacgacggtaggccgttattactatgctatggactactggggccaagggaccacg
 gtcaccgtctcctccggaggtggtggatcccag GTC cag ctg GTT gag TCT GGT GGC GGA gtg
 gtc cag CCC ggc CGG TCT CTC CGC ctg TCC tgc GCC GCT tcc GGG ttc AAG
 TTC TCC ggc TAC gga atg cac tgg gtg AGG cag GCG CCA GGT aag GGG CTC
 GAG tgg GTC GCG gtg ATA tgg TAT gac GGT AGC aag aag tat tac gtg gac AGT
 GTG AAA ggc CGC TTT acc atc TCA CGC GAC AAT TCT aag aac acc ctg TAC
 CTC CAG atg aac TCC ctg CGC gct gag GAC ACG GCG GTG TAC tac TGC GCT
 AGG cag atg GGG tac tgg cac TTC gac CTT tgg ggc AGG GGT acc CTG GTG acc
 gtc TCA TCC GGC ggc ggc GGG TCT gag ATC GTT CTG ACC CAA AGT CCG
 gcc ACA ctg tcc CTC TCC CCA GGA gag cgc GCT ACG CTT AGC tgc CGC gcc
 tcc cag AGC GTG TCC tcc tac ctg gca tgg TAT cag cag aag CCG GGG cag GCG
 CCT CGA ctg CTG atc tac gac gcc TCG aac CGC GCG ACA GGT atc ccc gcg CGC
 ttc AGC GGC TCC GGT TCG GGG ACT GAT ttc acc ctg ACC atc tcc TCC CTC
 GAG cct gag GAT ttc GCA gtg tac tac tgc cag cag aga TCC AAT tgg ccc CCC CTC
 acc ttc ggc GGG GGA acc aag GTG gag atc aag cac cac cac CAT cac TAATAA

Blina-DIVHv5 (Blina-Hv5) (SEQ ID NO: 17)

atgggatggagctgtatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgactacaaagatgatgacgataagg
 atatccagctgaccagctcctcagcttcttggctgtgtctctagggcagagggccaccatctcctgcaagggcagccaaag
 tgttgattatgatggtgatagttatttgaactggtaccaacagattccaggacagccacccaaactcctcatctatgatgcattc
 aatctagtttctgggacccaccaggtttagtggcagtggtctgggacagacttcacctcaacatccatcctgtggagaa
 ggtggatgctgcaacctatcactgtcagcaaagtactgaggatccgtggacgttcggtggagggaccaagctcgagatca
 aagggtggtggtgttctggcggcggcgctccggtggtggtgttctcaggtgcagctgcagcagctctgggctgagctg
 gtgaggcctgggtcctcagtgaaagtctcgtcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaagc
 agaggcctggacagggctcttgagtgattggacagatttggcctggagatggtgataactacaatgaaagtcaagg
 gtaaagccactctgactgcagacgaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctagcatctgaggactctgcg
 gtctatttctgtgcaagacgggagactacgacggtaggccgttattactatgctatggactactggggccaagggaccacg
 gtcaccgtctcctccggaggtggtggatcccag gtt cag ctg gtg cag tcc ggc gcc gag gtg aag aag ccg
 ggc gct tct gtg aag gtc agc tgt aaa gcc agt ggc tac aca ttc acc agg tac act atg cac tgg gtg
 cgc cag gca ccc ggg cag ggg ctg gaa tgg atc ggg tac atc aat cct tcc cgc ggt tat act aac
 tat aat caa aag ttc aaa gac cgc gtg aca att acg acc gat aag agt tca tcc acc gct tac tta cag
 atg aac tcc ctc aag aca gag gac acc gcc gtg tac tac tgt gcc cgc tac tac gac gac cat tac

tgc ctg gac tac tgg ggc cag ggg acc acc gta acc gtc agt agt ggc ggg ggc ggc agt cag atc
gtg ctg acc cag agt ccg gcg acc ctg agt ctg tct cct ggt gag cgc gca acg ctg acg tgc tca
gcc tcc tcg agt gcc tct tat atg aac tgg tac cag cag aag ccc ggc aag gcc cct aag cgc tgg
atc tac gac acc tcg aag cta gct tcg ggc gtc ccc tcc cgg ttc tcg ggc tcg ggg tcg ggc acg
gac tat tct ctg acc atc aac agt ctg gag gca gag gac gcc gca acc tac tac tgc cag cag tgg
agt tcg aat cct ttc acg ttt ggg cag ggg acc aag gtg gaa atc aaa cac cat cac cat cac
TAA TAA gcggccgc

Blina-DIVHv6 (Blina-Hv6) (SEQ ID NO: 18)

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccgactacaaagatgatgacgataagg
atatccagctgacccagctcctcagcttcttggctgtgtcttagggcagagggccaccatctcctgcaaggccagccaaag
tgttgattatgatggtgatagttattgaactggtaccaacagattccaggacagccacccaaactcctcatctatgatgcatcc
aatctagtttctgggatcccccaggttagtggtgagtggtctgggacagacttcaccccaacatccatcctgtggagaa
ggtggatgctgcaacctatcactgtcagcaaaagtactgaggatccgtggacgttcggtggagggaaccaagctcgagatca
aagggtggtggtgtcttggcggcggcggtccggtggtggtgtctcaggtgcagctgcagcagctctggggctgagctg
gtgaggcctgggtcctcagtgaaatttctgcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaagc
agaggcctggacagggctttagtggtggtgacagatttggcctggagatggtgataactaactacaatggaaagtcaagg
gtaaagccactctgactgcagacgaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctagcatctgaggactctgcg
gtctatttctgtgcaagacgggagactacgacggtagggcgttattactatgctatggactactggggccaagggaaccacg
gtcacctctcctccggaggtggtggatcccaggttcagctggtgcagtcggcgccgaggtgaagaagccggcgctt
ctgtgaaggctcagctgtaaaagccagtggctacacattcaccaggtacactatgcactgggtgcgccaggcaccgggacg
gggctggaatggatcggttacatcaatccttcccgcggttataactatGCtcaaaagttcCaagaccgcgtgacaatt
acgaccgataagagttcatccaccgcttacttacagatgaactccctcaagacagaggacaccgccgtgtactactgtgcc
cgctactacgacgaccattactgcctggactactggggccaggggaccaccgtaaccgtcagtagtgccggggggcgga
gtcagatcgtgctgaccagagtcggcgaccctgagctgtctcctggtgagcgcgaacgctgacgtgctcagcctcct
cgagtgcctcttatatgaactggtaccagcagaagcccggcaaggcccctaagcgctggatctacgacacctggaagcta
gcttcgggctccccctcccgttctcgggctcggggtcgggcacggactattcttgaccatcaacagctctggaggcaga
ggacgccgcaacctactactgccagcagtggtggttcgaatcctttcacgttgggcaggggaccaaggtggaatacaaac
accatcaccaccatcacTAATAAgcgccgc

5

Blina-DIVHv7 (Blina-Hv7) (SEQ ID NO: 19):

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccgactacaaagatgatgacgataagg
atatccagctgacccagctcctcagcttcttggctgtgtcttagggcagagggccaccatctcctgcaaggccagccaaag
tgttgattatgatggtgatagttattgaactggtaccaacagattccaggacagccacccaaactcctcatctatgatgcatcc

10

aatcatgtttctgggatcccaccaggtttagtggcagctgggtctgggacagactacccctcaacatccatcctgtggagaa
ggtgggatgctgcaacctatcactgtcagcaaagtactgaggatccgtggacgttcggtggaggggaccaagctcgagatca
aagggtggtggtggttctggcggcggcggtccgggtggtggtggttctcaggtgcagctgcagcagctctggggctgagctg
gtgaggcctgggtcctcagtgaaagtattcctgcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaaactgggtgaagc
agaggcctggacaggggtcttgagtggattggacagatttggcctggagatggtgataactaactacaatggaaagtccaagg
gtaaaggccactctgactgcagacgaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctagcatctgaggactctgcg
gtctatttctgtgcaagacgggagactacgacggtaggccgttattactatgctatggactactggggccaaggggaccacg
gtcaccgtctcctccggagggtgggtggtatcccaggttcagctggtgcagtcgccggcgccgaggtgaagaagccgggcgctt
ctgtgaaggtcagctgtaaaggcagtggtgtacacattcaccagggtacactatgcactgggtgcgccagggcacccgggacg
gggctggaatggatcgggtacatcaatccttcccgcggttataactataatcaaaagGtcaaagaccgcTtgacaatt
acgaccgataagagttcatccaccgcttacttacagatgaactccctcaagacagaggacaccgccgtgtactactgtgcc
cgctactacgacgaccattactgcctggactactggggccaaggggaccaccgttaaccgtcagtagtggcgggggcgggca
gtcagatcgtgctgaccagagtcgccggcgacctgagctgtctcctggtgagcgcgcaacgctgacgtgctcagcctcct
cgagtgcctcttatatgaactggtaccagcagaagccccggcaaggcccctaagcgctggatctacgacacctgaagcta
gcttcggggtccccctcccggttctcgggctcggggctcgggcacggactattcttgaccatcaacagtctggaggcaga
ggacgccgcaacctactactgccagcagtggaagtcgaatcctttcacgttggggcaggggaccaaggtggaatcaaac
accatcaccaccatcacTAATAAgcgccgcg

D4(19)-BBz ORF (SEQ ID NO: 20):

atgggctggcttgcatcatcctgttccctgtggccaccgccaccggcgtccacagcgccatccagctcaccagagcccc
tcgagcttgaagtgcctcgggtgggagaccgggtcactatcacctgccgagccagtcaggggcatctcctccgcccttgccctgg
taccagcagaagccccgggaaggcccccaagctgctgatctacgacgctagtagtctggagagtggcgtgccttcgcgcctt
ctcgggcagtgggagtggcaccgacttcaccttgaccatctccagctctacagccggaagatttcgcgacctactactgtcag
caattcaactcttatccatacaccttccggccagggggacaaaagctggagatcaaggcgggggcggggagtggcggcgggag
ggtcgggagcggggggctccgaggtgcaactagtcagagcgggagccgaggtgaagaagccccgggggagagtctaaa
gatctcttgcaagggtccgggtfactccttctcgagttcctggatcgggtgggtgcgacagatgccgggcaagggcctggga
gtggatgggcattatctaccccgacgactccgatacccggttatagtcacatcggtccagggacaggtgaccatttcgccgac
aagtctatcagaaccgcctatctgcagtggtccagctctgaaggcctctgacactgccatgtattattgcgccaggcacgttac
gatgatctggggggtgatcatcgacttctggggccagggcacactcgtaacccgtcagttctgcggccgcaaccacgacgc
cagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgctgcagcccctgtccctgcgccagaggcggtgccggcca
gcggcgggggggcgcagtgcacacgaggggggctggacttcgcttctgtatatctacatctgggcgcccttgccggggactt
gtggggctccttctcctgtcactggttatcaccttctactgcgaacggggcgagaaagaaactcctgtatatattcaaacaccat
ttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaagaaggaggatgtgaa
ctgagagtgaaattcagcaggagcgagacgccccgcgtacaagcagggccagaaaccagctctataacgagctcaat

ctaggacgaagagaggagtacgacgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaag
gaagaacccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaa
ggcgagcggcggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgc
ccttcacatgcaggccctgccccctcgctaataa

12B(19)-BBZ ORF (SEQ ID NO: 21):

atgggggtggtcgtgcatcatcctgtttctgggtggccacagcaaccggcgtgcacagtgagattgtgctgacccaaagcccg
gacttccagtcctgacccccaaggagaagggtaccatcacgtgccgcgcctctgaaagcgtggacacgttcgggatctc
cttcatgaattggttcagcagaagccagatcagtcacccaaactcctgatccacgccgccagtaatacagggctcagggctc
ccgtccaggttctctggcagtggtcctccgtactgacttcacctaaccatcaactctctggaggcagaggacgccccacat
acttctccaacagagcaaggagtgcccttcaccttcggaggtgggaccaaggctgaaatcaaggaggggggggggt
ccggcggcggcgatccggaggcggcggcagcgaggtgcagctcgtcagagtggggggcgactggtgcaaccag
ggggctctctcggtgagctgcgtgctccggattcacattctcctgctcctggatgaactgggttcgccaggcccccg
gcaaaggcctggagtgggtcggcagaatctaccaggcgacggggacacgaactacaacggcaagtcaagggccgg
ttcacaatctcgcgcgacgactcaaaaaacagcctgtatctccagatgaactccctgaaaaccgaggacaccgccgtgtatt
actgtgcacgcagcggctttatcaccaccgttctggacttcgattattggggccagggtaccctggtgacggtaagttcggc
ggccgcaaccacgacgccagcggcgaccaccaacacggcgcccaccatcgctcgcagccccgttccctgcgcc
cagaggcgtgccggccagcggcggggggcgagtgacacaggggggctggacttcgctgtgatactacatctggg
cgcccttgccgggactgtgggtccttctcctgtcactggttatccctttactgcaaacggggcgagaaagaaactcctg
tatatattcaaaacacatttatgagaccagtacaaactactcaagagggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaaga
agaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcaggggccagaaccagc
tctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgacgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatggg
gggaaagccgagaagggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctaca
gtgagattgggatgaaaggcagcggcgaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccacca
aggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgctaataa

5

Blin.19BBZ ORF (SEQ ID NO: 22):

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgactacaaagatgatgacgataagg
atatccagctgacccagctcagcttctttggctgtgtctctagggcagaggggccaccatctcctgcaaggccagccaaag
tgttgattatgatggtgatagttatttgaactggtaccaacagattccaggacagccacccaaactcctcatctatgatgcatcc
aatctagtittctggatcccccagggtttagtggaagtgggtctgggacagacttcacctcaacatccatcctgtggagaa
ggtggatgtgcaacctatcactgtcagcaaaagtactgaggatccgtggacgttcggtggagggaaccaagctcgagatca
aagggtggtggtgtctggcggcgggcctccggtggtggtgttctcaggtgcagctgcagcagctctggggtgagctg
gtgaggcctgggtcctcagtgaaagtctcgaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaagc

10

agaggcctggacaggggtcttgagtggttgacagatttggcctggagatggtgataactaactacaatggaaagttcaagg
 gtaaaagccactctgactgcagacgaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctagcatctgaggactctgcg
 gtctatttctgtgcaagacgggagactacgacggtagggcgttattactatgctatggactactggggccaagggaccacg
 gtcaccgtctcctccgcgccgcaaccacgacgccagcgccgaccaccaacaccggcgccaccatcgctcgca
 gcccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcgcgggggcgagtgccacacgagggggctggacttcgcct
 gtgatatctacatctggcgcccttgccgggacttggtgggtccttctcctgtcactggttatcaccctttactgcaaacggg
 gcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctg
 ccgatttccagaagaagaagaaggaggtgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaa
 gcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgacgtttggacaagagacgtggc
 cgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataa
 gatggcgaggccctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggagggggcaaggggcacgatggcctttaccagg
 gtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgctaataa

Se pretende que las reivindicaciones adjuntas se interpreten para incluir todas las realizaciones y variaciones equivalentes.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of the university of Pennsylvania June, Carl H Zhao, Yangbing Liu, Xiaojun

10 <120> MEJORA DE LA ACTIVIDAD DE LOS CAR DE LINFOCITOS T MEDIANTE LA INTRODUCCIÓN CONJUNTA DE UN ANTICUERPO BISPECIFICO

<130> 046483-6073-00-WO.602595

15 <150> US 61/671.535

<151> 13/07/2012

<160> 22

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1605

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Sintetizada químicamente

30 <400> 1

ES 2 786 263 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgac 60
taciaagatg atgacgataa ggatatccag ctgacccagt ctccagcttc tttggctgtg 120
tctctagggc agagggccac catctcctgc aaggccagcc aaagtgttga ttatgatggg 180
gatagttatt tgaactggta ccaacagatt ccaggacagc cacccaaact cctcatctat 240
gatgcatcca atctagtttc tgggatccca cccaggttta gtggcagtgg gtctgggaca 300
gacttcaccc tcaacatcca tcctgtggag aagggtggatg ctgcaaccta tcaactgtcag 360
caaagtactg aggatccgtg gacgttcggg ggagggacca agctcgagat caaagggtgg 420
gggtggttctg gcggcgccgg ctccggtggg ggtggttctc aggtgcagct gcagcagctc 480
ggggctgagc tgggtgaggcc tgggtcctca gtgaagattt cctgcaaggc ttctggctat 540
gcattcagta gctactggat gaactgggtg aagcagaggc ctggacaggg tcttgagtgg 600
attggacaga tttggcctgg agatggtgat actaactaca atggaaagtt caagggtaaa 660
gccactctga ctgcagacga atcctccagc acagcctaca tgcaactcag cagcctagca 720
tctgaggact ctgcggtcta tttctgtgca agacgggaga ctacgacggg aggccgttat 780
tactatgcta tggactactg gggccaaggg accacgggtca cagtctctc cggaggtggg 840
ggatccgata tcaaactgca gcagtcaggg gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg 900
aagatgtcct gcaagacttc tggctacacc tttactaggt acacgatgca ctgggtaaaa 960
cagaggcctg gacagggctt ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tggttatact 1020
aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca 1080
gcctacatgc aactgagcag cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga 1140
tattatgatg atcattactg ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 1200
tcagtcgaag gtggaagtgg aggttctggg ggaagtggag gttcaggtgg agtcgacgac 1260
gccgccattc agctgaccca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggctc 1320
accatgacct gcagagccag ttcaagtgtg agttacatga actggtacca gcagaagtca 1380
ggcacctccc caaaagatg gatttatgac acatccaaag tggcttctgg agtcccttat 1440
cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctca tactctctca caatcagcag catggaggct 1500
gaagatgctg ccacttatta ctgccaacag tggagtagta acccgctcac gttcgggtgct 1560
gggaccaagc tggagctgaa acatcatcac catcatcatt aataa 1605

5 <210> 2
<211> 1557
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sintetizada químicamente
<400> 2

ES 2 786 263 T3

atgggctggt cttgcatcat cctgttcctc gtggccaccg ccaccggcgt ccacagcgcc 60
atccagctca cccagagccc ctcgagcttg agtgcctcgg tgggagaccg ggtcactatc 120
acctgccgag ccagtcaggg catctcctcc gcccttgctt ggtaccagca gaagcccggg 180
aaggccccc agctgctgat ctacgacgct agtagtcttg agagtggcgt gccttcgcgc 240
ttctcgggca gtgggagtgg caccgacttc accttgacca tctccagtct acagccggaa 300
gatttcgcga cctactactg tcagcaattc aactcttata catacacttt cggccagggg 360
acaaagctgg agatcaaggg cgggggaggg agtggcggcg gaggggtccg aggcggggggc 420
tccgaggtgc aactagtcca gagcggagcc gaggtgaaga agcccgggga gagtctaaag 480
atctcttgca agggctccgg ttactccttc tcgagttcct ggatcgggtg ggtgcgacag 540
atgccgggca agggcctgga gtggatgggc attatctacc ccgacgactc cgatacccggt 600
tatagtccat cgttccaggg acaggtgacc atttccgccg acaagtctat cagaaccgcc 660
tatctgcagt ggtccagtct gaaggcctct gacactgcca tgtattattg cgccaggcac 720
gttacgatga tctggggggg gatcatcgac ttctggggcc agggcacact cgtaaccgtc 780
agttctggag gtggtggatc cgatatcaaa ctgcagcagt caggggctga actggcaaga 840
cctggggcct cagtgaagat gtcctgcaag acttctggct acacctttac taggtacacg 900
atgcactggg taaaacagag gcctggacag ggtctggaat ggattggata cattaatcct 960
agccgtgggt atactaatta caatcagaag ttcaaggaca aggccacatt gactacagac 1020
aaatcctcca gcacagccta catgcaactg agcagcctga catctgagga ctctgcagtc 1080
tattactgtg caagatatta tgatgatcat tactgccttg actactgggg ccaaggcacc 1140
actctcacag tctcctcagt cgaaggtgga agtggaggtt ctggtggaag tggaggttca 1200
ggtggagtcg acgacgccgc cattcagctg acccagtctc cagcaatcat gtctgcatct 1260
ccaggggaga aggtcaccat gacctgcaga gccagttcaa gtgtaagtta catgaactgg 1320
taccagcaga agtcaggcac ctccccaaa agatggattt atgacacatc caaagtggct 1380
tctggagtcc cttatcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcatactc tctcacaatc 1440
agcagcatgg aggtgaaga tgctgccact tattactgcc aacagtggag tagtaacccg 1500
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacatc atcaccatca tcattaa 1557

5 <210> 3
<211> 1563
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sintetizada químicamente
<400> 3

ES 2 786 263 T3

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
 ccgggatccc aggtacaact gcagcagtct gggcctgagc tggagaagcc tggcgcttca 120
 gtgaagatat cctgcaaggc ttctggttac tcattcactg gctacaccat gaactgggtg 180
 aagcagagcc atggaaagag ccttgagtgg attggactta ttactcctta caatgggtgct 240
 tctagctaca accagaagtt caggggcaag gccacattaa ctgtagacaa gtcattccagc 300
 acagcctaca tggacctcct cagtctgaca tctgaagact ctgcagtcta tttctgtgca 360
 aggggggggtt acgacgggag gggttttgac tactggggcc aaggggaccac ggtcaccgtc 420
 tcctcaggtg gaggcggttc aggcggcggt ggctctagcg gtggcggtatc ggacatcgag 480
 ctactcagt ctccagcaat catgtctgca tctccagggg agaaggtcac catgacctgc 540
 agtgccagct caagtgtaag ttacatgcac tggtagcagc agaagtcagg cacctcccc 600
 aaaagatgga tttacgacac atccaaactg gcttctggag tcccaggctg cttcagtggtc 660
 agtgggtctg gaaactctta ctctctcaca atcagcagcg tggaggctga agacgacgca 720
 acttattact gccagcagtg gagtaagcac cctctcacgt acggtgctgg gacaaagttg 780
 gaaatcaaag gaggtggtgg atccgatatc aaactgcagc agtcaggggc tgaactggca 840
 agacctgggg cctcagtga gatgtcctgc aagacttctg gctacacctt tactaggtac 900
 acgatgcact gggtaaaaca gaggcctgga caggggtctgg aatggattgg atacattaat 960
 cctagccgtg gttatactaa ttacaatcag aagttcaagg acaaggccac attgactaca 1020
 gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcaa ctgagcagcc tgacatctga ggactctgca 1080
 gtctattact gtgcaagata ttatgatgat cattactgcc ttgactactg gggccaaggc 1140
 accactctca cagtctcctc agtcgaagggt ggaagtggag gttctggtgg aagtggagggt 1200
 tcaggtggag tcgacgacgc cgccattcag ctgaccagc ctccagcaat catgtctgca 1260
 tctccagggg agaaggtcac catgacctgc agagccagtt caagtgtaag ttacatgaac 1320
 tggtagcagc agaagtcagg cacctcccc aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg 1380
 gcttctggag tcccttatcg cttcagtggtc agtgggtctg ggacctcata ctctctcaca 1440
 atcagcagca tggaggctga agatgctgcc acttattact gccaacagtg gagtagtaac 1500
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac atcatcacca tcatcattaa 1560
 taa 1563

5 <210> 4
 <211> 1563
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 4

ES 2 786 263 T3

```

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg      60
ccgggatccg acatcgagct cactcagtct ccagcaatca tgtctgcatc tccagggggag      120
aaggtcacca tgacctgcag tgccagctca agtgtaagtt acatgcactg gtaccagcag      180
aagtcaggca cctcccccaa aagatggatt tacgacacat ccaaactggc ttctggagtc      240
ccaggtcgct tcagtggcag tgggtctgga aactcttact ctctcacaat cagcagcgtg      300
gaggctgaag acgacgcaac ttattactgc cagcagtgga gtaagcaccc tctcacgtac      360
ggtgctggga caaagttgga aatcaaaggt ggtggtgggt ctggcggcgg cggtccgggt      420
ggtggtgggt ctcaggtaca actgcagcag tctgggcctg agctggagaa gcctggcgct      480
tcagtgaaga tatcctgcaa ggcttctggt tactcattca ctggctacac catgaactgg      540
gtgaagcaga gccatggaaa gagccttgag tggattggac ttattactcc ttacaatggt      600
gcttctagct acaaccagaa gttcaggggc aaggccacat taactgtaga caagtcattcc      660
agcacagcct acatggacct cctcagtctg acatctgaag actctgcagt ctatttctgt      720
gcaagggggg gttacgacgg gaggggtttt gactactggg gccaaaggac cacggtcacc      780
gtctcctcag gaggtggtgg atccgatatc aaactgcagc agtcaggggc tgaactggca      840
agacctgggg cctcagtga aatgtcctgc aagacttctg gctacacctt tactaggtac      900
acgatgcact gggtaaaaca gaggcctgga caggggtctgg aatggattgg atacattaat      960
cctagccgtg gttatactaa ttacaatcag aagttcaagg acaaggccac attgactaca     1020
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcaa ctgagcagcc tgacatctga ggactctgca     1080
gtctattact gtgcaagata ttatgatgat cattactgcc ttgactactg gggccaaggc     1140
accactctca cagtctcctc agtcgaaggt ggaagtggag gttctggtgg aagtggagggt     1200
tcaggtggag tcgacgacgc cgccattcag ctgaccagct ctccagcaat catgtctgca     1260
tctccagggg agaaggtcac catgacctgc agagccagtt caagtgtgaa ttacatgaac     1320
tggtaccagc agaagtcagg cacctcccc aaaagatgga tttatgacac atccaaagtg     1380
gcttctggag tcccttatcg cttcagtggc agtgggtctg ggacctcata ctctctcaca     1440
atcagcagca tggaggctga agatgctgcc acttattact gccaacagtg gagtagtaac     1500
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac atcatcacca tcatcattaa     1560
taa                                                                    1563

```

5 <210> 5
 <211> 1566
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizada químicamente
 <400> 5

ES 2 786 263 T3

atgctgctgc tgggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccacccccgc ctttctgctg 60
atccccgaca tccagatgac ccagagcccc agcagcgtga gcgccagcgt gggcgaccgg 120
gtgaccatca cctgccgggc cagccagggc atcaacacct ggctggcctg gtatcagcag 180
aagccccgca agggccccaa gctgctgata tacgccgcca gcagcctgaa gagcggcgtg 240
cccagccggg ttagcggctc tggctctggc gccgacttca ccctgaccat cagcagcctg 300
cagccccgag acttcgccac ctactactgc cagcaggcca acagcttccc cctgaccttt 360
ggcggcgga caaagggtga gatcaagggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc 420
ggcgagggca gcaccaaggg ccagggtgag ctgggtgcaga gcggagccga ggtgaagaag 480
cctggcgcct ccgtcaagggt gtcctgagag gccagcggct acaccttcac cagctacggc 540
ttcagctggg tgcggcaggc accaggccag ggcctcgaat ggatgggctg gatcagcgcc 600
agcaacggca acacctacta cgcccagaag ctgcagggca gggtcaccat gaccaccgac 660
accagcacca gcagcgccta catggaactg cggagcctga gaagcgacga caccgccgtg 720
tactactgag ccagggtgta cgccgactac gccgattact ggggccaggg caccctgggtg 780
accgtgagca gcggaggtgg tggatccgat atcaaactgc agcagtcagg ggctgaactg 840
gcaagacctg gggcctcagt gaagatgtcc tgcaagactt ctggctacac ctttactagg 900
tacacgatgc actgggtaaa acagaggcct ggacaggggtc tggaatggat tggatacatt 960
aatcctagcc gtgggttatac taattacaat cagaagttca aggacaaggc cacattgact 1020
acagacaaat cctccagcac agcctacatg caactgagca gcctgacatc tgaggactct 1080
gcagtctatt actgtgcaag atattatgat gatcattact gccttgacta ctggggccaa 1140
ggcaccactc tcacagtctc ctgagtcgaa ggtggaagtg gaggttctgg tggaaagtga 1200
ggttcagggt gagtcgacga cgccgccatt cagctgaccc agtctccagc aatcatgtct 1260
gcatctccag gggagaagggt caccatgacc tgcagagcca gttcaagtgt aagttacatg 1320
aactggtacc agcagaagtc aggcacctcc cccaaaagat ggatttatga cacatccaaa 1380
gtggcttctg gagtccctta tcgcttcagt ggcagtgggt ctgggacctc atactctctc 1440
acaatcagca gcatggaggc tgaagatgct gccacttatt actgccaaca gtggagtagt 1500
aaccgctca cgttcggtgc tgggaccaag ctggagctga aacatcatca ccatcatcat 1560
taataa 1566

<210> 6
<211> 1554
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 6

ES 2 786 263 T3

atggcgctac cggtgaccgc actcctgctg ccactcgccc tcctgctcca cgccgcccgc 60
 cccgatatcc agctgaccca atcacctgctg tccctgtctg cctccgtggg cgaccgggtg 120
 acgatcacct gtagtgcttc gagcagtgtg cggttcatcc actggtacca acagaagccc 180
 ggcaaggcac caaagcgggt gatctacgac accagcaagc tggcgtctgg ggtgcccagc 240
 aggttctcgg gaagtggtag tggcacagac ttcactctca ccatcagttc actccagccg 300
 gaggactttg ccacctacta ttgccagcag tggtcctcgt ccccttttac cttcggccag 360
 ggaacaaagg tggaaattaa gggttcgacc tccggggggg gctccgggtg gggctccggc 420
 ggggggggct catcgaggt tcagctggtg gagagcggcg gcggcctggt gcagcccggc 480
 gggagtctgc ggctgtcctg tgccgccagc ggcttcaaca tcaaggacta ctacattcac 540
 tgggtgcggc aagccccagg caagggctctg gagtgggtgg cttggattga ccctgaaaac 600
 ggcgacactg agttcgtgcc aaaattccag gggcgggcga ccatctccgc cgacacctcc 660
 aagaatacgg cctacctgca gatgaactcc ctgcgcgccg aagacacagc ggtctactac 720
 tgcaagacag ggggtttctg gggccagggc accctcgtga ccgtttcgag tgccgccggc 780
 ggaggtggtg gatccgatat caaactgcag cagtcagggg ctgaactggc aagacctggg 840
 gcctcagtga agatgtcctg caagacttct ggctacacct ttactaggta cacgatgcac 900
 tgggtaaaac agaggcctgg acagggctctg gaatggattg gatacattaa tcctagccgt 960
 ggttatacta attacaatca gaagttcaag gacaaggcca cattgactac agacaaatcc 1020
 tccagcacag cctacatgca actgagcagc ctgacatctg aggactctgc agtctattac 1080
 tgtgcaagat attatgatga tcattactgc cttgactact ggggccaagg caccactctc 1140
 acagtctcct cagtcgaagg tggaagtgga ggttctggtg gaagtggagg ttcaggtgga 1200
 gtcgacgacg ccgccattca gctgaccag tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg 1260
 gagaagggtca ccatgacctg cagagccagt tcaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag 1320
 cagaagtcag gcacctcccc caaaagatgg atttatgaca catccaaagt ggcttctgga 1380
 gtcccttata gcttcagtgg cagtgggtct gggacctcat actctctcac aatcagcagc 1440
 atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcacg 1500
 ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa catcatcacc atcatcatta ataa 1554

<210> 7
 <211> 1605
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 7

ES 2 786 263 T3

atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctatatt taaaagggtgt ccagtgtctct 60
agagatatatt tgctgaccca aactccactc tccctgcctg tcagtcttgg agatcaagcc 120
tccatctctt gcagatctag tcagagtctt gtacaccgta atggaaacac ctattttacat 180
tggtacctgc agaagccagg ccagtctcca aagctcctga ttcacaaagt ttccaaccga 240
ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 300
atcagcagag tggaggctga ggatctggga gtttatttct gttctcaaag tacacatgtt 360
cctccgctca cgttcgggtgc tgggaccaag ctggagctga aacgggctga tgctgcacca 420
actgtatcca tcttcccagg ctccggcggt ggtgggctcg gtggcgagggt gaagcttcag 480
cagtctggac ctacgttggg ggagcctggc gcttcagtga tgatatcctg caaggcttct 540
ggttcctcat tcaactggcta caacatgaac tgggtgaggc agaacattgg aaagagcctt 600
gaatggattg gagctattga tccttactat ggtggaacta gctacaacca gaagttcaag 660
ggcagggcca cattgactgt agacaaatcg tccagcacag cctacatgca cctcaagagc 720
ctgacatctg aggactctgc agtctattac tgtgtaagcg gaatggagta ctgggggtcaa 780
ggaacctcag tcaccgtctc ctccagccaaa acgacacccc catcagtcta tggagggtgg 840
ggatccgata tcaaactgca gcagtcaggg gctgaactgg caagacctgg ggcctcagtg 900
aagatgtcct gcaagacttc tggctacacc ttactagggt acacgatgca ctggggtaaaa 960
cagaggcctg gacagggctt ggaatggatt ggatacatta atcctagccg tgggtataact 1020
aattacaatc agaagttcaa ggacaaggcc acattgacta cagacaaatc ctccagcaca 1080
gcctacatgc aactgagcag cctgacatct gaggactctg cagtctatta ctgtgcaaga 1140
tattatgatg atcattactg ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 1200
tcagtcgaag gtggaagtgg aggttcttgg ggaagtggag gttcagggtg agtcgacgac 1260
gccgccattc agctgaccca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaagggtc 1320
accatgacct gcagagccag ttcaagtgta agttacatga actggtacca gcagaagtca 1380
ggcacctccc ccaaagatg gatttatgac acatccaaag tggcttcttg agtcccttat 1440
cgcttcagtg gcagtgggtc tgggacctca tactctctca caatcagcag catggagggt 1500
gaagatgctg ccacttatta ctgccaacag tggagtagta acccgctcac gttcgggtgct 1560
gggaccaagc tggagctgaa acatcatcac catcatcatt aataa 1605

<210> 8
<211> 1525
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 8

ES 2 786 263 T3

atgggctggt cttgcatcat cctgttcctc gtggccaccg ccaccggcgt ccacagcgcc 60
atccagctca cccagagccc ctcgagcttg agtgcctcgg tgggagaccg ggtcactatc 120
acctgccgag ccagtcaggg catctcctcc gcccttgctt ggtaccagca gaagcccggg 180
aaggccccc aagctgctgat ctacgacgct agtagtctgg agagtggcgt gccttcgcgc 240
ttctcgggca gtgggagtg caccgacttc accttgacca tctccagtct acagccggaa 300
gatttcgcga cctactactg tcagcaattc aactcttata catacacttt cggccagggg 360
acaaagctgg agatcaaggg cgggggaggg agtggcggcg gaggggtccg aggcggggggc 420
tccgaggtgc aactagtcca gagcggagcc gaggtgaaga agcccgggga gagtctaaag 480
atctcttgca agggctccgg ttactccttc tcgagttcct ggatcgggtg ggtgcgacag 540
atgccgggca agggcctgga gtggatgggc attatctacc ccgacgactc cgatacccg 600
tatagtccat cgttccaggg acaggtgacc atttccgccg acaagtctat cagaaccgcc 660
tatctgcagt ggtccagtct gaaggcctct gacactgcca tgtattattg cgccaggcac 720
gttacgatga tctggggggg gatcatcgac ttctggggcc agggcacact cgtaaccgtc 780
agttcggagg tgggtgatcc caggtgcagc tcgtggagtc cggcggcggc gttgtccagc 840
ctggccgctc gctgcgcctg tcatgcgccg ctctggggtt cacgttcagg tcgtacggga 900
tgactgggt caggcaggcg ccgggaaaag gcctggagtg ggtggctatc atctgggtacg 960
acggctccaa gaagaattat gctgactccg tcaagggacg gttcacaatc tcgctgata 1020
actcgaagaa caccctctac ctgcagatga attccctcag agccgaagac acagccgtgt 1080
attattgcgc caggggcacc ggctataact ggttcgatcc atggggccag gggaccctgg 1140
ttaccgtctc ctccggaggg gggggtagtg agatcgtgct gaccagtcg cctcgcaccc 1200
tgtccctgtc ccctggggag cgcgccaccc tctcgtgcag ggcatcgcag tccgtcagtt 1260
cctcctatct ggcctggtac cagcagaaac ctggccaggc accaaggctg ctgatctacg 1320
gagcttcctc gagggcaacc gggatccccg acagattttc cggaagcgga agtggcacag 1380
acttcaccct gaccatcagt aggcttgacc ccgaagattt cgccgtgtac tattgccagc 1440
agtacggctc ctccccatc accttcggcc agggcacaag actggagatc aagcaccatc 1500
accaccacca ctaataagcg gccgc 1525

<210> 9
<211> 1519
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 9

atgggctggt cttgcatcat cctgttcctc gtggccaccg ccaccggcgt ccacagcgcc 60

ES 2 786 263 T3

atccagctca cccagagccc ctcgagcttg agtgcctcgg tgggagaccg ggtcactatc 120
acctgccgag ccagtcaggg catctcctcc gcccttgccct ggtaccagca gaagcccggg 180
aaggcccca agctgctgat ctacgacgct agtagtctgg agagtggcgt gccttcgcgc 240
ttctcgggca gtgggagtgg caccgacttc accttgacca tctccagtct acagccggaa 300
gatttcgcga cctactactg tcagcaattc aactcttata catacacttt cggccagggg 360
acaaagctgg agatcaaggg cgggggcggg agtggcggcg gaggggtccg aggcgggggc 420
tccgaggtgc aactagtcca gagcggagcc gaggtgaaga agcccgggga gagtctaaag 480
atctcttgca agggctccgg ttactccttc tcgagttcct ggatcgggtg ggtgcgacag 540
atgccgggca agggcctgga gtggatgggc attatctacc ccgacgactc cgatacccg 600
tatagtccat cgttccaggg acaggtgacc atttccgccg acaagtctat cagaaccgcc 660
tatctgcagt ggtccagtct gaaggcctct gacactgcca tgtattattg cgccaggcac 720
gttacgatga tctggggggg gatcatcgac ttctggggcc agggcacact cgtaaccgtc 780
agttcggagg tgggtggatcc caggtacagc tggtcgagtc cgggtgggggc gtggtccagc 840
ccggccggtc cctgcgcctg tcgtgcgctg cctccggctt taccttccgg tcgtatggca 900
tgcattgggt gcgccaggcc cccgggaagg ggctggagtg ggtcgccatt atctggtacg 960
atggctccaa gaagaactac gctgattcgg ttaagggccg cttcaccatt agtcgggata 1020
attcgaagaa tacgctgtat ctccagatga actccctgag ggccgaggac actgccgtgt 1080
actactgcgc ccggggcaca ggctataact ggttcgatcc ctggggtcag ggcaccctag 1140
tgaccgtctc gtctggggggc ggaggggtcag atattctcat gacacagtcg ccctctagtc 1200
tttccgcctc cgtggggggac cgcgtagcca tcacatgcag agcttcccag gggatctcct 1260
ctgcgctggc ctggtatcag cagaagcccg ggaaggcacc caagctgctc atctattacg 1320
cttcttcgct gcaaagtggg gtgccgtccc gcttctccgg aagcggctcc ggcacggact 1380
acaccctcac catctcctcc ctgcagcctg aggatttcgc cacctattac tgccagcagt 1440
attactccac gctgaccttc ggaggaggca cgaaagtgga gatcaagcac caccaccacc 1500
accactaata agcggccgc 1519

<210> 10
<211> 1517
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 10

atgggctggg cttgcatcat cctgttcctc gtggccaccg ccaccggcgt ccacagcgcc 60
atccagctca cccagagccc ctcgagcttg agtgcctcgg tgggagaccg ggtcactatc 120
acctgccgag ccagtcaggg catctcctcc gcccttgccct ggtaccagca gaagcccggg 180
aaggcccca agctgctgat ctacgacgct agtagtctgg agagtggcgt gccttcgcgc 240

ES 2 786 263 T3

ttctcgggca gtgggagtgg caccgacttc accttgacca tctccagtct acagccggaa 300
 gatttcgcga cctactactg tcagcaattc aactcttata catacacttt cggccagggg 360
 acaaagctgg agatcaaggg cgggggcggg agtggcggcg gaggggtccg aggcgggggc 420
 tccgaggtgc aactagtcca gagcggagcc gaggtgaaga agcccgggga gagtctaaag 480
 atctcttgca agggctccgg ttactccttc tcgagttcct ggatcgggtg ggtgcgacag 540
 atgccgggca agggcctgga gtggatgggc attatctacc ccgacgactc cgatacccgt 600
 tatagtccat cgttccaggg acaggtgacc atttccgccg acaagtctat cagaaccgcc 660
 tatctgcagt ggtccagtct gaaggcctct gacactgcca tgtattattg cgccaggcac 720
 gttacgatga tctggggggg gatcatcgac ttctggggcc agggcacact cgtaaccgtc 780
 agttcggagg tgggtgatcc caggtccagc tggttgagtc tgggtggcga gtggtccagc 840
 ccggccggtc tctccgcctg tcctgcgccg cttccgggtt caagttctcc ggctacggaa 900
 tgcactgggt gaggcaggcg ccaggttaagg ggctcgagtg ggctcggtg atatggtatg 960
 acggtagcaa gaagtattac gtggacagtg tgaaaggccg ctttaccatc tcacgcgaca 1020
 attctaagaa caccctgtac ctccagatga actccctgcg cgctgaggac acggcggtgt 1080
 actactgcmc taggcagatg ggggtactggc acttcgacct ttggggcagg ggtaccctgg 1140
 tgaccgtctc atccggcggc ggcgggtctg agatcggttct gacccaaagt ccggccacac 1200
 tgtccctctc cccaggagag cgcgctacgc ttagctgccg cgcctcccag agcgtgtcct 1260
 cctacctggc atggtatcag cagaagccgg ggcaggcgcc tcgactgctg atctacgacg 1320
 cctcgaaccg cgcgacaggt atccccgcgc gcttcagcgg ctccgggtcg gggactgatt 1380
 tcaccctgac catctcctcc ctcgagcctg aggatttcgc agtgactac tgccagcaga 1440
 gatccaattg gccccccctc accttcggcg ggggaaccaa ggtggagatc aagcaccacc 1500
 accaccatca ctaataa 1517

5 <210> 11
 <211> 1522
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 11

atgggctggg cttgcatcat cctgttcctc gtggccaccg ccaccggcgt ccacagcgcc 60
 atccagctca cccagagccc ctcgagcttg agtgccctcg tgggagaccg ggtcactatc 120
 acctgccgag ccagtcaggg catctcctcc gcccttgccct ggtaccagca gaagcccggg 180
 aaggcccca agctgctgat ctacgacgct agtagtctgg agagtggcgt gccttcgcmc 240
 ttctcgggca gtgggagtgg caccgacttc accttgacca tctccagtct acagccggaa 300
 gatttcgcga cctactactg tcagcaattc aactcttata catacacttt cggccagggg 360

15

ES 2 786 263 T3

acaaagctgg agatcaaggg cgggggaggg agtggcgggc gaggggtccgg aggcggggggc 420
 tccgaggtgc aactagtcca gagcggagcc gaggtgaaga agcccgggga gagtctaaag 480
 atctcttgca agggctccgg ttactccttc tcgagttcct ggatcgggtg ggtgcgacag 540
 atgccgggca agggcctgga gtggatgggc attatctacc ccgacgactc cgatacccgt 600
 tatagtccat cgttccaggg acaggtgacc atttccggcc acaagtctat cagaaccgcc 660
 tatctgcagt ggtccagtct gaaggcctct gacactgcca tgtattattg cgccaggcac 720
 gttacgatga tctggggggg gatcatcgac ttctggggcc agggcacact cgtaaccgtc 780
 agttcggagg tgggtggatcc caggttcagc tgggtgcagtc cggcgccgag gtgaagaagc 840
 cgggcgcttc tgtgaaggtc agctgtaaag ccagtggcta cacattcacc aggtacacta 900
 tgcactgggt gcgccaggca cccgggaggg ggctggaatg gatcgggtac atcaatcctt 960
 cccgcgggta tactaactat aatcaaaagt tcaaagaccg cgtgacaatt acgaccgata 1020
 agagttcatc caccgcttac ttacagatga actccctcaa gacagaggac accgccgtgt 1080
 actactgtgc ccgctactac gacgaccatt actgcctgga ctactggggc cagggggacca 1140
 ccgtaaccgt cagtagtggt gggggcgagg gtcagatcgt gctgacccag agtccgggca 1200
 ccctgagtct gtctcctggt gagcgcgcaa cgctgacgtg ctcagcctcc tcgagtgctt 1260
 cttatatgaa ctggtaccag cagaagcccg gcaaggcccc taagcgctgg atctacgaca 1320
 cctcgaagct agcttcgggc gtccccctcc gggtctcggg ctcgggggtc ggcacggact 1380
 atttcttgac catcaacagt ctggaggcag aggacgccgc aacctactac tgccagcagt 1440
 ggagttcgaa tcctttcacg tttgggaggg ggaccaagggt ggaaatcaaa caccatcacc 1500
 accatcacta ataagcgggc gc 1522

<210> 12
 <211> 1522
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 12

atgggctggt cttgcatcat cctgttcctc gtggccaccg ccaccggcgt ccacagcgcc 60
 atccagctca cccagagccc ctcgagcttg agtgccctcg tgggagaccg ggtcactatc 120
 acctgccgag ccagtcaggg catctcctcc gcccttgctt ggtaccagca gaagcccggg 180
 aaggcccca agctgctgat ctacgacgct agtagtcttg agagtggcgt gccttcgcgc 240
 ttctcgggca gtgggagtgg caccgacttc accttgacca tctccagtct acagccggaa 300
 gatttcgcga cctactactg tcagcaattc aactcttata catacacttt cggccagggg 360
 acaaagctgg agatcaaggg cgggggaggg agtggcgggc gaggggtccgg aggcggggggc 420
 tccgaggtgc aactagtcca gagcggagcc gaggtgaaga agcccgggga gagtctaaag 480
 atctcttgca agggctccgg ttactccttc tcgagttcct ggatcgggtg ggtgcgacag 540

ES 2 786 263 T3

atgccgggca agggcctgga gtggatgggc attatctacc ccgacgactc cgatacccgt 600
tatagtccat cgttccaggg acaggtgacc atttccgccg acaagtctat cagaaccgcc 660
tatctgcagt ggtccagtct gaaggcctct gacactgcca tgtattattg cgccaggcac 720
gttacgatga tctggggggg gatcatcgac ttctggggcc agggcacact cgtaaccgtc 780
agttcggagg tgggtggatcc caggttcagc tgggtgcagtc cggcgccgag gtgaagaagc 840
cgggcgcttc tgtgaaggtc agctgtaaag ccagtggcta cacattcacc aggtacacta 900
tgcactgggt gcgccaggca cccgggcagg ggctggaatg gatcgggtac atcaatcctt 960
cccgcggtta tactaactat gctcaaaagt tccaagaccg cgtgacaatt acgaccgata 1020
agagttcatc caccgcttac ttacagatga actccctcaa gacagaggac accgccgtgt 1080
actactgtgc ccgctactac gacgaccatt actgcctgga ctactggggc caggggacca 1140
ccgtaaccgt cagtagtggc gggggcgcca gtcagatcgt gctgacccag agtccggcga 1200
ccctgagtct gtctcctggg gagcgcgcaa cgctgacgtg ctcagcctcc tcgagtcct 1260
cttatatgaa ctggtaccag cagaagcccc gcaaggcccc taagcgctgg atctacgaca 1320
cctcgaagct agcttcgggc gtccccctcc gggtctcggg ctcgggggtcg ggcacggact 1380
attctctgac catcaacagt ctggaggcag aggacgccgc aacctactac tgccagcagt 1440
ggagttcgaa tcctttcacg tttgggcagg ggaccaaggt ggaaatcaaa caccatcacc 1500
accatcacta ataagcggcc gc 1522

5 <210> 13
<211> 1522
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 13

atgggctggg cttgcatcat cctgttcctc gtggccaccg ccaccggcgt ccacagcgcc 60
atccagctca cccagagccc ctcgagcttg agtgccctcg tgggagaccg ggtcactatc 120
acctgccgag ccagtcaggg catctcctcc gcccttgctt ggtaccagca gaagcccggg 180
aaggccccca agctgctgat ctacgacgct agtagtcttg agagtggcgt gccttcgcgc 240
ttctcgggca gtgggagtgg caccgacttc accttgacca tctccagtct acagccggaa 300
gatttcgcga cctactactg tcagcaattc aactcttata catacacttt cggccagggg 360
acaaagctgg agatcaaggg cgggggcggg agtggcggcg gaggggtccg aggcgggggc 420
tccgaggtgc aactagtcca gagcggagcc gaggtgaaga agcccgggga gagtctaaag 480
atctcttgca agggctccgg ttactccttc tcgagttcct ggatcgggtg ggtgcgacag 540
atgccgggca agggcctgga gtggatgggc attatctacc ccgacgactc cgatacccgt 600
tatagtccat cgttccaggg acaggtgacc atttccgccg acaagtctat cagaaccgcc 660

15

ES 2 786 263 T3

tatctgcagt ggtccagtct gaaggcctct gacactgcca tgtattattg cgccaggcac	720
gttacgatga tctggggggg gatcatcgac ttctggggcc agggcacact cgtaaccgtc	780
agttcggagg tgggtggatcc caggttcagc tgggtgcagtc cggcgccgag gtgaagaagc	840
cgggcgcttc tgtgaagggtc agctgtaaag ccagtggcta cacattcacc aggtacacta	900
tgcactgggt gcgccaggca cccgggcagg ggctggaatg gatcgggtac atcaatcctt	960
cccgcggtta tactaactat aatcaaaagg tcaaagaccg cttgacaatt acgaccgata	1020
agagttcatc caccgcttac ttacagatga actccctcaa gacagaggac accgccgtgt	1080
actactgtgc ccgctactac gacgaccatt actgcctgga ctactggggc caggggacca	1140
ccgtaaccgt cagtagtggc gggggcggca gtcagatcgt gctgaccag agtccggcga	1200
ccctgagtct gtctcctggt gagcgcgcaa cgctgacgtg ctcagcctcc tcgagtgcct	1260
cttatatgaa ctggtaccag cagaagccc gcaaggcccc taagcgctgg atctacgaca	1320
cctcgaagct agcttcgggc gtccccctcc ggttctcggg ctcggggtcg ggcacggact	1380
attctctgac catcaacagt ctggaggcag aggacgccgc aacctactac tgccagcagt	1440
ggagttcgaa tcctttcacg tttgggcagg ggaccaaggt ggaaatcaaa caccatcacc	1500
accatcacta ataagcggcc gc	1522

<210> 14
 <211> 1571
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 14

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacagggtgt ccactccgac	60
tacaaagatg atgacgataa ggatatccag ctgaccagct ctccagcttc tttggctgtg	120
tctctagggc agagggccac catctcctgc aaggccagcc aaagtgttga ttatgatggt	180
gatagttatt tgaactggta ccaacagatt ccaggacagc caccctaaact cctcatctat	240
gatgcatcca atctagtttc tgggatccca cccagggtta gtggcagtggt gtctgggaca	300
gacttcaccc tcaacatcca tcctgtggag aagggtggatg ctgcaaccta tcaactgtcag	360
caaagtactg aggatccgtg gacgttcggt ggagggacca agctcgagat caaagggtggt	420
ggtggttctg gcggcggcgg ctccggtggt ggtggttctc aggtgcagct gcagcagtct	480
ggggctgagc tgggtgaggcc tgggtcctca gtgaagattt cctgcaaggc ttctggctat	540
gcattcagta gctactggat gaactgggtg aagcagaggc ctggacaggg tcttgagtgg	600
attggacaga tttggcctgg agatggtgat actaactaca atggaaagtt caagggtaaa	660
gccactctga ctgcagacga atcctccagc acagcctaca tgcaactcag cagcctagca	720
tctgaggact ctgcggtcta tttctgtgca agacgggaga ctacgacggt aggccgttat	780
tactatgcta tggactactg gggccaaggg accacggtca ccgtctcctc cggagggtggt	840

ES 2 786 263 T3

ggatcccagg tgcagctcgt ggagtccggc ggcggcggtg tccagcctgg ccgctcgctg 900
 cgctgtcat gcgccgcttc gggtttcacg ttcaggctgt acgggatgca ctgggtcagg 960
 caggcgccgg gaaaaggcct ggagtgggtg gctatcatct ggtacgacgg ctccaagaag 1020
 aattatgctg actccgtcaa gggacgggtt acaatctcgc gtgataactc gaagaacacc 1080
 ctctacctgc agatgaattc cctcagagcc gaagacacag ccgtgtatta ttgcgccagg 1140
 ggcaccggct ataactgggt cgatccatgg ggccagggga ccctgggttac cgtctcctcc 1200
 ggaggggggg gtagtgagat cgtgctgacc cagtcgcctc gcaccctgtc cctgtcccct 1260
 ggggagcgcg ccaccctctc gtgcagggca tcgcagtccg tcagttcctc ctatctggcc 1320
 tgggtaccagc agaaacctgg ccaggcacca aggtgctga tctacggagc ttcctcgagg 1380
 gcaaccggga tccccgacag attttccgga agcgggaagtg gcacagactt caccctgacc 1440
 atcagtaggc ttgacccga agatttcgcc gtgtactatt gccagcagta cggctcctcc 1500
 cccatcacct tcggccaggg cacaagactg gagatcaagc accatcacca ccaccactaa 1560
 taagcggccg c 1571

5 <210> 15
 <211> 1565
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 15
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgac 60
 taaaagatg atgacgataa ggatatccag ctgaccagct ctccagcttc tttggctgtg 120
 tctctagggc agagggccac catctcctgc aaggccagcc aaagtgttga ttatgatggt 180
 gatagttatt tgaactggta ccaacagatt ccaggacagc caccctaaact cctcatctat 240
 gatgcatcca atctagtttc tgggatccca cccaggttta gtggcagtggt gtctgggaca 300
 gacttcaccc tcaacatcca tcctgtggag aagggtggatg ctgcaacctc tcaactgtcag 360
 caaagtactg aggatccgtg gacgttcggt ggagggacca agctcgagat caaagggtggt 420
 ggtggttctg gcggcgccgg ctccggtggt ggtggttctc aggtgcagct gcagcagctc 480
 ggggctgagc tggtgaggcc tgggtcctca gtgaagattt cctgcaaggc ttctggctat 540
 gcattcagta gctactggat gaactgggtg aagcagaggc ctggacaggg tcttgagtgg 600
 attggacaga tttggcctgg agatggtgat actaactaca atggaaagtt caagggtaaa 660
 gccactctga ctgcagacga atcctccagc acagcctaca tgcaactcag cagcctagca 720
 tctgaggact ctgcggtcta tttctgtgca agacggggaga ctacgacggg aggccgttat 780
 tactatgcta tggactactg gggccaaggg accacggtca ccgtctcctc cggaggtggt 840
 ggatcccagg tacagctggt cgagtccggt gggggcggtg tccagcccgg ccggtccctg 900

ES 2 786 263 T3

cgctgtcgt gcgctgcctc cggctttacc ttccgggtcgt atggcatgca ttgggtgctg 960
caggcccccg ggaaggggct ggagtgggtc gccattatct ggtacgatgg ctccaagaag 1020
aactacgctg attcgggttaa gggccgcttc accattagtc gggataattc gaagaatacg 1080
ctgtatctcc agatgaactc cctgagggcc gaggacactg ccgtgtacta ctgcgcccgg 1140
ggcacaggct ataactgggt cgatccctgg ggtcagggca ccctagtgac cgtctcgtct 1200
gggggaggag ggtcagatat tctcatgaca cagtcgccct ctagtctttc cgcctccgtg 1260
ggggaccgag tgaccatcac atgcagagct tcccagggga tctcctctgc gctggcctgg 1320
tatacagaga agccccggaa ggcacccaag ctgctcatct attacgcttc ttcgctgcaa 1380
agtgggggtg cgtcccgctt ctccggaagc ggctccggca cggactacac cctcaccatc 1440
tcctccctgc agcctgagga tttgccacc tattactgcc agcagtatta ctccacgctg 1500
accttcggag gaggcacgaa agtggagatc aagcaccacc accaccacca ctaataagcg 1560
gccgc 1565

5 <210> 16
<211> 1563
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 16

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacagggtg ccaactccgac 60
taciaagatg atgacgataa ggatatccag ctgaccaggt ctccagcttc tttggctgtg 120
tctctagggc agagggccac catctcctgc aaggccagcc aaagtgttga ttatgatggt 180
gatagttatt tgaactggta ccaacagatt ccaggacagc caccctaaact cctcatctat 240
gatgcatcca atctagtttc tgggatccca cccagggtta gtggcagtggt gtctgggaca 300
gacttcaccc tcaacatcca tcctgtggag aagggtggatg ctgcaacctc tcaactgtcag 360
caaagtactg aggatccgtg gacgttcggt ggagggacca agctcgagat caaagggtggt 420
gggtggttctg gcggcgggcg ctccgggtggt ggtggttctc aggtgcagct gcagcagctc 480
ggggctgagc tgggtgaggc tgggtcctca gtgaagattt cctgcaaggc ttctggctat 540
gcattcagta gctactggat gaactgggtg aagcagaggc ctggacaggg tcttgagtgg 600
attggacaga tttggcctgg agatgggtgat actaactaca atggaaagt caagggtaaa 660
gccactctga ctgcagacga atcctccagc acagcctaca tgcaactcag cagcctagca 720
tctgaggact ctgcggtcta tttctgtgca agacgggaga ctacgacggt aggccgttat 780
tactatgcta tggactactg gggccaaggg accacggtca ccgtctcctc cggagggtggt 840
ggatcccagg tccagctggt tgagtctggt ggcggagtggt tccagcccgg ccggtctctc 900
cgcctgtcct gcgccgcttc cgggttcaag ttctccggct acggaatgca ctgggtgagg 960
caggcgccag gtaaggggct cgagtgggtc gcgggtgatat ggtatgacgg tagcaagaag 1020

15

ES 2 786 263 T3

tattacgtgg	acagtgtgaa	aggccgcttt	accatctcac	gcgacaattc	taagaacacc	1080
ctgtacctcc	agatgaactc	cctgcgcgct	gaggacacgg	cggtgtacta	ctgcgctagg	1140
cagatggggg	actggcactt	cgacctttgg	ggcaggggta	ccctgggtgac	cgtctcatcc	1200
ggcggcgggc	ggtctgagat	cgttctgacc	caaagtccgg	ccacactgtc	cctctcccca	1260
ggagagcgcg	ctacgcttag	ctgccgcgcc	tcccagagcg	tgtcctccta	cctggcatgg	1320
tatcagcaga	agccggggca	ggcgcctcga	ctgctgatct	acgacgcctc	gaaccgcgcg	1380
acaggtatcc	ccgcgcgctt	cagcggctcc	ggttcgggga	ctgatttcac	cctgaccatc	1440
tcctccctcg	agcctgagga	tttcgcagtg	tactactgcc	agcagagatc	caattggccc	1500
cccctcacct	tcggcggggg	aaccaagggtg	gagatcaagc	accaccacca	ccatcactaa	1560
taa						1563

<210> 17
 <211> 1568
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 17

atgggatgga	gctgtatcat	cctcttcttg	gtagcaacag	ctacaggtgt	ccactccgac	60
tacaaagatg	atgacgataa	ggatatccag	ctgacccagt	ctccagcttc	tttggctgtg	120
tctctagggc	agagggccac	catctcctgc	aaggccagcc	aaagtgttga	ttatgatggg	180
gatagttatt	tgaactggta	ccaacagatt	ccaggacagc	cacccaaact	cctcatctat	240
gatgcatcca	atctagtttc	tgggatccca	cccaggttta	gtggcagtg	gtctgggaca	300
gacttcaccc	tcaacatcca	tcctgtggag	aagggtggatg	ctgcaacctc	tactgtcag	360
caaagtactg	aggatccgtg	gacgttcggt	ggagggacca	agctcgagat	caaagggtgg	420
ggtggttctg	gcggcgggcg	ctccggtggt	ggtggttctc	aggtgcagct	gcagcagctc	480
ggggctgagc	tgggtgaggcc	tgggtcctca	gtgaagattt	cctgcaaggc	ttctggctat	540
gcattcagta	gctactggat	gaactgggtg	aagcagaggc	ctggacaggg	tcttgagtgg	600
attggacaga	tttggcctgg	agatggtgat	actaactaca	atggaaagtt	caagggtaaa	660
gccactctga	ctgcagacga	atcctccagc	acagcctaca	tgcaactcag	cagcctagca	720
tctgaggact	ctgcggtcta	tttctgtgca	agacgggaga	ctacgacggg	aggccgttat	780
tactatgcta	tggactactg	gggccaaggg	accacggtca	ccgtctcctc	cggaggtggg	840
ggatcccagg	ttcagctggt	gcagtccggc	gccgaggtga	agaagccggg	cgcttctgtg	900
aaggtcagct	gtaaagccag	tggctacaca	ttcaccaggt	acactatgca	ctgggtgcgc	960
caggcacccg	ggcaggggct	ggaatggatc	gggtacatca	atccttcccg	cggttatact	1020
aactataatc	aaaagttcaa	agaccgcgtg	acaattacga	ccgataagag	ttcatccacc	1080

ES 2 786 263 T3

gcttacttac agatgaactc cctcaagaca gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgcccgc 1140
tactacgacg accattactg cctggactac tggggccagg ggaccaccgt aaccgtcagt 1200
agtggcgggg gcggcagtc gatcgtgctg acccagagtc cggcgaccct gagtctgtct 1260
cctggtgagc gcgcaacgct gacgtgctca gcctcctcga gtgcctctta tatgaactgg 1320
taccagcaga agcccggcaa ggcccctaag cgctggatct acgacacctc gaagctagct 1380
tcgggcgtcc cctcccgggt ctcgggctcg gggtcgggca cggactattc tctgaccatc 1440
aacagtctgg aggagagga cgccgcaacc tactactgcc agcagtggag ttcgaatcct 1500
ttcacgtttg ggcaggggac caaggtggaa atcaaacc atcaccacca tctaataa 1560
gcggccgc 1568

<210> 18
<211> 1568
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 18

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgac 60
tacaaagatg atgacgataa ggatatccag ctgaccagct ctccagcttc tttggctgtg 120
tctctagggc agagggccac catctcctgc aaggccagcc aaagtgttga ttatgatggt 180
gatagttatt tgaactggta ccaacagatt ccaggacagc cacccaaact cctcatctat 240
gatgcatcca atctagtttc tgggatccca cccaggttta gtggcagtgg gtctgggaca 300
gacttcaccc tcaacatcca tcctgtggag aaggtggatg ctgcaaccta tcaactgtcag 360
caaagtactg aggatccgtg gacgttcggt ggagggacca agctcgagat caaaggtggt 420
ggtggttctg gcggcgggcg ctccggtggt ggtggttctc aggtgcagct gcagcagtct 480
ggggctgagc tgggtaggcc tgggtcctca gtgaagattt cctgcaaggc ttctggctat 540
gcattcagta gctactggat gaactgggtg aagcagaggc ctggacaggg tcttgagtgg 600
attggacaga tttggccttg agatggtgat actaactaca atggaaagt caagggtaaa 660
gccactctga ctgcagacga atcctccagc acagcctaca tgcaactcag cagcctagca 720
tctgaggact ctgcggtcta tttctgtgca agacgggaga ctacgacggt aggccgttat 780
tactatgcta tggactactg gggccaaggg accacggtca ccgtctcctc cggaggtggt 840
ggatcccagg ttcagctggt gcagtcgggc gccgaggtga agaagccggg cgcttctgtg 900
aaggtcagct gtaaagccag tggctacaca ttcaccaggt acactatgca ctgggtgcgc 960
caggcacccg ggcaggggct ggaatggatc gggtagatca atccttcccg cggttatact 1020
aactatgctc aaaagttcca agaccgctg acaattacga ccgataagag ttcattccacc 1080
gcttacttac agatgaactc cctcaagaca gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgcccgc 1140
tactacgacg accattactg cctggactac tggggccagg ggaccaccgt aaccgtcagt 1200

ES 2 786 263 T3

agtggcgggg gcggcagtca gatcgtgctg acccagagtc cggcgaccct gagtctgtct 1260
 cctggtgagc gcgcaacgct gacgtgctca gcctcctcga gtgcctctta tatgaactgg 1320
 taccagcaga agccccggcaa ggccccctaag cgctggatct acgacacctc gaagctagct 1380
 tcgggcgctcc cctccccggtt ctcggtgctcg gggtcgggca cggactattc tctgaccatc 1440
 aacagtctgg aggcagagga cgccgcaacc tactactgcc agcagtggag ttcgaatcct 1500
 ttcacgtttg ggcagggggac caaggtggaa atcaaacacc atcaccacca tcactaataa 1560
 gcggccgc 1568

<210> 19
 <211> 1568
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintetizada químicamente

<400> 19

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgac 60
 tacaagatg atgacgataa ggatatccag ctgaccagct ctccagcttc tttggctgtg 120
 tctctagggc agagggccac catctcctgc aaggccagcc aaagtgttga ttatgatggg 180
 gatagttatt tgaactggta ccaacagatt ccaggacagc caccctaaact cctcatctat 240
 gatgcatcca atctagtttc tgggatccca cccaggttta gtggcagtggt gtctgggaca 300
 gacttcaccc tcaacatcca tcctgtggag aaggtggatg ctgcaaccta tcaactgtcag 360
 caaagtactg aggatccgtg gacgttcggt ggagggacca agctcgagat caaaggtggg 420
 ggtggttctg gcggcggcgg ctccggtggg ggtggttctc aggtgcagct gcagcagtct 480
 ggggctgagc tgggtgaggc tgggtcctca gtgaagattt cctgcaaggc ttctggctat 540
 gcattcagta gctactggat gaactgggtg aagcagaggc ctggacaggg tcttgagtgg 600
 attggacaga tttggcctgg agatggtgat actaactaca atggaaagt caagggtaaa 660
 gccactctga ctgcagacga atcctccagc acagcctaca tgcaactcag cagcctagca 720
 tctgaggact ctgcggtcta tttctgtgca agacgggaga ctacgacggt aggccgttat 780
 tactatgcta tggactactg gggccaagg accacggtca ccgtctcctc cggaggtggg 840
 ggatcccagg ttcagctggt gcagtcggc gccgaggtga agaagccggg cgcttctgtg 900
 aaggtcagct gtaaagccag tggctacaca ttcaccaggt aactatgca ctgggtgcgc 960
 caggcaccg ggcaggggct ggaatggatc gggtagatca atccttccc cggttatact 1020
 aactataatc aaaaggtcaa agaccgcttg acaattacga ccgataagag ttcattccacc 1080
 gcttacttac agatgaactc cctcaagaca gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgcccgc 1140
 tactacgacg accattactg cctggactac tggggccagg ggaccaccgt aaccgtcagt 1200
 agtggcgggg gcggcagtca gatcgtgctg acccagagtc cggcgaccct gagtctgtct 1260

ES 2 786 263 T3

cctggtgagc gcgcaacgct gacgtgctca gcctcctcga gtgcctctta tatgaactgg 1320
taccagcaga agcccggcaa ggcccctaag cgctggatct acgacacctc gaagctagct 1380
tcgggcgctc cctcccgggt ctcgggctcg gggtcgggca cggactattc tctgaccatc 1440
aacagtctgg aggagagga cgccgcaacc tactactgcc agcagtggag ttcgaatcct 1500
ttcacgtttg ggcaggggac caaggtggaa atcaaacacc atcaccacca tctaataa 1560
gcggccgc 1568

<210> 20
<211> 1470
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente
<400> 20

atgggctggt cttgcatcat cctgttcctc gtggccaccg ccaccggcgt ccacagcgcc 60
atccagctca cccagagccc ctcgagcttg agtgcctcgg tgggagaccg ggtcactatc 120
acctgccgag ccagtcaggg catctcctcc gcccttgctt ggtaccagca gaagcccggg 180
aaggcccca agctgctgat ctacgacgct agtagtcttg agagtggcgt gccttcgcgc 240
ttctcgggca gtgggagtgg caccgacttc accttgacca tctccagtct acagccggaa 300
gatttcgcga cctactactg tcagcaattc aactcttatt catacacttt cggccagggg 360
acaaagctgg agatcaaggg cggggggcggg agtggcggcg gaggggtccg agggcggggc 420
tccgaggtgc aactagtcca gagcggagcc gaggtgaaga agcccgggga gagtctaaag 480
atctcttgca agggctccg ttactccttc tcgagttcct ggatcgggtg ggtgacgacg 540
atgccgggca agggcctgga gtggatgggc attatctacc ccgacgactc cgatacccggt 600
tatagtccat cgttccaggg acaggtgacc atttccgccg acaagtctat cagaaccgcc 660
tatctgcagt ggtccagtct gaaggcctct gacactgccg tgtattattg cgccaggcac 720
gttacgatga tctggggggg gatcatcgac ttctggggcc agggcacact cgtaaccgtc 780
agttctgcgg ccgcaaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc 840
gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg 900
cacacgaggg ggctggactt cgctgtgat atctacatct gggcgccctt ggccgggact 960
tgtgggggtc ttctcctgtc actggttatt accctttact gcaaacgggg cagaaagaaa 1020
ctcctgtata tattcaaaca accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat 1080
ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc 1140
agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaacaag caggggccaga accagctcta taacgagctc 1200
aatctaggac gaagagagga gtacgacgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag 1260
atggggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa 1320
gataagatgg cggaggccta cagtgaattt gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag 1380

ES 2 786 263 T3

gggcacgatg gcctttacca ggggtctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt 1440
cacatgcagg cctgcccc tcgctaataa 1470

<210> 21
<211> 1482
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintetizada químicamente

<400> 21

atgggggtggt cgtgcatcat cctgtttctg gtggccacag caaccggcgt gcacagtgag 60
attgtgctga cccaaagccc ggacttccag tccgtgacct ccaaggagaa ggttaccatc 120
acgtgccgcg cctctgaaag cgtggacacg ttcgggatct ccttcatgaa ttggtttcag 180
cagaagccag atcagtcacc caaactcctg atccacgccg ccagtaatca gggctcaggc 240
gtccccgtcca ggttctcttg cagtggctcc ggtactgact tcaccttaac catcaactct 300
ctggaggcag aggacgccgc cacatacttc tgccaacaga gcaaggaggt gcccttcacc 360
ttcggagggtg ggaccaaggt cgaaatcaag ggaggggggg ggtccggcgg cggcggatcc 420
ggaggcggcg gcagcgaggt gcagctcgtc gagagtgggg gcggactggt gcaaccaggg 480
ggctctctgc ggctgagctg cgctgcctcc ggattcacat tctcctcgtc ctggatgaac 540
tgggttcgcc agggcccccg caaaggcctg gagtgggtcg gcagaatcta cccaggcgac 600
ggggacacga actacaacgg caagttcaag ggccggttca caatctcgcg cgacgactca 660
aaaaacagcc tgtatctcca gatgaactcc ctgaaaaccg aggacaccgc cgtgtattac 720
tgtgcacgca gcggctttat caccaccgtt ctggacttcg attattgggg ccagggtacc 780
ctggtgacgg taagttcggc ggccgcaacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg 840
gcgcccacca tcgctcgcga gcccctgtcc ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg 900
gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac ttgcctgtg atatctacat ctgggcgccc 960
ttggccggga cttgtggggg ctttctcctg tcaactggtta tcacccttta ctgcaaaccg 1020
ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact 1080
caagaggaag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg 1140
agagtgaagt tcagcaggag cgacagcgc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 1200
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgacg ttttgacaa gagacgtggc 1260
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 1320
gaactgcaga aagataagat ggcgagggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 1380
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 1440
tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaataa 1482

<210> 22
<211> 1515
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Sintetizada químicamente

<400> 22

5

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactccgac	60
tacaaagatg atgacgataa ggatatccag ctgacccagt ctccagcttc tttggctgtg	120
tctctagggc agagggccac catctcctgc aaggccagcc aaagtgttga ttatgatggt	180
gatagttatt tgaactggta ccaacagatt ccaggacagc caccctaaact cctcatctat	240
gatgcatcca atctagtttc tgggatccca cccagggtta gtggcagtggt gtctgggaca	300
gacttcaccc tcaacatcca tcctgtggag aagggtggatg ctgcaaccta tcaactgtcag	360
caaagtactg aggatccgtg gacgttcggt ggagggacca agctcgagat caaagggtggt	420
ggtggttctg gcggcgccg ctcgggtggt ggtggttctc aggtgcagct gcagcagctc	480
ggggctgagc tgggtaggcc tgggtcctca gtgaagattt cctgcaaggc ttctggctat	540
gcattcagta gctactggat gaactgggtg aagcagaggc ctggacaggg tcttgagtgg	600
attggacaga tttggcctgg agatggtgat actaactaca atggaaagtt caagggtaaa	660
gccactctga ctgcagacga atcctccagc acagcctaca tgcaactcag cagcctagca	720
tctgaggact ctgcggtcta tttctgtgca agacgggaga ctacgacggt aggccgttat	780
tactatgcta tggactactg gggccaaggg accacggtca ccgtctcctc cgcggccgca	840
accacgacgc cagcgccgcy accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagccccctg	900
tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg	960
gacttcgcct gtgatatcta catctgggcy cccttggccg ggacttgtgg ggtccttctc	1020
ctgtcactgg ttatcacctt ttactgcaaa cggggcagaa agaaactcct gtatatattc	1080
aaacaaccat ttatgagacc agtacaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga	1140
ttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgagac	1200
gccccgcgt acaagcaggc ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	1260
gaggagtacg acgtttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	1320
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	1380
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt	1440
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg	1500
ccccctcgct aataa	1515

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende

- 5 - una primera molécula de ARN que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), donde el CAR comprende un dominio de unión a CD19 humano, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde la secuencia que codifica el dominio de unión a CD19 es de origen humano; y
 10 - una segunda molécula de ARN que codifica un anticuerpo biespecífico, donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD19 humano, y un segundo dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD3.

2. Una composición que comprende

- 15 - un primer vector lentivírico que codifica un receptor de antígeno quimérico, donde el CAR comprende un dominio de unión a CD19 humano, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde la secuencia que codifica el dominio de unión a CD19 es de origen humano; y
 20 - un segundo vector lentivírico que codifica un anticuerpo biespecífico, donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD19 humano, y un segundo dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD3.

3. Un método *ex vivo* o *in vitro* para generar un linfocito T modificado, que comprende introducir en un linfocito T la composición de la reivindicación 1, o la composición de la reivindicación 2.

- 25 4. Un método *ex vivo* o *in vitro* para mejorar la actividad antitumoral de un linfocito T, que comprende introducir en un linfocito T la composición de la reivindicación 1, o la composición de la reivindicación 2, donde el anticuerpo biespecífico codificado por el segundo ARN o el segundo vector lentivírico es secretado por la célula.

5. Un linfocito T modificado genéticamente para expresar un CAR y un anticuerpo biespecífico, donde:

- 30 - el CAR comprende un dominio de unión a CD19 humano, un dominio transmembrana y un dominio de señalización CD3 zeta, donde la secuencia que codifica el dominio de unión a CD19 es de origen humano; y
 35 - el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD19 humano, y un segundo dominio de reconocimiento de antígeno que reconoce CD3, y donde el anticuerpo biespecífico se secreta por la célula.

6. El linfocito T de la reivindicación 5, donde el anticuerpo biespecífico comprende:

- 40 (a) un anticuerpo humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo; o
 (b) un anticuerpo humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

7. La composición de la reivindicación 1 o 2, el método de la reivindicación 3 o 4, o la célula de la reivindicación 5 o 6, donde el CAR comprende además una región de señalización coestimuladora.

- 45 8. La composición de la reivindicación 1 o 2 o 7, el método de la reivindicación 3 o 4 o 7, o la célula de la reivindicación 5 o 6 o 7, donde el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 8-19.

9. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 o 7 u 8, para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un ser humano.

50

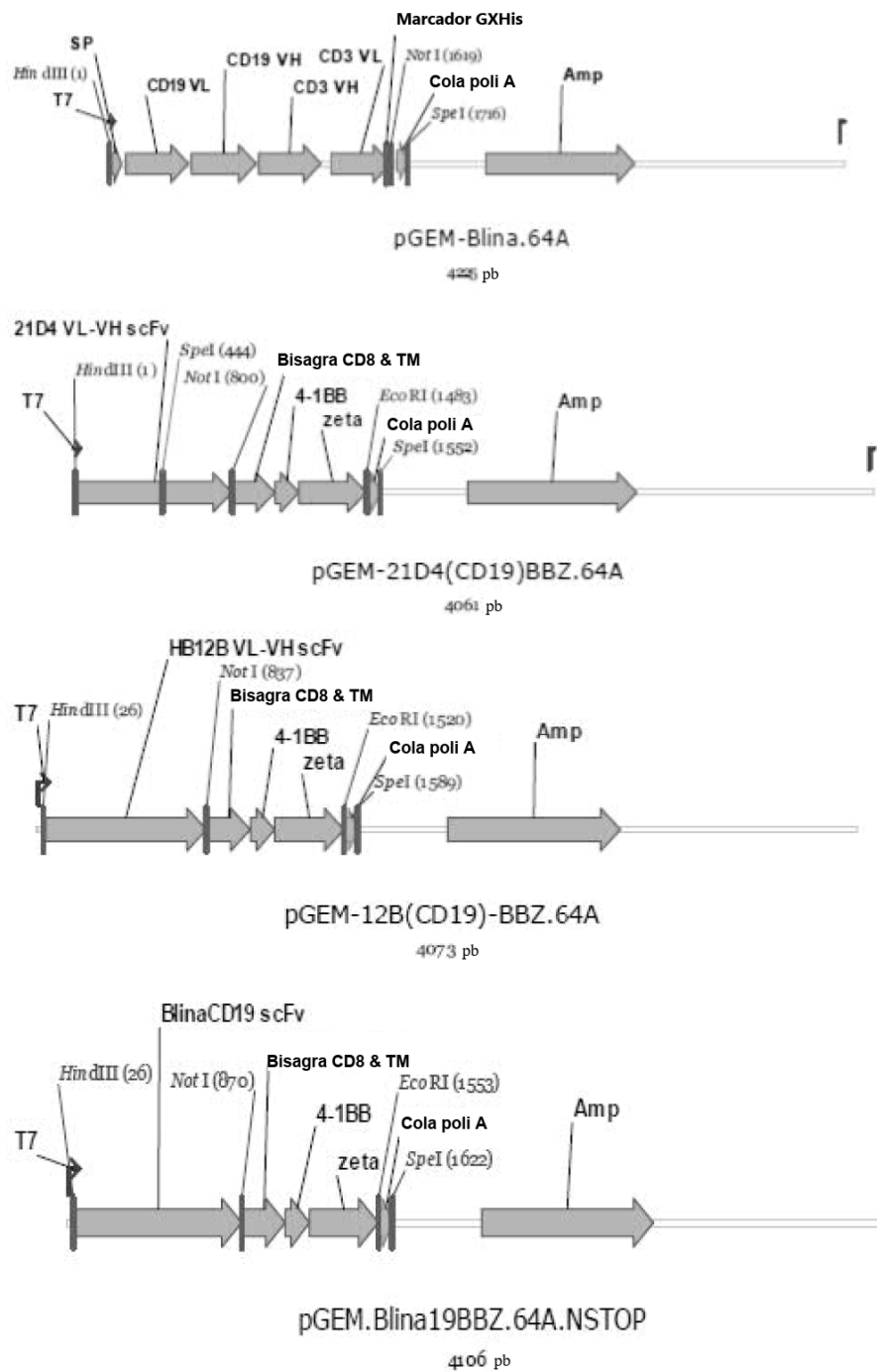


Figura 1

Prueba de expresión y función de Blina

N.º de EP	ARN
1. CD19-CAR	10 µg
2. CD19-CAR	5 µg
3. CD19-CAR	5 µg + Blina 10 µg
4. Blina	10 µg
5. GFP	5 µg

Después de EP, mezclar inmediatamente, cultivar durante la noche

6. CD19 5 µg/GFP (mezcla de 1 ml EP 2 + 1 ml EP 5)

7. CD19 5 µg+ Blina 10 µg (mezcla de 1 ml EP 3 + 1 ml EP 5)

8. Blina 10 µg/GFP (mezcla de 1 ml EP 4 + 1 ml EP 5)

Mezclar antes de la tinción CAR y el ensayo CD107a

9. CD19 5 µg/GFP 2 h (mezcla de 1 ml EP 2 + 1 ml EP 5)

10. CD19 5 µg+ Blina 10 µg/GFP 2 h (mezcla de 1 ml EP 3 + 1 ml EP 5)

11. Blina 10 µg/GFP 2 h (mezcla de 1 ml EP 4 + 1 ml EP 5)

12. NO EP

1. Linfocito T: ND200 OKT Stim
2. 100 µl de linfocito T Eped en 3 ml de medio R10 precalentado/pocillo
3. Condición de EP: 500 V, 700 us

Figura 2

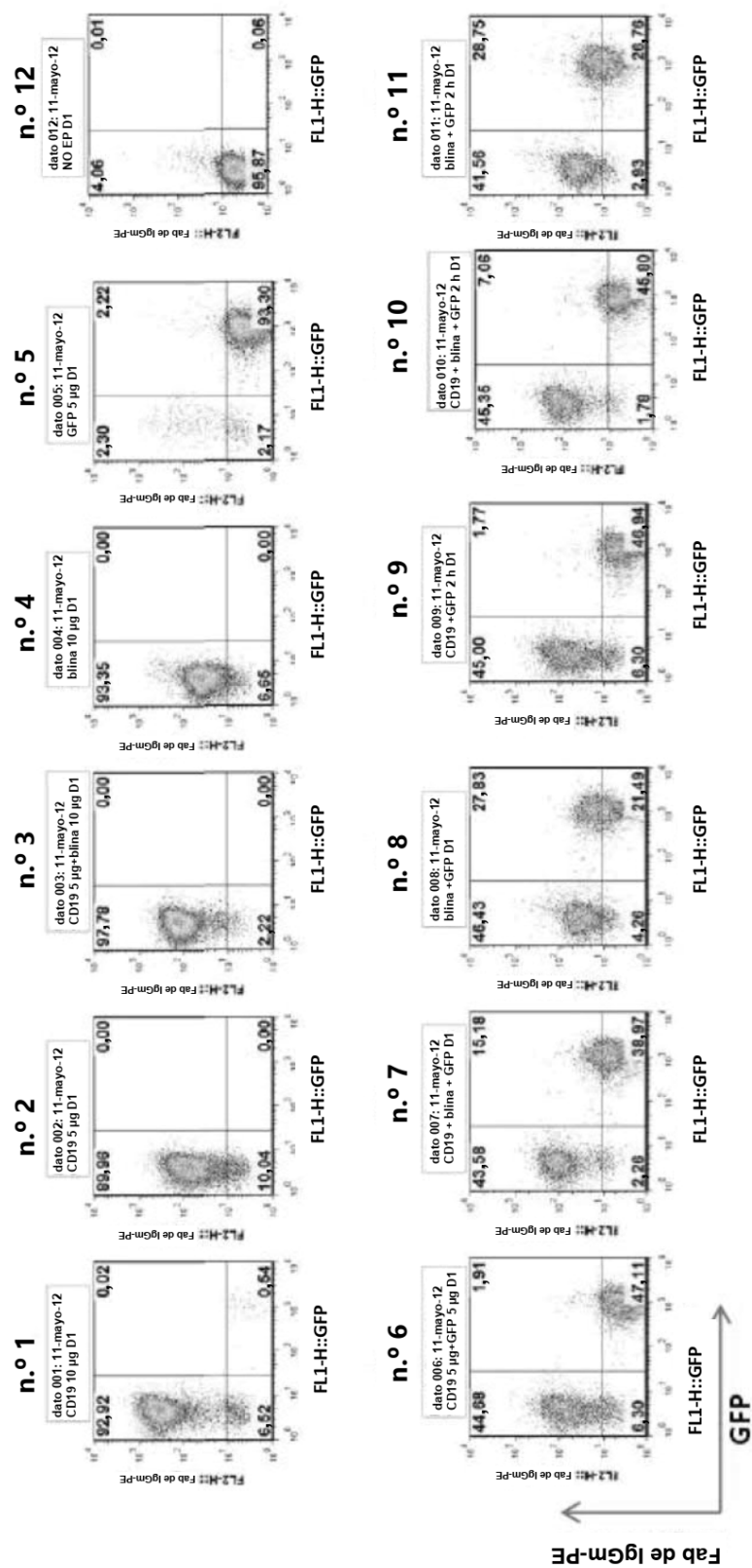


Figura 3

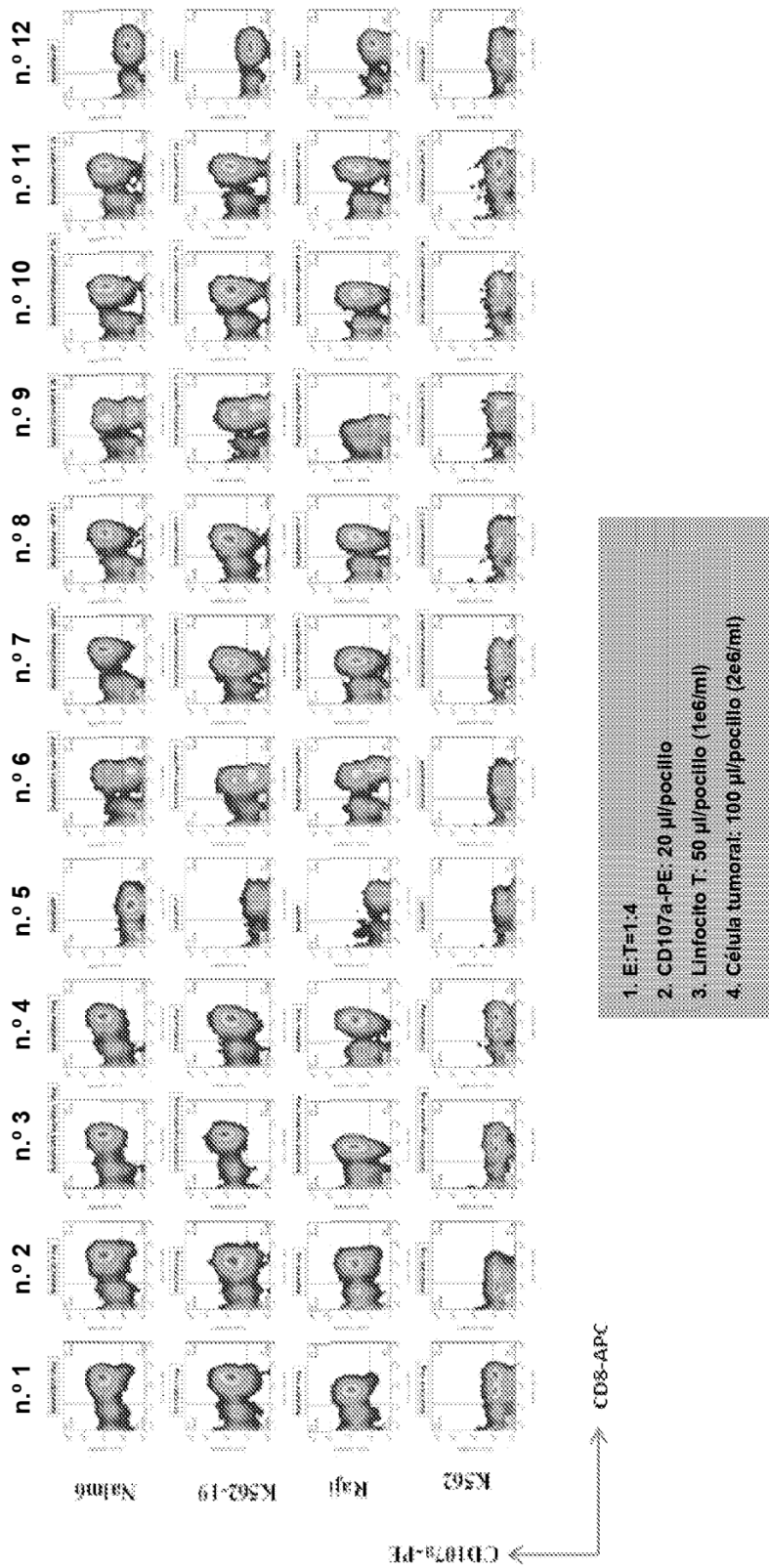
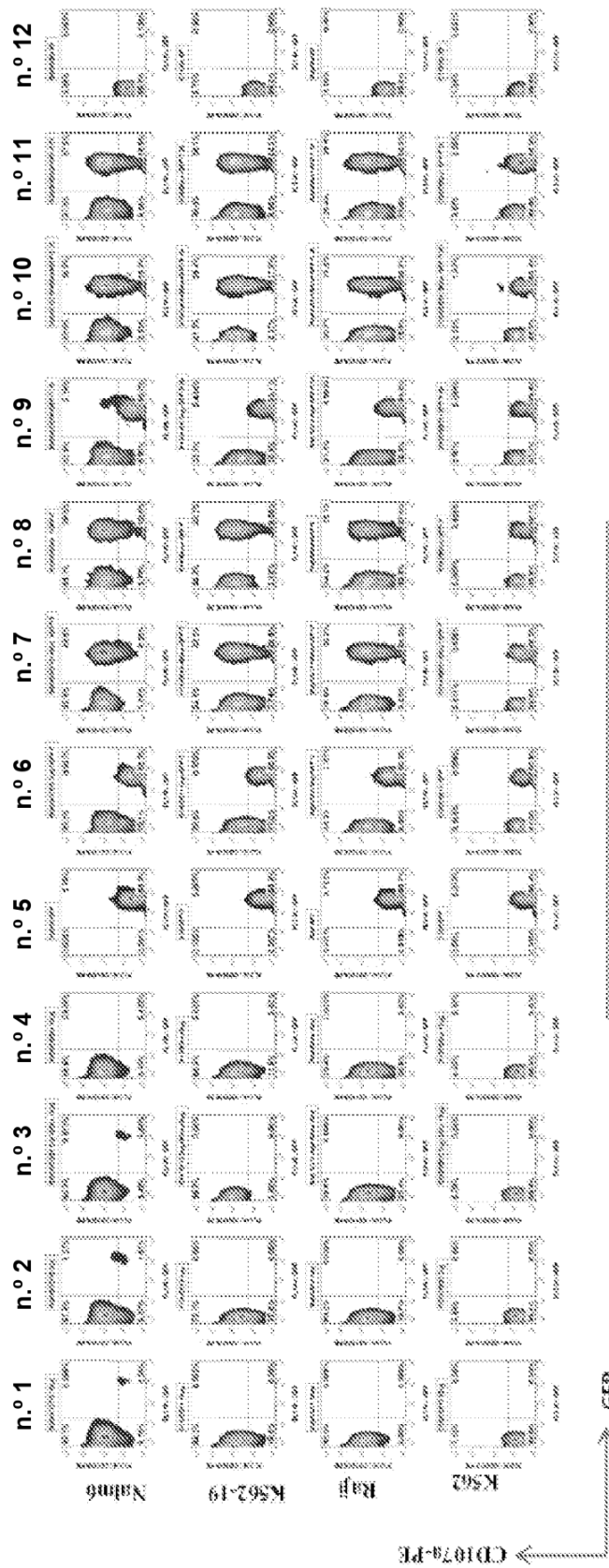
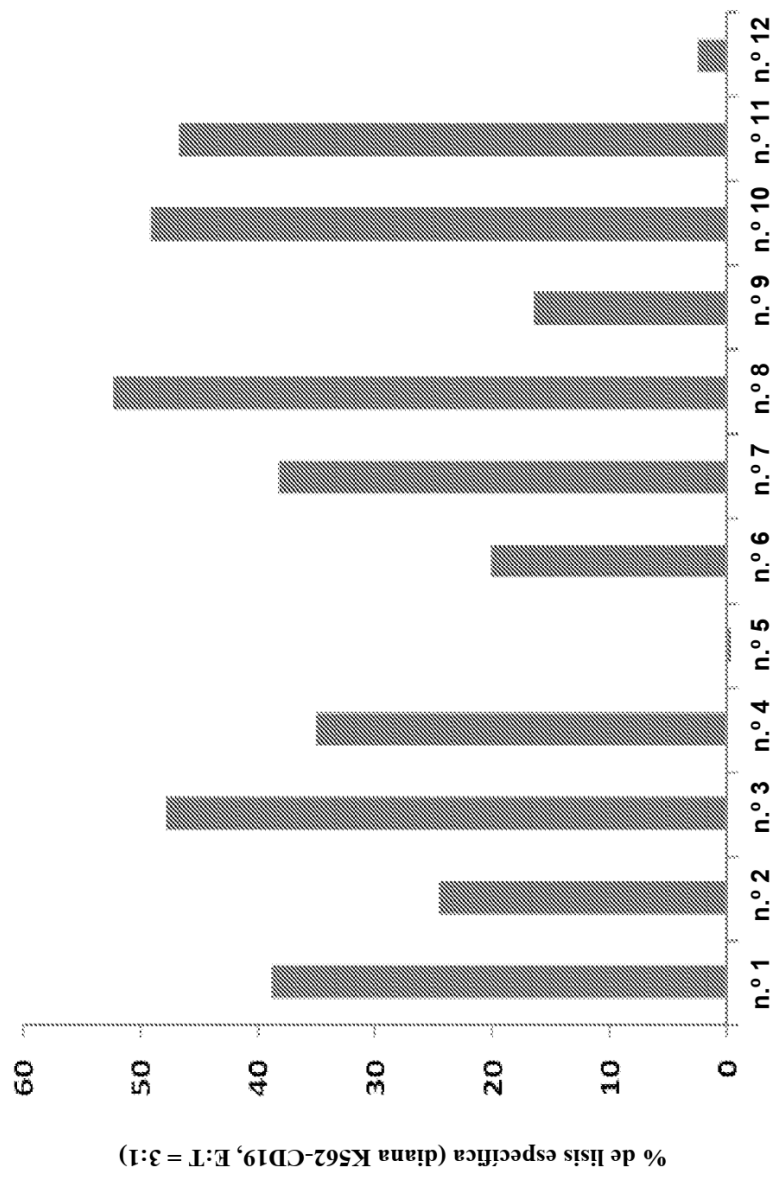


Figura 4



1. E.T=1.4
 2. CD107a-PE: 20 µl/pocillo
 3. Linfocito T: 50 µl/pocillo (1e6/ml)
 4. Célula tumoral: 100 µl/pocillo (2e6/ml)

Figura 5



Linfocitos T electroporados

Figura 6

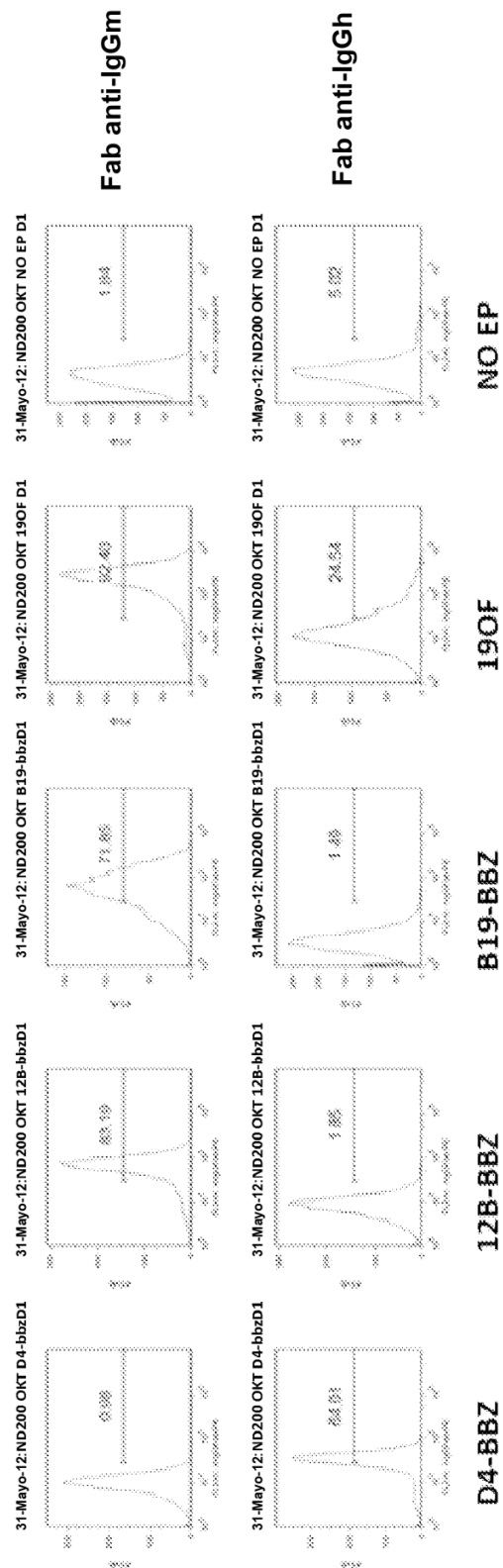


Figura 7

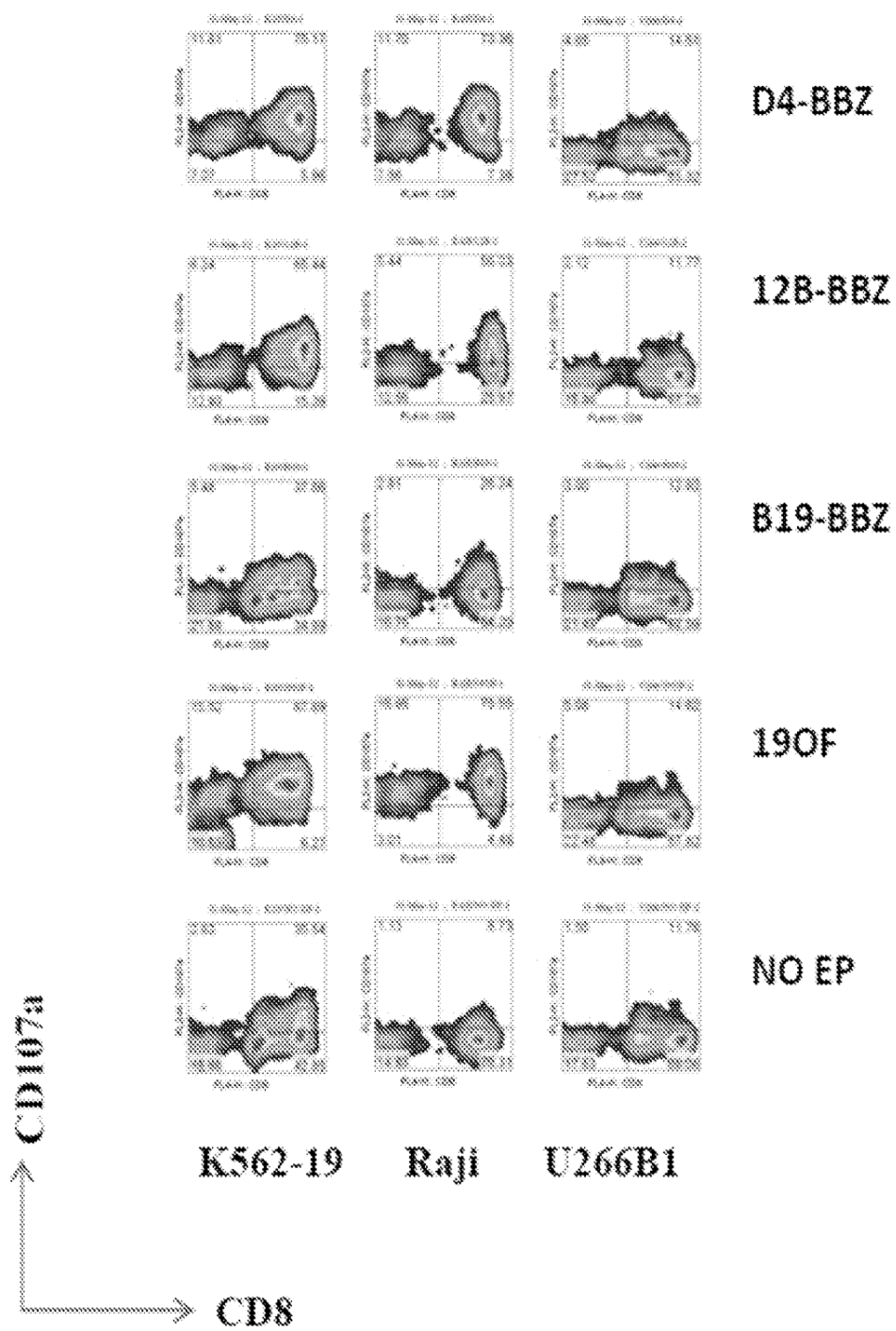


Figura 8

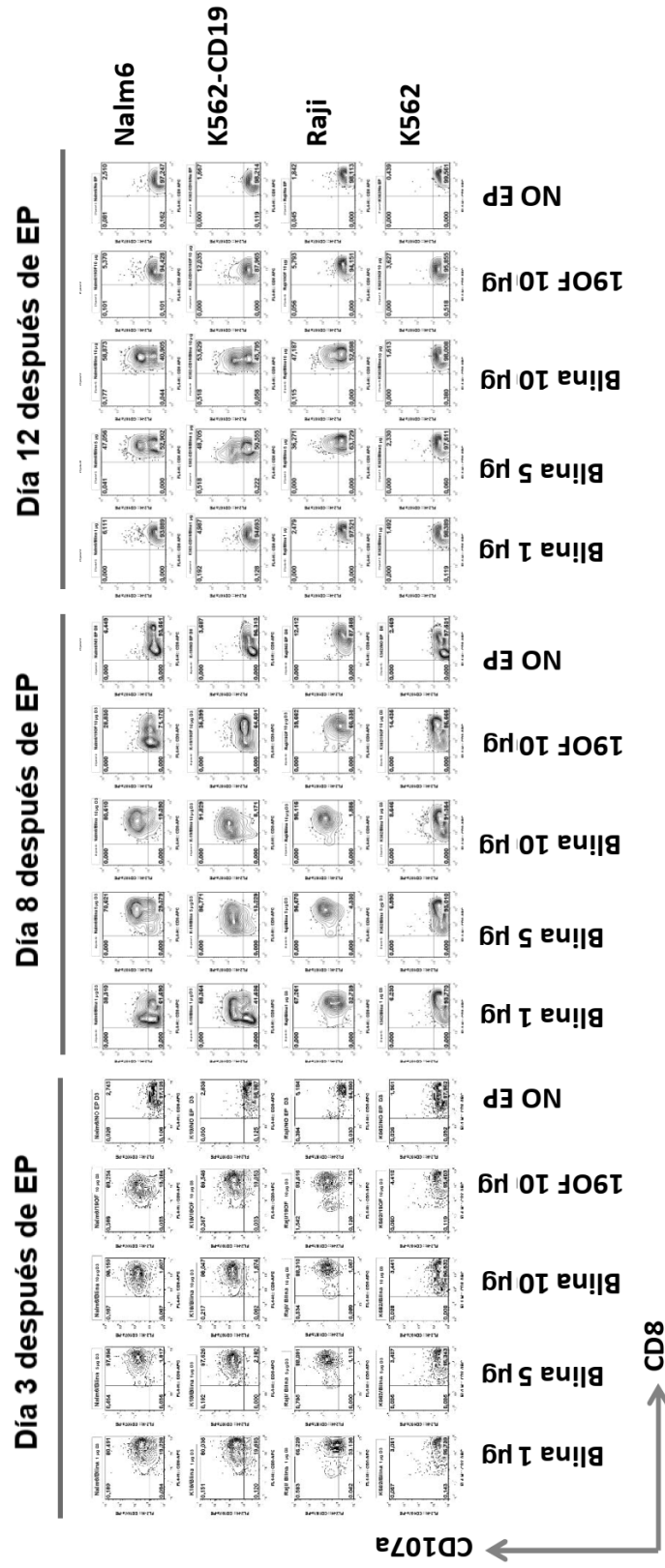


Figura 9A

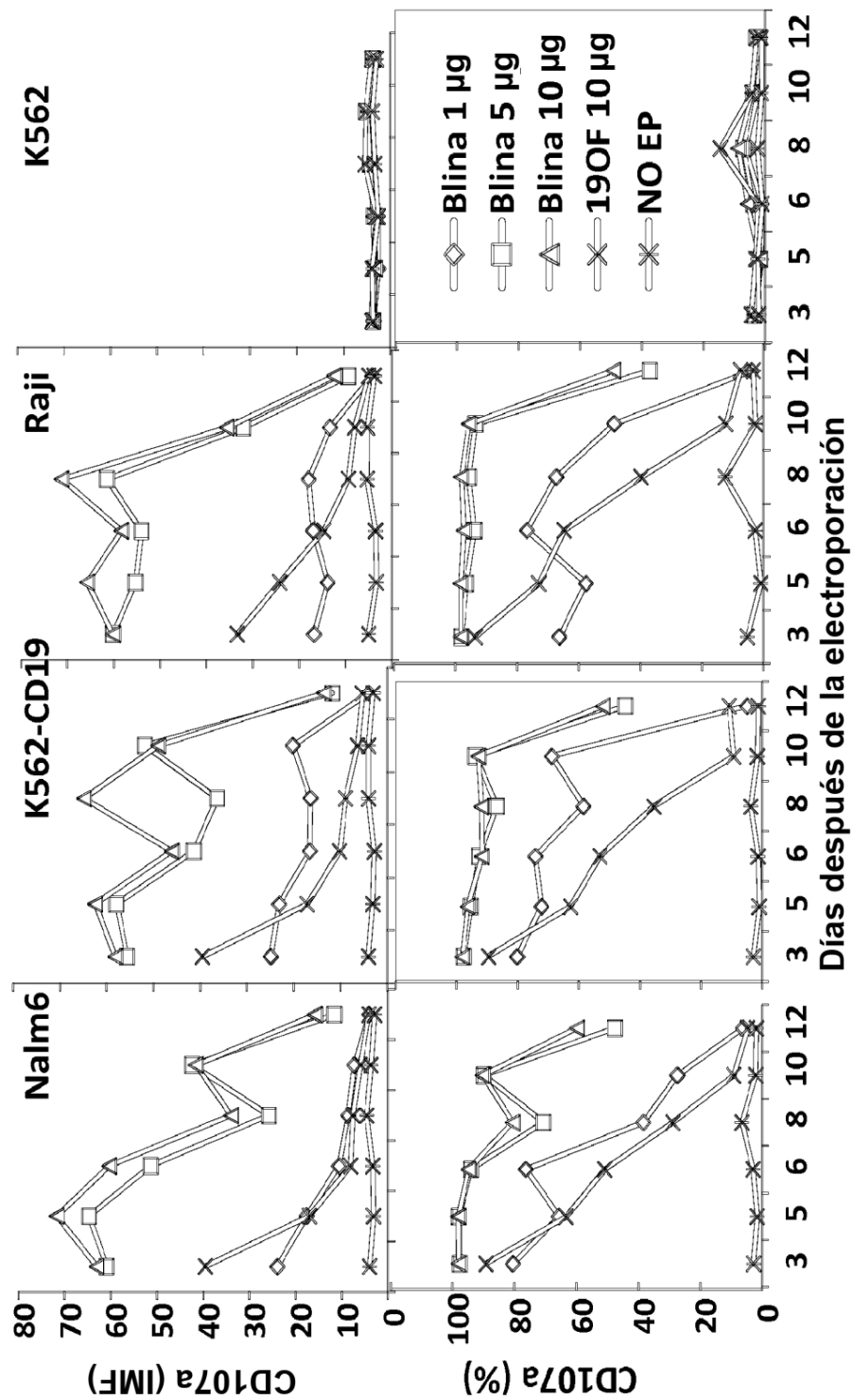


Figura 9B

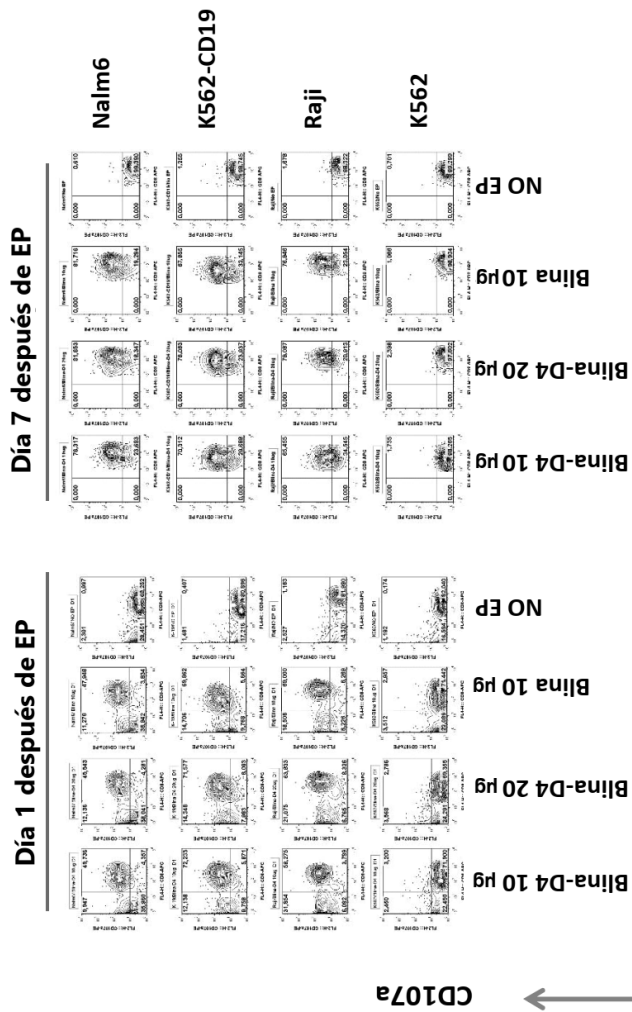
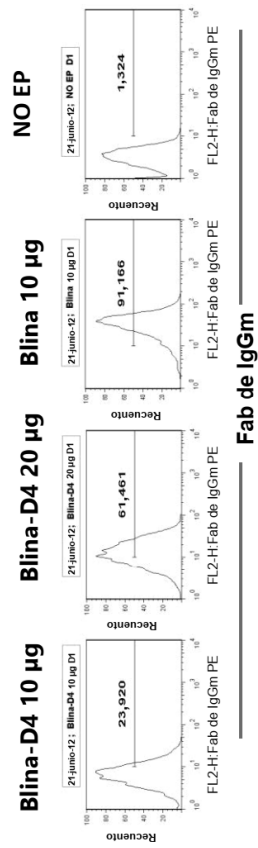


Figura 10

Tinción de CAR de ss1-CD3, cMet-CD3, PSCA-CD3 y GD2-CD3 Día 1 (06282012)

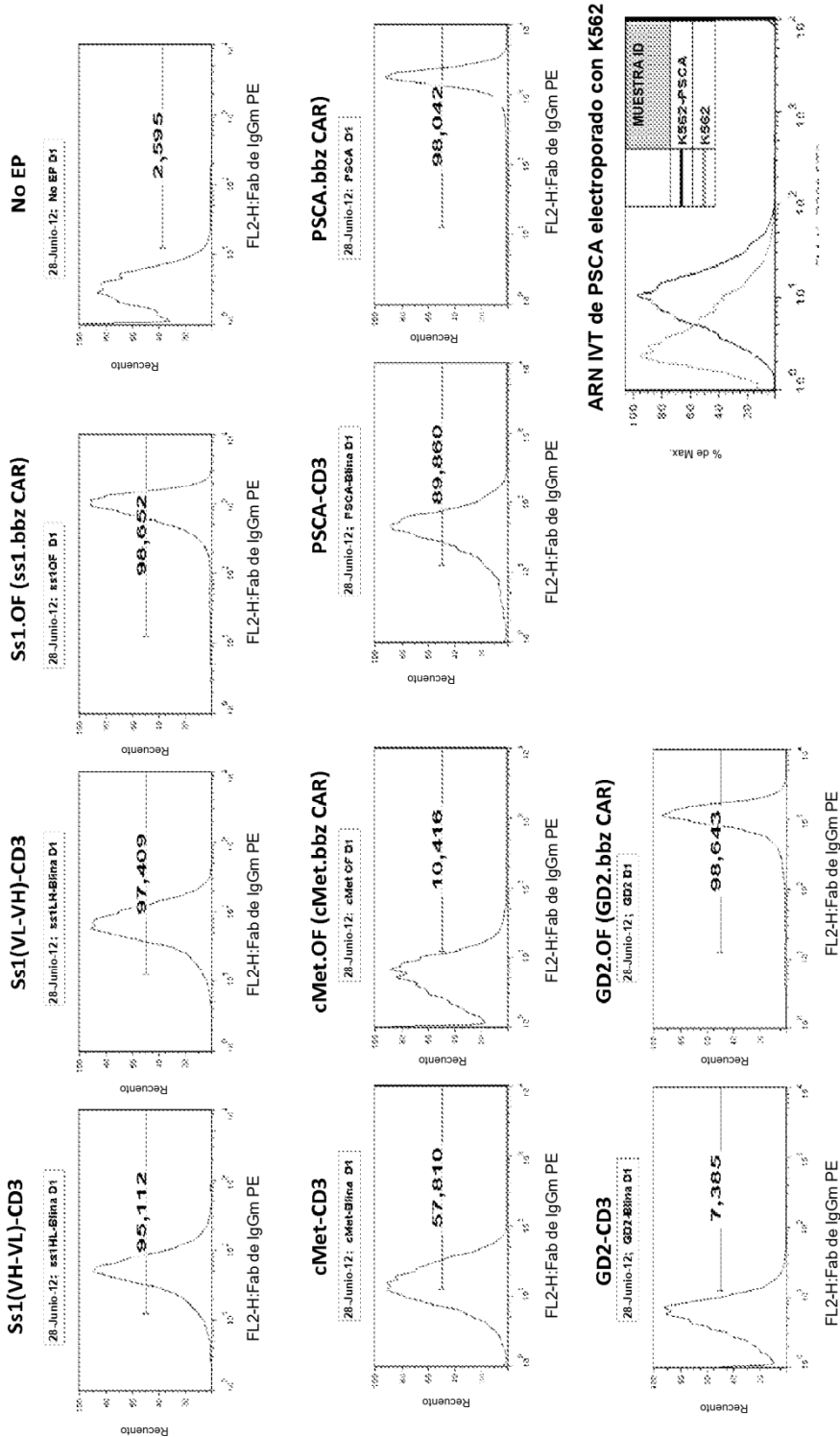


Figura 11A

Reconocimiento tumoral eficaz de linfocitos T electroporados con ARN biespecífico de ss1-CD3, CMet-Cd3 y PSCA-CD3



Figura 11B