

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 197**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015** **E 19172397 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2024** **EP 3560953**

54 Título: **Célula**

30 Prioridad:

**24.12.2014 GB 201423172**

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

**26.07.2024**

73 Titular/es:

**AUTOLUS LIMITED (100.0%)  
The MediaWorks 191 Wood Lane  
London W12 7FP, GB**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la  
Oficina Europea de Patentes

ES 2 976 197 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Célula

5 Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10

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

15

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

20

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

25

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

30

Por lo tanto, un problema con los agentes inmunoterapéuticos dirigidos contra CD19 es que una neoplasia maligna de linfocitos B puede mutar y volverse negativa a CD19. Esto puede provocar una recaída con cánceres negativos a CD19 que no responden a los agentes terapéuticos dirigidos a CD19. Por ejemplo, en un estudio pediátrico, Grupp *et al.* se documentó que la mitad de todas las recaídas después de la terapia con receptor de antígeno quimérico dirigido a CD19 para la leucemia linfoblástica aguda B (ALL-B) se debieron a una enfermedad negativa a CD19 (56ª Reunión y exposición anual de la American Society of Hematology).

35

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

40

*Receptores de antígeno quiméricos (CAR)*

45

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

50

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

55

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

60

Por lo tanto, existe la necesidad de estrategias de tratamiento alternativas con CAR que aborden los problemas de escape del cáncer y la heterogeneidad tumoral.

65

*Expresión de dos especificidades de unión de CAR*

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

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

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

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

WO 2014/055657 divulga células T de CAR de trans-señalización que comprenden una primera CAR que tiene un primer módulo de señalización y una segunda CAR que tiene un segundo módulo de señalización distinto.

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona una célula que coexpresa un primer CAR y un segundo CAR en la superficie celular, cada CAR que comprende un dominio de señalización intracelular, en el que el dominio de señalización intracelular del primer CAR comprende un dominio coestimulador CD28 y un dominio que contiene ITAM pero no comprende un endodominio de familia de receptores de TNF; y el dominio de señalización intracelular del segundo CAR comprende un endodominio de la familia de receptores de TNF seleccionado del endodominio OX40 o 4-1BB y un dominio que contiene ITAM pero no comprende un dominio coestimulador.

El dominio de unión a antígeno del primer CAR se puede unir a CD19 y el dominio de unión a antígeno del segundo CAR se puede unir a CD22.

Traducción realizada con la versión gratuita del traductor DeepL.com

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

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

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

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

Cada CAR puede comprender:

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

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

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

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

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

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

AgB1 es el dominio de unión a antígeno;  
el espaciador 1 es el espaciador;  
TM1 es el dominio transmembrana;  
coestim es un dominio coestimulador de CD28; y  
ITAM es un endodominio que contiene ITAM;

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

AgB2 es el dominio de unión a antígeno;  
el espaciador 2 es el espaciador;  
TM2 es el dominio transmembrana;  
TNF es un endodominio del receptor de TNF seleccionado de endodominio OX40 o 4-1BB; y  
ITAM es un endodominio que contiene ITAM.

La presente invención proporciona, una secuencia de ácido nucleico que codifica tanto el primer como el segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) tal como se define anteriormente.

La secuencia de ácido nucleico puede tener la siguiente estructura:  
AgB1-espaciador1-TM 1 -coestim-ITAM1-coexpr-AgB2-espaciador2-TM2-TNF-ITAM2  
en la que

AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR; el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;  
TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR; coestim es una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador de CD28;  
ITAM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del primer CAR;  
coexpr es una secuencia de ácido nucleico que permite la co-expresión de ambos CAR;  
AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR; el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR;  
TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR;  
TNF es una secuencia de ácido nucleico que codifica un endodominio de receptor de TNF seleccionado entre el endodominio OX40 o 4-1BB; ITAM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del segundo CAR;

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

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

Se pueden usar codones alternativos en regiones de secuencia que codifican secuencias de aminoácidos iguales o similares, tales como el dominio de señalización de linfocitos T transmembrana y/o intracelular (endodominio) para evitar la recombinación homóloga. Por ejemplo, se pueden usar codones alternativos en las porciones de secuencia que codifican el espaciador, el dominio transmembrana y/o todo o parte del endodominio, de modo que los dos CAR tienen las mismas o similares secuencias de aminoácidos para esta o estas partes pero están codificadas por

diferentes secuencias de ácido nucleico.

La presente invención proporciona un kit que comprende

5 (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el primer receptor de antígeno quimérico (CAR), cuya secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:  
AgB1-espaciador1-TM1-coestim-ITAM1  
en la que

10 AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR;  
el espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;  
TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR;  
coestim es una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador CD28; ITAM1 es una  
15 secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del primer CAR; y

(ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo receptor de antígeno quimérico, cuya  
secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:  
AgB2-espaciador2-TM2 -TNF-ITAM2

20 AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR;  
el espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR;  
TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR;  
TNF es una secuencia de ácido nucleico que codifica un endodominio receptor de TNF seleccionado entre  
OX40 o endodominio 4-1 BB; e ITAM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que  
25 contiene ITAM del segundo CAR.

La presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. El vector puede ser un vector lentiviral.

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

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

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

40 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células según la invención.

45 También se describe un método para tratar y/o prevenir una enfermedad, que comprende el paso de administrar una composición farmacéutica según la invención a un sujeto.

El método puede comprender las siguientes etapas:

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

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

55 La presente invención proporciona una composición farmacéutica según la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

60 También se describe el uso de una célula según la invención en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad.

Se describe en la presente una secuencia de ácido nucleico que comprende:

65 a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un primer receptor de antígeno quimérico (CAR);  
b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo CAR; en donde un CAR se une a CD19 y el

otro CAR se une a CD22; y

c) una secuencia que codifica un péptido de auto-escisión colocado entre la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, de tal manera que los dos CAR se expresen como entidades separadas.

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

También se describen en la presente un vector y una célula que comprende dicho ácido nucleico.

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

Se describe en el presente documento un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a CD19 que comprende

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 65

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

- 5 En el presente documento se describe un vector que comprende secuencia de ácido nucleico como se describe anteriormente. El vector puede ser un vector lentiviral.

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

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

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

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

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

- 25 El método puede comprender las siguientes etapas:

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

- 30

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

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

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

- 40 También se proporciona una célula según la invención, que comprende un primer CAR que comprende un dominio de unión a CD19 como se describe anteriormente y un segundo CAR que comprende un dominio de unión a CD22 como se describe anteriormente.

- 45 También se proporciona una secuencia de ácido nucleico según la invención, que codifica un primer CAR que comprende un dominio de unión a CD19 como se describe anteriormente y un segundo CAR que comprende un dominio de unión a CD22 como se describe anteriormente.

- 50 También se proporciona un kit según la invención, en donde la primera secuencia de ácido nucleico codifica un primer CAR que comprende un dominio de unión a CD19 como se describe anteriormente y la segunda secuencia de ácido nucleico codifica un segundo CAR que comprende un dominio de unión a CD22 como se describe anteriormente.

- 55 También se proporciona un vector según la invención, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer CAR que comprende un dominio de unión a CD19 como se describe anteriormente y un segundo CAR que comprende un dominio de unión a CD22 como se describe anteriormente.

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

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

- Debido a que los CAR se expresan en la superficie de la célula como moléculas separadas, esta estrategia supera los problemas espaciales y de accesibilidad asociados con los TanCAR. La eficiencia de activación celular también se mejora. Si cada CAR tiene su propio espaciador, es posible adaptar el espaciador y, por lo tanto, la distancia que el dominio de unión proyecta desde la superficie celular y su flexibilidad, etc. al antígeno diana particular. Esta elección no está limitada por las consideraciones de diseño asociadas con los TanCAR, es decir, que un CAR necesita estar
- 65

yuxtapuesto a la membrana de los linfocitos T y un CAR debe estar distal, colocado en tándem con el primer CAR.

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

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

#### Descripción de las figuras

Figura 1: a) Diagrama esquemático que ilustra un CAR clásico. (b) a (d): Diferentes generaciones y permutaciones de endodominios de CAR: (b) los diseños iniciales transmitían señales ITAM en solitario a través del endodominio FcεR1-γ o CD3ζ, mientras que los diseños posteriores transmitieron (c) una o (d) dos señales coestimuladoras adicionales en el mismo endodominio compuesto.

Figura 2: Vía de maduración de linfocitos B / ontogenia de linfocitos B. DR = HLA-DR; cCD79 = CD79 citoplasmático; cCD22 = CD22 citoplasmático. Ambos antígenos CD19 y CD22 se expresan durante las primeras etapas de la maduración de linfocitos B. Son estas células las que se convierten en leucemias agudas de linfocitos B. El direccionamiento tanto de CD19 como de CD22 simultáneamente es más adecuado para direccionar las leucemias agudas de linfocitos B.

Figura 3: Estrategias para el diseño de un casete anti-CAR de CD19 o de CD22. Se seleccionan ligantes que reconocen CD19 y ligantes que reconocen CD22. Se selecciona un dominio espaciador óptimo y un dominio de señalización para cada CAR. (a) se construye un casete de clasificación de OR de modo que ambos CAR se coexpresen usando un péptido FMD-2A. Cualquier secuencia homóloga se balancea por codones para evitar la recombinación. (c) Los dos CAR se coexpresan como proteínas separadas en la superficie de los linfocitos T.

Figura 4: Ejemplo de balanceo de codones para permitir la coexpresión en un vector retroviral de secuencias peptídicas idénticas pero evitando la recombinación homóloga. En este caso, HCH2CH3-CD28tmZeta de tipo silvestre está alineado con HCH2CH3-CD28tmZeta con balanceo de codones.

Figura 5: Demostración de la funcionalidad del sistema de clasificación de anti-CAR de CD19 o de CD22. (a) Dibujo de la construcción: S1 - péptido señal 1; HA - marcador de hemaglutina; HCH2CH3 - bisagra, CH2CH3 de la secuencia de IgG1 de tipo silvestre; CD28tmZ - Dominio transmembrana CD28 y secuencia por balanceo de CD3 Zeta; 2A - Péptido 2A de la fiebre aftosa; S2 - péptido señal 2; V5 - marcador de epitopo v5; aCD22 - scFv anti-CD22; HCH2CH3' - bisagra, CH2CH3 de la secuencia por balanceo de IgG1; CD28tmZ: dominio transmembrana CD28 y secuencia por balanceo de CD3 Zeta; (b) Coexpresión de dos receptores de un solo vector. Los linfocitos T de sangre periférica se transdujeron con vector bicistrónico después de la estimulación con OKT3 y anti-CD28. Las células se analizaron cinco días después de la transducción mediante tinción con anti-V5-FITC (invitrogen) y anti-HA-PE (abCam). Los dos CAR se pueden detectar simultáneamente en la superficie de los linfocitos T. (c) Los linfocitos T no transducidos, los linfocitos T que expresan solo anti-CAR de CD19, los linfocitos T que expresan solo anti-CAR de CD22 y los linfocitos T que expresan el sistema de clasificación OR de anti-CAR de CD19 o CD22 se expusieron a células diana que no expresan ni CD19 ni CD22, solo CD19 o CD22 individualmente, o ambos antígenos. Los linfocitos T que expresan anti-CAR de CD19 o de CD22 podrían destruir las células diana incluso si faltara un antígeno.

Figura 6: Determinación de afinidad de Biacore para scFv de CD22ALAb de murino, scFv de CD22ALAb humanizado y scFv de M971

Figura 7: Determinación de afinidad de Biacore para scFv de CD19ALAb de murino y CD19ALAb humanizado

Figura 8: Comparación de la cinética de unión entre la unión de scFv-CD19 soluble a scFv por CD19ALAb y scFv de fmc63

Figura 9: Diagrama esquemático que ilustra el CAR de CD19ALAb, el CAR de fmc63, el CAR de CD22ALAb y el CAR de M971 utilizados en los estudios comparativos



Figura 10: Ensayo de eliminación de células diana positivas para CD19 que compara un CAR con un dominio de unión al antígeno CD19ALAb y un CAR equivalente con un dominio de unión a fmc63.

Figura 11: A) Ensayo de eliminación de células diana positivas para CD22 que compara un CAR con un dominio de unión al antígeno CD22ALAb y un CAR equivalente con un dominio de unión a M971. B) Ensayo que compara la liberación de IFN $\gamma$  después del cocultivo a 1:1 con células SupT1 CD22 positivas

Figura 12: Estructura y exones de CD19

Figura 13: Diagramas esquemáticos y mapas de construcciones que ilustran las cuatro construcciones analizadas en el Ejemplo 5. En el mapa de construcción, las porciones marcadas están balanceadas por codones. A: Ambos CAR de CD19 y de CD22 tienen endodominios compuestos 41BB-CD3zeta; B: Ambos CAR de CD19 y de CD22 tienen endodominios compuestos OX40-CD3zeta; C: El CAR de CD19 tiene endodominio compuesto 41BB-CD3zeta y el CAR de CD22 tiene endodominio compuesto CD28-CD3zeta; y D: el CAR de CD19 tiene endodominio compuesto OX40-CD3zeta y el CAR de CD22 tiene endodominio compuesto CD28-CD3zeta

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

#### Descripción detallada

#### RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICOS (CAR)

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

Los primeros diseños de CAR tenían endodominios derivados de las partes intracelulares de la cadena  $\gamma$  y de Fc $\epsilon$ R1 o CD3 $\zeta$ . En consecuencia, estos receptores de primera generación transmitieron la señal inmunológica 1, que fue suficiente para desencadenar la eliminación de los linfocitos T de las células diana relacionadas, pero no pudo activar completamente al linfocito T para proliferar y sobrevivir. Para superar esta limitación, se han construido endodominios compuestos: la fusión de la parte intracelular de una molécula coestimuladora de linfocitos T con la de CD3 $\zeta$  da como resultado receptores de segunda generación que pueden transmitir una señal activadora y coestimuladora simultáneamente después del reconocimiento de antígeno. El dominio coestimulador más utilizado es el de CD28. Esto suministra la señal coestimuladora más potente, es decir, la señal inmunológica 2, que desencadena la proliferación de linfocitos T. También se han descrito algunos receptores que incluyen los endodominios de la familia de receptores de TNF, tales como los estrechamente relacionados OX40 y 41BB que transmiten señales de supervivencia. Incluso se han descrito CAR más potentes de tercera generación que tienen endodominios capaces de transmitir señales de activación, proliferación y supervivencia.

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

En la presente se describe una célula que coexpresa un primer CAR y un segundo CAR, en donde un CAR se puede unir a CD19 y el otro CAR se puede unir a CD22, de tal manera que un linfocito T puede reconocer una célula diana que expresa cualquiera de estos marcadores.

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

Es importante que los dos CAR no se heterodimericen.

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

#### PÉPTIDO SEÑAL

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

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

15 Después, los péptidos señales libres se digieren por proteasas específicas.

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

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

SEQ ID NO. 1: MGTSLLCWMALCLLGADHADG

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

SEQ ID NO. 2: MSLPVTALLPLALLLHAARP

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

SEQ ID NO. 3: MAVPTQVLGLLLLWLTARC

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

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

#### CD19

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

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

45 en la diferenciación de linfocitos B y solo se pierde en la diferenciación final de linfocitos B en células plasmáticas. En consecuencia, CD19 se expresa en todas las neoplasias malignas de linfocitos B, aparte del mieloma múltiple.

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

50

Tabla 1

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

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

55

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

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

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

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

CD19ALAb

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

- 20 En el presente documento se describe un CAR que comprende un dominio de unión a CD19 que comprende

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

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

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

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

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

- 40 El CAR puede comprender una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

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

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIWPGDGD  
NTYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG  
TTVTVSSDIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDA  
SNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGD  
NTYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG  
TLVTVSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDA  
SNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGGGKVEIKR

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDT  
 NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG  
 TLVTVSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKVLID  
 ASNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAADVAVYYCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

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

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

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

QVQLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQGLEWIGQIWPGDGDT  
 NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG  
 TTVTVSS

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDT  
 NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG  
 TLVTVSS

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

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

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGI  
 PPRFSGSGSGTDFTLNHPVEKVDATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK

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

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSG  
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

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

25 DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKVLIDASNLVSG  
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAADVAVYYCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

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

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

35 CD22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CD22ALAb

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

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

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

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

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

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

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

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

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY  
 NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRTDQERSWYFDVWGAGTTVTVSS  
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK

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

EVQLVESGAIEVKKPGSSVKVCKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY  
 NQKFKDRATLTVDKSTSTAYLELRNLRSDDTAVYYCTRTDQERSWYFDVWGQGLTLTVSS  
 DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFS  
 GVPARFSGSGSGVEFTLTISLQSEDFAVYYCSQSTHVPWTFGQGTRLEIK

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

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

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

25 QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY  
 NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRTDQERSWYFDVWGAGTTVTVSS

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

30 EVQLVESGAIEVKKPGSSVKVCKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY  
 NQKFKDRATLTVDKSTSTAYLELRNLRSDDTAVYYCTRTDQERSWYFDVWGQGLTLTVSS

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

35 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK

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

DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFS  
 GVPARFSGSGSGVEFTLTISLQSEDFAVYYCSQSTHVPWTFGQGTRLEIK

40 El CAR puede comprender una variante de la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 33, 34, 35, 36, 37 o 38 que tienen al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante conserve

la capacidad de unirse a CD22 (cuando esté junto con un dominio VL o VH complementario, si corresponde).

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

- 5 CD19 es ampliamente considerado un antígeno pan-B, aunque muy ocasionalmente, puede mostrar cierta infidelidad de linaje. La molécula CD19 se compone de dos dominios IgSF extracelulares separados por un dominio más pequeño y una larga cola intracitoplasmática, casi tan grande como la porción extracelular de la molécula, que lleva un ITAM.
- 10 CD19 es una molécula clave en el desarrollo y activación de los linfocitos B. CD22 es una molécula de IgSF que puede existir en dos isoformas, una con siete dominios y una cola intracitoplasmática que comprende tres ITIM (motivos inhibidores basados en tirosina del receptor inmune) y un ITAM; y una variante de corte y empalme que en su lugar comprende cinco dominios extracelulares y una cola intracitoplasmática que lleva un ITIM. Se cree que CD22 es un receptor inhibidor implicado en el control de las respuestas de los linfocitos B al antígeno. Como CD19, CD22 es
- 15 ampliamente considerado como un antígeno pan-B, aunque se ha descrito la expresión en algunos tejidos no linfoides (Wen et al. (2012) J. Immunol. Baltim. Md 1950 188, 1075-1082). El direccionamiento de CD22 con anticuerpos monoclonales terapéuticos e inmunoconjugados ha entrado en pruebas clínicas. Se ha descrito la generación de CAR específicos para CD22 (Hase et al, 2013, Blood: Volumen 121; 7: 1165-74, y James et al 2008, Journal of immunology, Volumen 180; Número 10; Páginas 7028-38).
- 20 Los estudios detallados de inmunofenotipado de las leucemias de linfocitos B muestran que, si bien el CD19 de superficie siempre está presente, el CD22 de superficie está casi siempre presente. Por ejemplo, Raponi et al (2011, como anteriormente) estudiaron el fenotipo del antígeno de superficie de 427 casos de B-ALL y descubrieron CD22 presente en 341 de los casos estudiados.
- 25 La eventualidad de la regulación negativa de CD19 después del direccionamiento de CAR19 descrito anteriormente puede explicarse por la hipótesis de Goldie-Coldman. La hipótesis de Goldie-Coldman predice que las células tumorales mutan a un fenotipo resistente a una tasa dependiente de su inestabilidad genética intrínseca y que la probabilidad de que un cáncer contenga clones resistentes depende de la tasa de mutación y del tamaño del tumor. Si bien puede ser difícil para las células cancerosas volverse intrínsecamente resistentes a la eliminación directa de
- 30 los linfocitos T citotóxicos, la pérdida de antígeno sigue siendo posible. De hecho, este fenómeno se ha informado anteriormente con antígenos de melanoma dirigidos y linfomas dirigidos por EBV. Según la hipótesis de Goldie-Coldman, la mejor posibilidad de curación sería atacar simultáneamente dianas resistentes no cruzadas. Dado que CD22 se expresa en casi todos los casos de B-ALL, el direccionamiento simultáneo de CAR de CD19 junto con CD22 puede reducir la aparición de clones resistentes negativos a CD19.

#### 35 DOMINIO DE UNIÓN A ANTÍGENO

- El dominio de unión al antígeno es la porción del CAR que reconoce el antígeno. Se conocen numerosos dominios de unión a antígeno en la técnica, incluidos los basados en el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, miméticos de
- 40 anticuerpos y receptores de linfocitos T. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede comprender: un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal; un ligando natural del antígeno diana; un péptido con suficiente afinidad por la diana; un anticuerpo de un solo dominio; un ligante artificial simple como Darpin (proteína repetida de anquirina diseñada); o una cadena sencilla derivada de un receptor de linfocitos T.
- 45 El dominio de unión a antígeno del CAR que se une a CD19 puede ser cualquier dominio que sea capaz de unirse a CD19. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede comprender un ligante de CD19 tal como se describe en la Tabla 1.

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

Tabla 2

Ligante	Referencias
HD63	Pezzutto (Pezzutto, A. et al. J. Immunol. Baltim. Md 1950 138, 2793-2799 (1987))
4 g7	Meeker et al (Meeker, T. C. et al. Hybridoma 3, 305-320 (1984))
Fmc63	Nicholson et al (Nicholson, I. C. et al. Mol. Immunol. 34, 1157-1165 (1997))
B43	Bejcek et al (Bejcek, B. E. et al. Cancer Res. 55, 2346-2351 (1995))
SJ25C1	Bejcek et al (1995, como anteriormente)
BLY3	Bejcek et al (1995, como anteriormente)

B4, o recolocado en superficie, o B4 humanizado	Roguska et al (Roguska, M. A. et al. Protein Eng. 9, 895-904 (1996))
HB12b, optimizado y humanizado	Kansas et al (Kansas, G. S. y Tedder, T. F. J. Immunol. Baltim. Md 1950 147, 4094-4102 (1991); Yazawa et al (Yazawa et al Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 102, 15178-15183 (2005); Herbst et al (Herbst, R. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 335, 213-222 (2010))

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

5

Tabla 3

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

#### DOMINIO ESPACIADOR

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

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

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

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

30



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

SEQ ID NO. 4 (bisagra-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> de IgG1 humana)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

5

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

TTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

10

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

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

SEQ ID NO. 7 (ectodominio de CD2)

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSKDKKIAQFRKEKETFEKEDTYKLF  
KNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIDYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNG  
TDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFCTAGNKVSKESSVEPVSCP  
EKGLD

15

SEQ ID NO. 8 (ectodominio de CD34)

SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKF  
TSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSTVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATS  
PTKPYTSSSPILSDIAEKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQ  
ADADAGAQCVCALLAQSEVRPQCLLLVLNRTEISSKLQLMKKHQSCLKLGILDFTEQDVA  
SHQSYSQKT

20

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

25

30 DOMINIO TRANSMEMBRANA

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

35

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

40

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

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

5 SEQ ID NO. 45  
IIAIAWGALLLVALIFGTASYLI

#### ENDODOMINIO DE ACTIVACIÓN

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

20 La célula de la presente invención comprende dos CAR, cada uno con un dominio de señalización intracelular; el endodominio del primer CAR comprende un dominio coestimulador, en donde el dominio coestimulador es el dominio coestimulador de CD28, y un dominio que contiene ITAM pero no comprende un endodominio de la familia de receptor de TNF; y el endodominio del segundo CAR comprende un endodominio de la familia de receptores de TNF, en el que el endodominio de la familia de receptor de TNF es el endodominio OX40 o 4-1BB, y un dominio que contiene ITAM pero no comprende un dominio coestimulador.

25 Como tal, los dominios coestimuladores y productores de señales de supervivencia son "compartidos" entre los dos (o más) CAR de una puerta OR. Por ejemplo, cuando una puerta OR tiene dos CAR, CAR A y CAR B, el CAR A comprende un dominio coestimulador de CD28 y el CAR B comprende un endodominio de la familia de receptores TNF, seleccionado entre el endodominio OX40 o 4-1BB.

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

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

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

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY  
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

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

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP  
RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR  
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP  
PR

SEQ ID NO. 11 que comprende el dominio transmembrana CD28 y los endodominios CD28, OX40 y CD3 Zeta (por referencia solamente).

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP  
 RDAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQG  
 QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG  
 MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

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

#### "DIVISIÓN" O CLASIFICACIÓN DE LOS ENDODOMINIOS

La presente invención proporciona un sistema de clasificación de OR en el que los dominios de señal de coestimulación/supervivencia se "dividen" entre los dos CAR.

A este respecto, la presente invención proporciona una célula que coexpresa un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo CAR en la superficie celular, cada CAR que comprende un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular del primer CAR comprende un dominio coestimulador de CD28 y un dominio que contiene ITAM, pero no comprende un endodominio de la familia de receptor de TNF; y el dominio de señalización intracelular del segundo CAR comprende un endodominio de la familia de receptor de TNF seleccionado entre el endodominio OX40 o 4-1BB, y un dominio que contiene ITAM, pero no comprende un dominio coestimulador.

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

El dominio de señalización intracelular del primer CAR comprende un dominio coestimulador de CD28 y no comprende un dominio que transmite señales de supervivencia (como un endodominio de la familia del receptor de TNF). El dominio de señalización intracelular del segundo CAR comprende un endodominio de la familia del receptor de TNF seleccionado de endodominio OX40 o 4-1BB y no comprende un dominio coestimulador (tal como el endodominio CD28).

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

SEQ ID NO. 41 (endodominio coestimulador de CD28)

SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDAAYRS

El CAR de la invención puede comprender una variante de la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 41 con al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante conserve la capacidad de coestimular los linfocitos T tras el reconocimiento de antígeno, es decir, proporcionar señal 2 a los linfocitos T.

El endodominio de la familia del receptor de TNF es un endodominio OX40 o 4-1BB. El endodominio OX40 puede tener la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 42. El endodominio 4-1BB puede tener la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 43.

SEQ ID NO. 42 (endodominio OX40)

RDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

SEQ ID NO. 43 (endodominio 4-1BB)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL

El CAR puede comprender una variante de la secuencia mostrada como SEQ ID NO. 42 o 43 con al menos el 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia, siempre que la secuencia variante conserve la capacidad de transmitir una señal de supervivencia a los linfocitos T tras el reconocimiento del antígeno.

El dominio de señalización intracelular del primer y del segundo CAR comprende un dominio que contiene ITAM, tal como un dominio zeta CD3. El dominio zeta CD3 puede tener la secuencia mostrada como la SEQ ID NO. 44.

SEQ ID NO. 44 (endodominio CD3zeta)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG  
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

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

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

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

15 "ITAM" es un endodominio zeta CD3.

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

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

"TNF" es un endodominio de familia de receptor de TNF tal como los endodominios OX40 o 4-1BB.

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

### 35 SITIO DE COEXPRESIÓN

La invención se refiere a un ácido nucleico que codifica los primeros y segundos CAR.

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

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

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

### CÉLULA

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

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

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

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

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

5 Los linfocitos T citotóxicos (linfocitos TC o CTL) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Los CTL expresan el CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus dianas al unirse al antígeno asociado con MHC clase I, que está presente en la superficie de todas las células nucleadas. A través de IL-10, adenosina y otras moléculas secretadas por los linfocitos T reguladores, las  
10 células CD8+ pueden inactivarse a un estado anérgico, que previene enfermedades autoinmunes tales como la encefalomielitis autoinmune experimental. Los linfocitos T de memoria son un subconjunto de linfocitos T específicos de antígeno que persisten a largo plazo después de que se resuelve una infección. Se expanden rápidamente a un gran número de linfocitos T efectoras tras la reexposición a su antígeno relacionado, proporcionando así al sistema inmune "memoria" contra infecciones pasadas. Los linfocitos T de memoria comprenden tres subtipos: linfocitos T de memoria central (linfocitos TCM) y dos tipos de linfocitos T efectoras de memoria (linfocitos TEM y linfocitos TEMRA).  
15 Los linfocitos de memoria pueden ser CD4+ o CD8+. Los linfocitos T de memoria típicamente expresan la proteína de la superficie celular CD45RO.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 15 SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO

La invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifican un primer CAR y un segundo CAR tal como se define en la célula de la invención.

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

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

25 La secuencia de ácido nucleico puede tener la siguiente estructura:  
AgB1-espaciador1-TM1- coestim- ITAM1 -coexpr-AbB2-espaciador2-TM2-TNF-ITAM2  
en la que

- 30 AgB1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno de un primer CAR;  
espaciador 1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador de un primer CAR;  
TM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana de un primer CAR;  
coestim es una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador de CD28;  
ITAM1 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del primer CAR;  
35 coexpr es una secuencia de ácido nucleico que permite la coexpresión de ambos CAR  
AgB2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno de un segundo CAR;  
espaciador 2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador de un segundo CAR;  
TM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana de un segundo CAR;  
TNF es una secuencia de ácido nucleico que codifica un endodominio del receptor de TNF seleccionado entre  
40 OX40 o endodominio 4-1BB;  
ITAM2 es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del segundo CAR;

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

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

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

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

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

Tabla 3

	U	C	A	G
U			Tyr (Y)	Cys (C)

UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Ocre	UGU } Ópalo
UUC } (F)	UCC } (S)	UAC } Ámbar	UGC } Trp(W)
UUA } Leu	UCA }	UAA }	UGA }
UUG } (L)	UCG }	UAG }	UGG }

(continuación)

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

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

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

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

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

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

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

VECTOR

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

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

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

## 10 COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una pluralidad de células que expresan CAR, tales como linfocitos T o células NK de acuerdo con la invención. Las composiciones farmacéuticas generalmente pueden comprender adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 15 La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Dicha formulación puede, por ejemplo, estar en una forma adecuada para infusión intravenosa.

## 20 MÉTODO DE TRATAMIENTO

Las células de la presente invención son capaces de eliminar células cancerosas, tales como las células de linfoma de células B. Las células que expresan CAR, tales como linfocitos T, se pueden crear *ex vivo* ya sea de la propia sangre periférica del paciente (1ª parte), o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica del donante (2ª parte), o de sangre periférica de un donante no relacionado (3ª parte). Como alternativa, los

25 linfocitos T con CAR pueden provenir de la diferenciación *ex vivo* de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias a linfocitos T. En estos casos, los linfocitos T con CAR se generan mediante la introducción de ADN o ARN que codifica el CAR por uno de muchos medios, incluida la transducción con un vector viral, la transfección con ADN o ARN.

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

Tabla 4 - expresión de antígenos linfoides en leucemias linfoides

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

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

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

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

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

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

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



La leucemia de linfocitos B puede ser leucemia linfoblástica aguda.

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

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

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1 - Prueba de concepto de un sistema de clasificación 'OR' lógico de CD19/CD22 (por referencia)

15 Se construyó un sistema de clasificación 'OR' de CAR de CD19 y CD22 mediante la coexpresión de un CAR de CD19 y un CAR de CD22 en el mismo vector. El anti-ligante de CD19 era un scFv derivado del anticuerpo B4 recolocado en superficie (Roguska et al. (1996) Protein Eng. 9, 895-904), y el anti-ligante de CD22 era un scFv derivado del anticuerpo humanizado RFB4. Se usó un espaciador de bisagra- CH2-CH3 de IgG1 humana para ambos CAR, cuya secuencia de codificación se apareó por balanceo con codones para evitar la recombinación homóloga por el vector integrante.

20 El dominio TM en ambos CAR provenía del de CD28, y ambos endodominios de CAR comprendieron CD3-Zeta. Una vez más, estas secuencias homólogas fueron apareadas por balanceo con codones. La coexpresión se logró clonando los dos CAR en un marco separado por un péptido FMD-2A. La secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos de la construcción de sistema de clasificación 'OR' de CD19/CD22 se muestra como la SEQ ID NO: 13 y 14; respectivamente.

25

SEQ ID NO: 13

ATGAGCCTGCCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGACCATACCCCCTACGAC  
 CTGCCCCGACTACGCCAGCCTGAGCGGAGGCGGGCGAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAG  
 AAGCCTGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCTGTAAAGGCCAGCGCTACACCTTCACCAGCAACTGGATGCACTGGGTG  
 AGGCAGGCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCGAGATCGACCCAGCGACAGCTACACCAACTACAACCAG  
 AAGTTCAAGGGCCGGGTGACCATCACCGTGGATAAGAGCGCCAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGA  
 AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCAGCAACCCCTACTACTACGCTATGGACTACTGGGGCCAG  
 GGCACCCTGGTGACCGTGTCCAGCGCGGAGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGATCTGGCGCGGAGGGAGCGAGATC  
 GTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTGTAGCGCCAGCAGC  
 GCGTGAATTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGAAGATGGATCTACGACACCAGCAAG  
 CTGGCCAGCGCGTGGCCGCCAGATTACAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTG  
 GAGCCTGAGGATTTGCGCGTGTATTATTGCCACCAGAGGGGAGCTACACCTTTGGCGCGGGAACAAAGCTGGAG  
 ATCAAGCGCTCAGATCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCC  
 CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGT  
 GATATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT  
 ATTTTCTGGGTGAGGAGTGAAGTTTACGAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTC  
 TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG  
 GGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC  
 TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA  
 GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTT  
 CTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATT  
 TTAAAGGTGTCCAGTGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCAGGGGGGTCCCTGCGC  
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGSAATTCGCTTTTCACTATCTATGACATGTCTTGGGTCCGCCAGGTTCGGGGGAAGGGG  
 CTGGAGTGGGTCTCATATATTAGTAGTGGTGGTGGTACCACCTATTACCCGGACACTGTGAAGGGCCGCTTCACC  
 ATCTCCCGTGACAATTCGCCAACACTCTGGATCTTCAAATGAACAGTCTGCGCGTCGAGGACACGGCTGTCTAT  
 TATTGTGCGCGTCATAGTGGCTACGGTAGTAGCTACGGGGTTTTGTTTGTCTTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTC  
 ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAAGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCCAGATGACTCAG  
 TCTCCGTCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGGTCACCATCACCTGCCGTGCAAGTCAGGACATTAGCAAT  
 TATTTAAACTGGCTTCAACAGAAACCGGGGAAAGCCCCGAAGCTCCTGATTTACTACACATCAATCTTACACTCA  
 GGAGTCCCGTCACGCTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCGGAA  
 GATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAACCTGGAAATC  
 AAACGTTTCGGATCCAGCCGAACCAAGAGCCCCGATAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTG  
 CTGGGAGGCCCCAGCGTGTCTGTCTTCCACCAAGCCAAAGGATACCCTGATGATTAGTAGAACACCCGAAGTG  
 ACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCCGAGGTGAAATTTAATTGGTATGTTGATGGTGTGAAGTG  
 CACAACGCCAAAACCAACCCAGAGAGGAGCAGTACAATTTTACCTATAGAGTCGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG  
 CATCAGGATTGGCTGAACGGAAAAAGATAACAATGTAAAGTGAGCAATAAGGCCCTGCCCGCTCCAATTGAGAAG  
 ACAATTAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTATACACTGCCACCCAGTAGAGACGAACTGACA  
 AAGAATCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGATTTTACCCATCTGATATCGCCGTGGAATGGGAATCTAAC  
 GGGCAGCCCCGAGAATAACTATAAGACAACCCACAGTGCTGGATAGCGATGGCAGCTTTTTTCTGTATTCTAAG  
 CTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGAAATGTGTTTAGCTGTAGTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAAT

CACTATAACCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGTGGGA  
GGCGTGTGGCGCTGTACTCTCTCTCTGAGCCGTGSCCTTCATCATCTTTTGGGTGGCGTCCCGGGTGAAGTTT  
TCTCGCTCTGCCGATGCCCCAGCCTATCAGCAGCGCCAGAAATCAGCTGTACAATGAAGTGAACCTGGGCAGGCGG  
GAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAAACACGGCGCAAAAATCCC  
CAGGAGGCGACTCTATAACGAGCTGCAGAGGACAAAATGGCCGAGGCTATTCGAGATCGGCATGAAGGGAGAG  
AGAAGACGGCGAAAGGGGCCACGACGGCCTCTATCAGCGATTGTCCACCGCTACAAAAGATACATATGATGCCCTG  
CACATGCGAGGCCCTGCCACCCAGATGA

SEQ ID NO: 14

MSLPVTALLLPLALLLHAARFPYPYDVPDYASLSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT  
SNWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR  
GSNPFYYYAMDYWGQGLVTVSSCGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSGVNY  
MHWYQQKPGQAPRRWTYDTSKLAGVPARFSGSGSGTSYSISLTISSELEPEDFAVYYCHQGRSYTFGGGT  
KLEIKRSDPTTTPAPRPPTFPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVVLVVVGGVLAC  
YSLIVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPFEMGGKPRRKN  
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAEGRGSLI  
TCGDVEENPGPMETGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVR  
QVPGKGLEWVSYISSGGGTYYPDTVKGRFTISRDNRSNTLDLQMNLSLRVEDTAVYYCARHSGYGSY  
GVLFAYWGQGLTVTVSSCGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNLW  
QQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKL  
EIKRSDFAEPKSPDKTHTCPFCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTITVLHQQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQF  
REFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDKPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR  
SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPFEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM  
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

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

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

#### Ejemplo 2 - Identificación y caracterización de CD19ALAb y CD22ALAb

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

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

Los resultados se muestran en las figuras 6 a 8.

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

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

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

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

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

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

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

Los resultados se muestran en las Figuras 10 y 11.

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

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

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

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

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

Se desarrollaron cuatro construcciones de sistema de clasificación de OR tal como se muestra en la Figura 13. Todos codificaron el sistema de clasificación de OR CD19/CD22 que tienen dominios de unión a antígeno idénticos, dominios

espaciadores y dominios transmembrana: la única diferencia entre las construcciones estaba en los endodominios, que se muestran en la siguiente Tabla:

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

- 5 La capacidad de las células que expresan cada sistema de clasificación OR de CD19/CD22 para destruir las células de Raji *in vitro* se ensayó como se describió anteriormente. Las PBMC transducidas que expresan las diversas combinaciones de sistemas de clasificación de OR se cultivaron conjuntamente durante 72 horas con células diana Raji CD19+/CD22+ en una relación de 1:1 y de 1:10 de efector:célula diana.
- 10 En la figura 14 se muestran los resultados. Se descubrió que los cuatro sistemas de clasificación OR destruyen las células diana significativamente mejor que los CAR de fmc63 y M971. Con la relación efector:diana de 1:10, se demostró que el sistema de clasificación OR de endodominio "dividido", que tienen 4-1BBzeta/OX40zeta en un CAR y CD28zeta en el otro CAR, tuvo la mejor actividad destructiva.

## REIVINDICACIONES

1. Una célula que coexpresa un primer receptor de antígeno quimérico (CAR) y un segundo CAR en la superficie celular, cada CAR que comprende un dominio de señalización intracelular, en donde

el dominio de señalización intracelular del primer CAR comprende un dominio coestimulador de CD28 y un dominio que contiene ITAM pero no comprende un endodominio de la familia de receptores de TNF; y el dominio de señalización intracelular del segundo CAR comprende un endodominio de familia de receptor de TNF seleccionado entre el endodominio OX40 o 4-1BB y un dominio que contiene ITAM pero no comprende un dominio coestimulador.

2. Una célula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer CAR tiene la estructura

*AgB1-espaciador1-TM1- coestim-ITAM*

en la que:

*AgB1* es el dominio de unión a antígeno del primer CAR;  
*espaciador 1* es el espaciador del primer CAR;  
*TM1* es el dominio transmembrana del primer CAR;  
*coestim* es un dominio coestimulador; e  
*ITAM* es un endodominio que contiene *ITAM*;  
 y el segundo CAR tiene la estructura:

*AgB2-espaciador2-TM2- TNF-ITAM*

en la que:

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

3. Una secuencia de ácido nucleico que codifica tanto el primer como el segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) como se define en cualquier reivindicación anterior.

4. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la siguiente estructura:

*AgB1-espaciador1-TM1 - coestim- ITAM1-coexpr-AbB2-espaciador2-TM2-TNF-ITAM2*

en la que

*AgB1* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del primer CAR;  
*espaciador 1* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del primer CAR;  
*TM1* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del primer CAR;  
*coestim* es una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador;  
*ITAM1* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del primer CAR;  
*coexpr* es una secuencia de ácido nucleico que permite la coexpresión de ambos CAR  
*AgB2* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a antígeno del segundo CAR  
*espaciador 2* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el espaciador del segundo CAR;  
*TM2* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana del segundo CAR;  
*TNF* es una secuencia de ácido nucleico que codifica un endodominio del receptor TNF;  
*ITAM2* es una secuencia de ácido nucleico que codifica el endodominio que contiene ITAM del segundo CAR;  
 cuya secuencia de ácido nucleico, cuando se expresa en una célula, codifica un polipéptido que se escinde en el sitio de escisión de forma que el primer y el segundo CAR se coexpresan en la superficie celular.

5. Un kit que comprende

(i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el primer receptor de antígeno quimérico (CAR) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, cuya secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:

*AgB1-espaciador1-TM1 - coestim- ITAM1*

en la que

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

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

- 5 (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo receptor de antígeno quimérico (CAR) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, cuya secuencia de ácido nucleico tiene la siguiente estructura:

*AbB2-espaciador2-TM2-TNF-ITAM2*

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

- 15 6. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 3 o 4
7. Un método para fabricar una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende el paso de introducir: una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4; una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 5; o un vector de acuerdo con la reivindicación 6, en una célula *ex vivo*.
- 20 8. Una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 25 9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para usarse en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

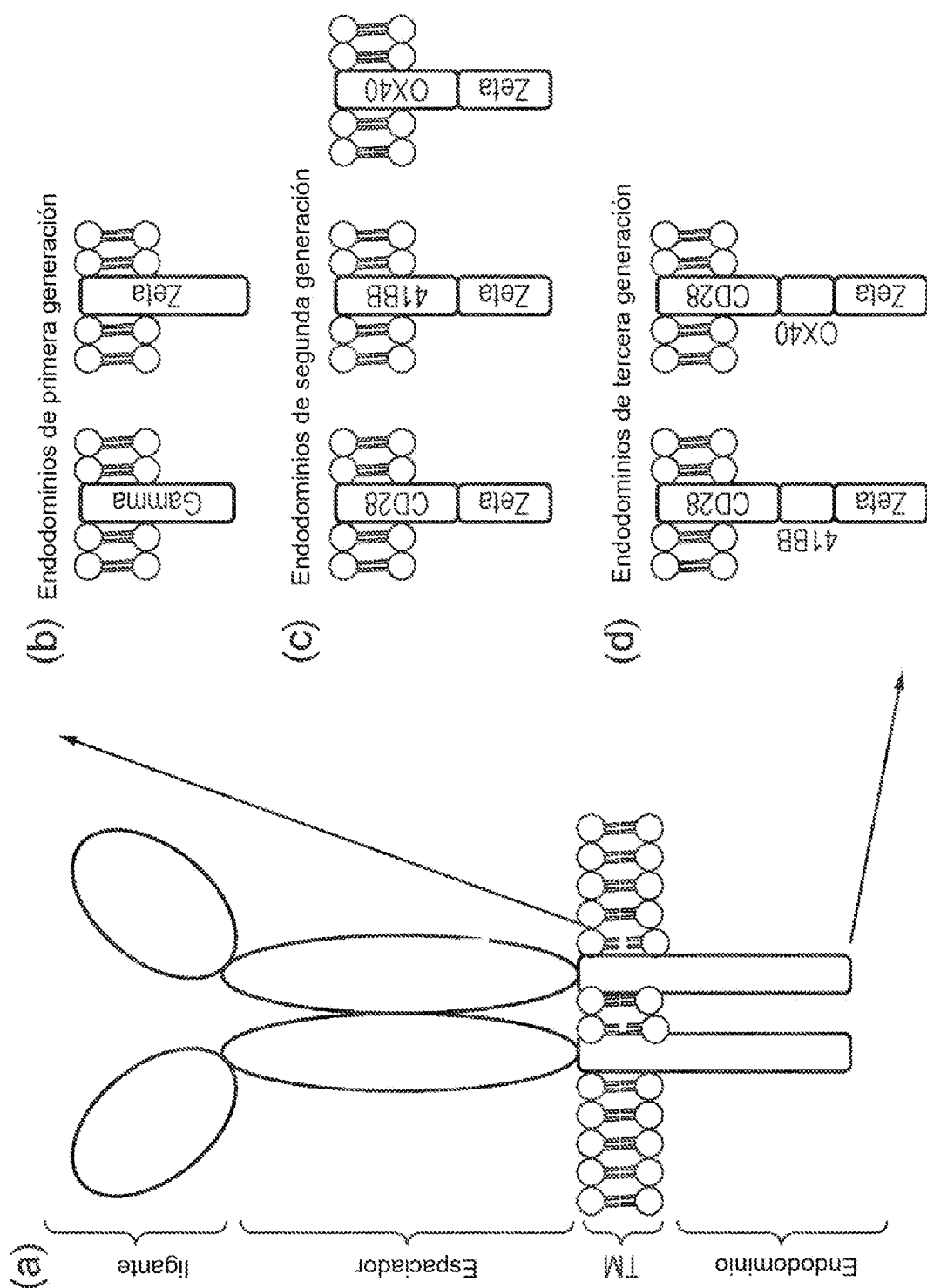


FIG. 1



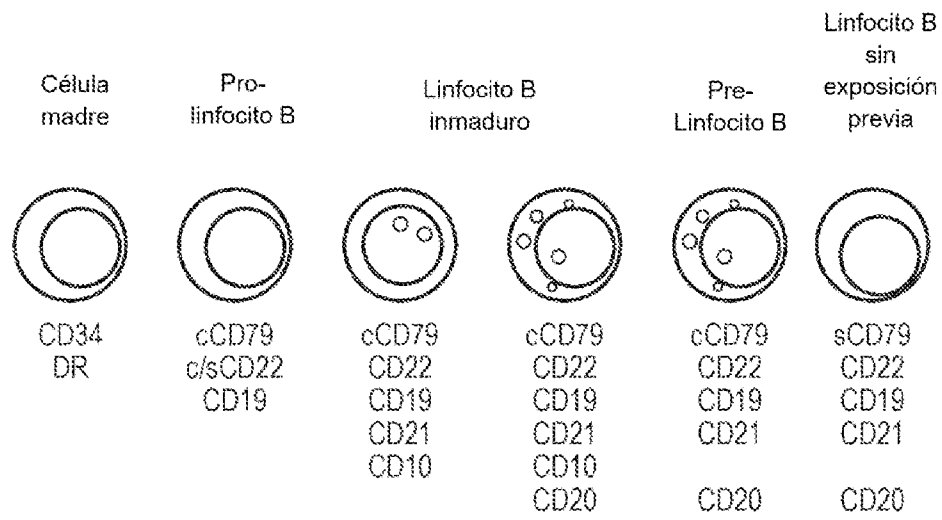


FIG. 2

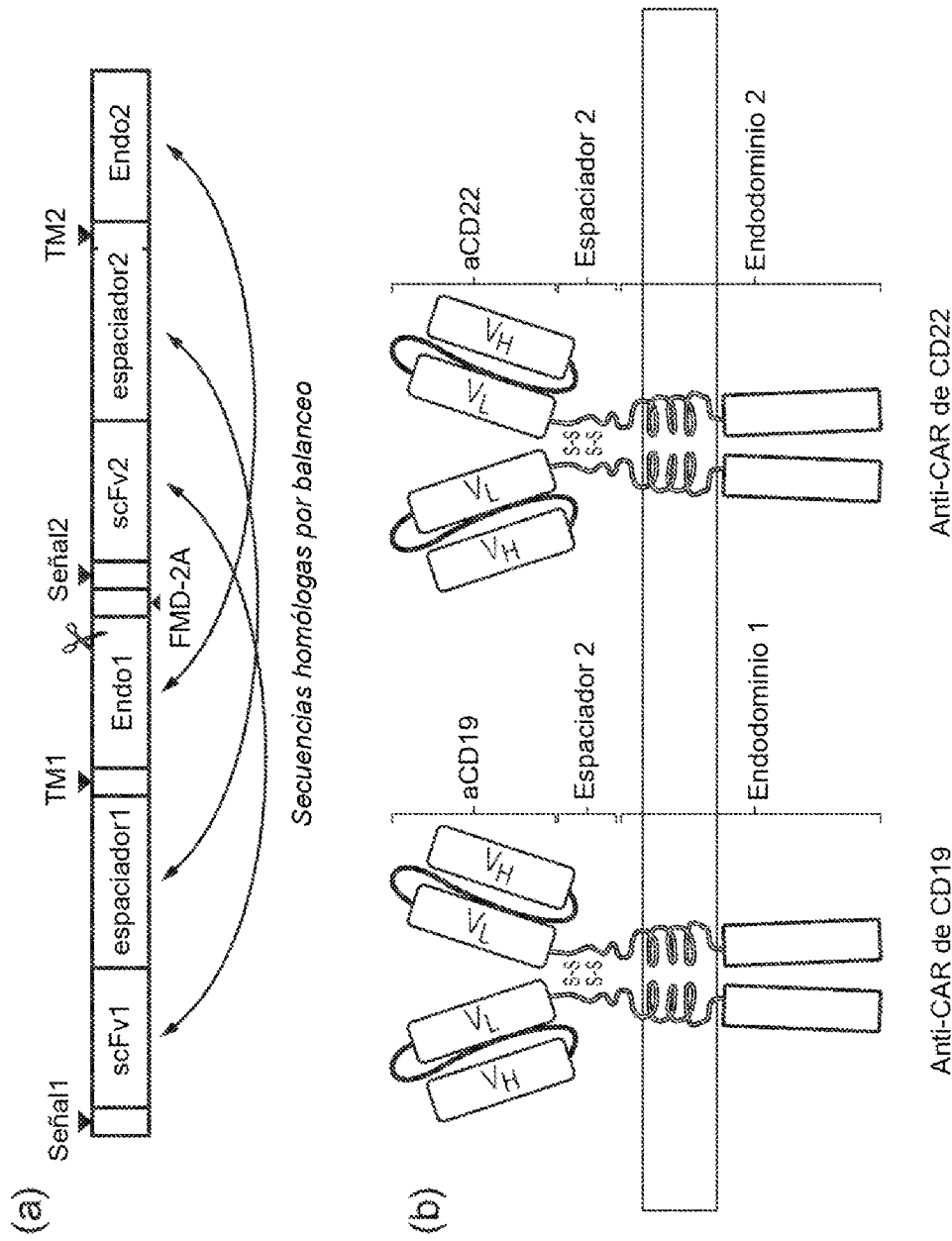


FIG. 3

462

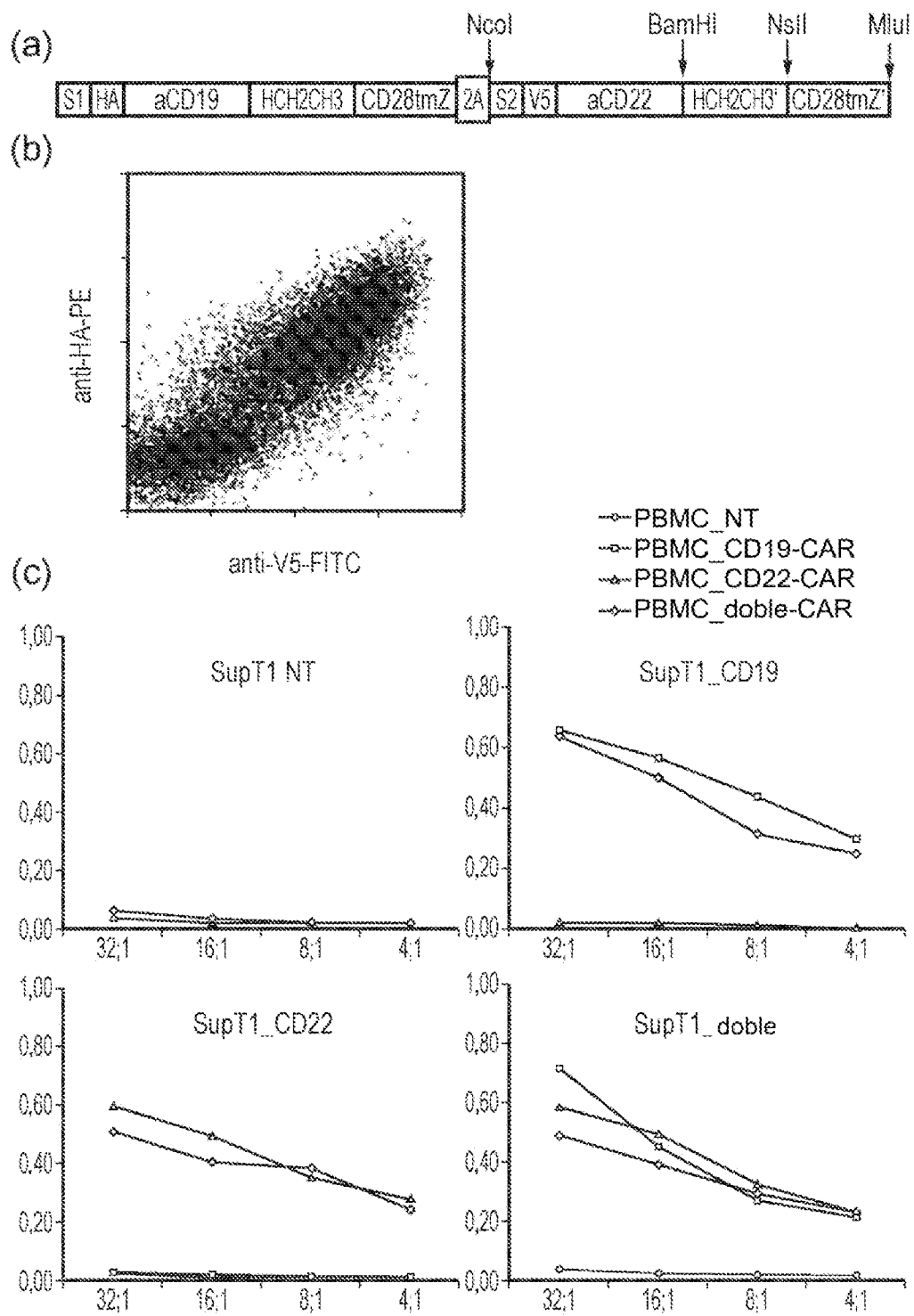


FIG. 5

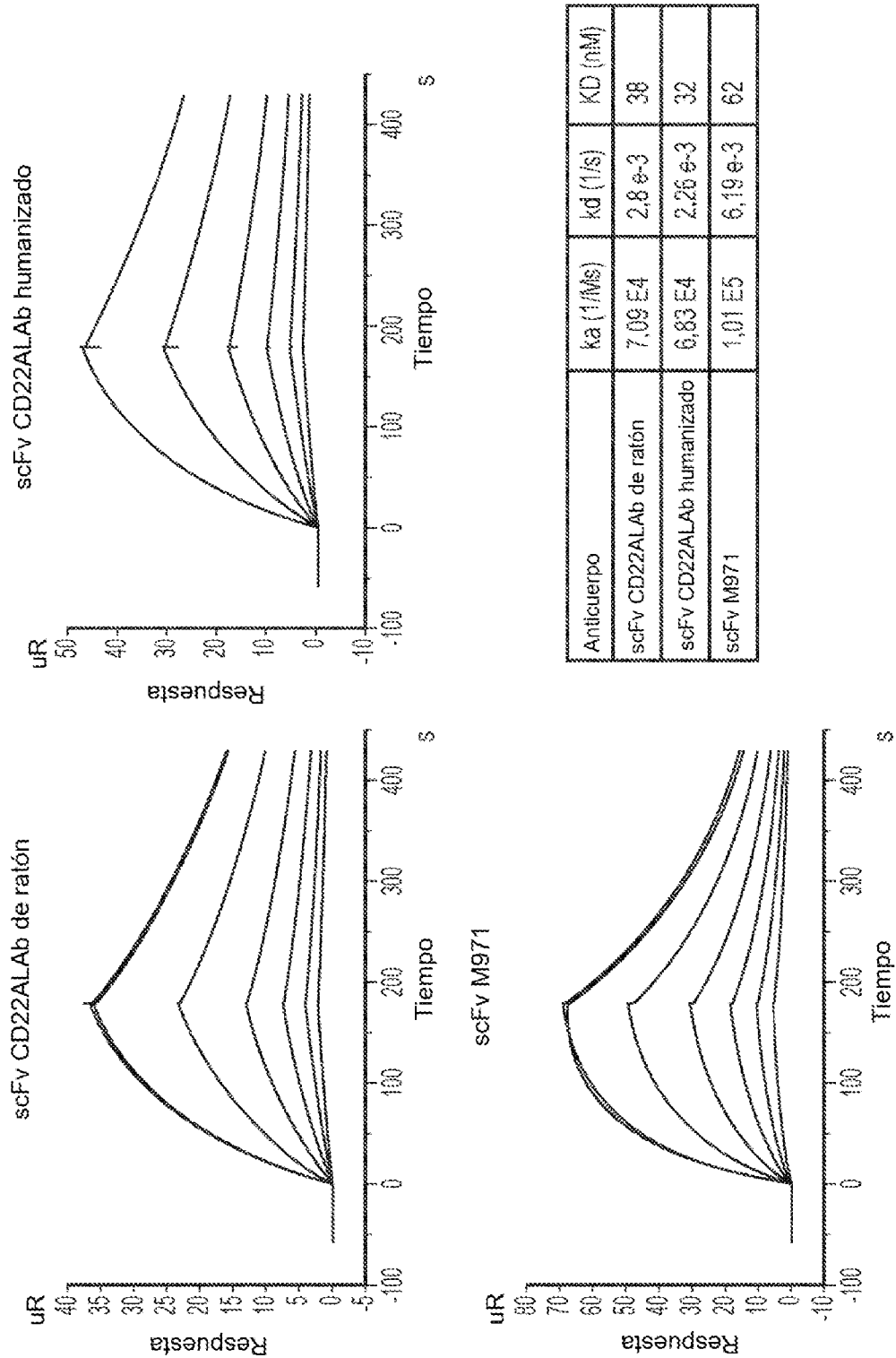


FIG. 6

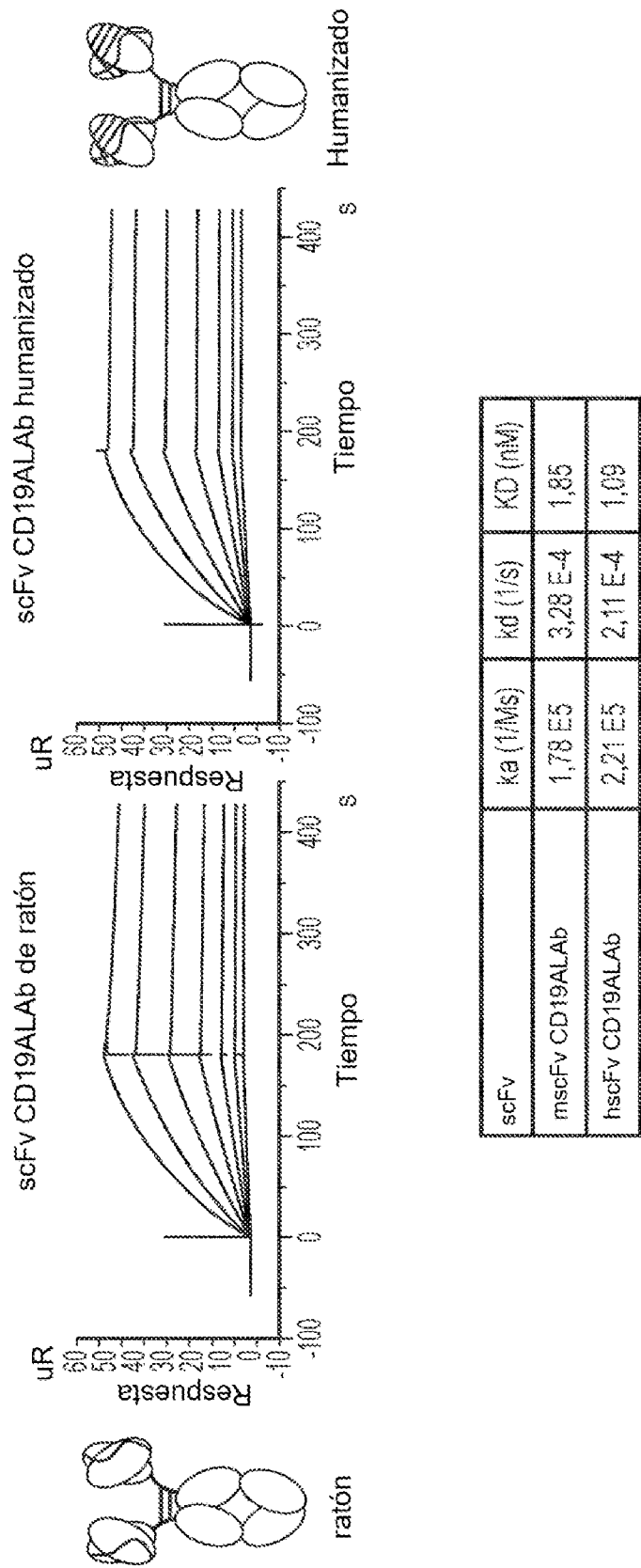


FIG. 7

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

FIG. 8

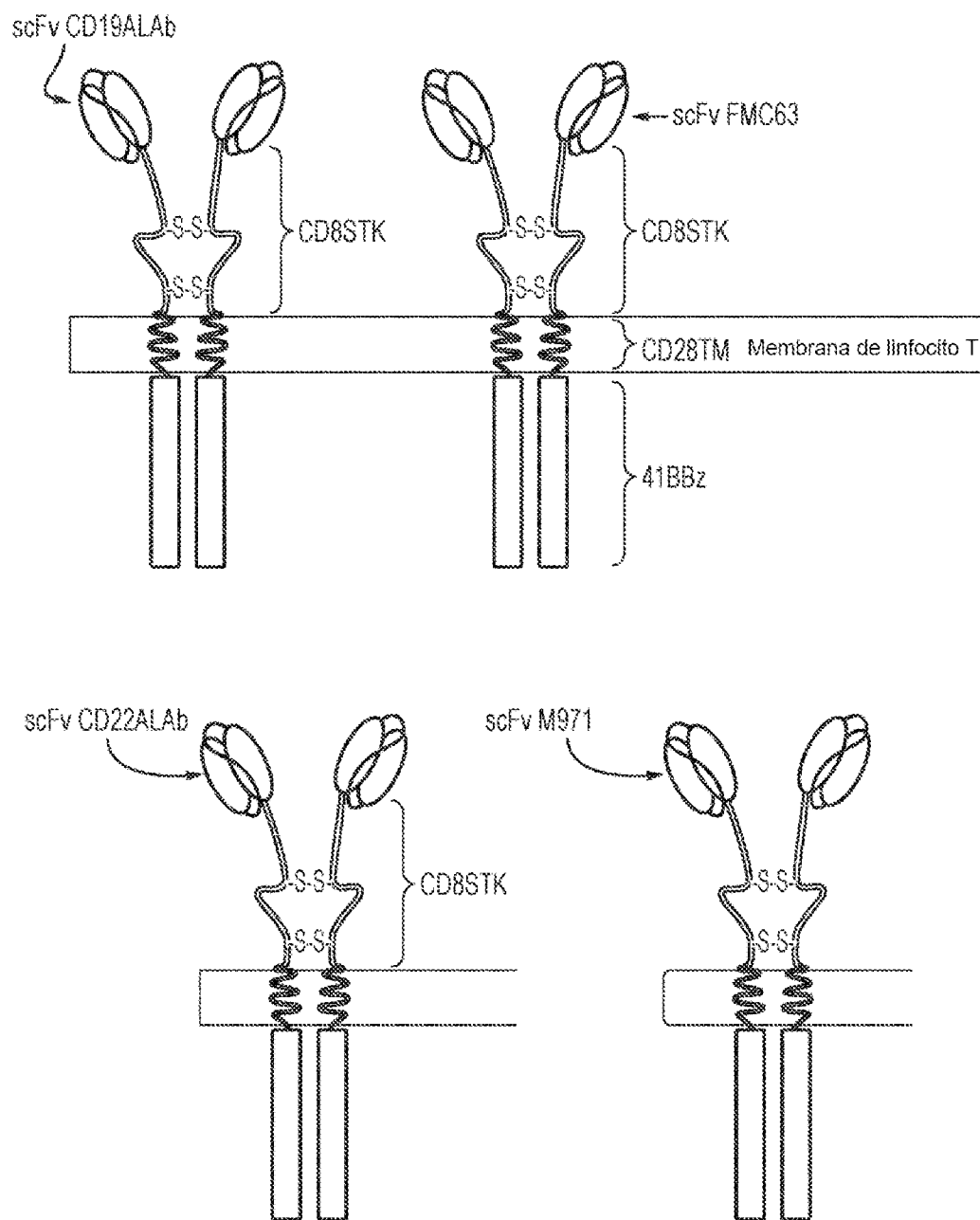


FIG. 9



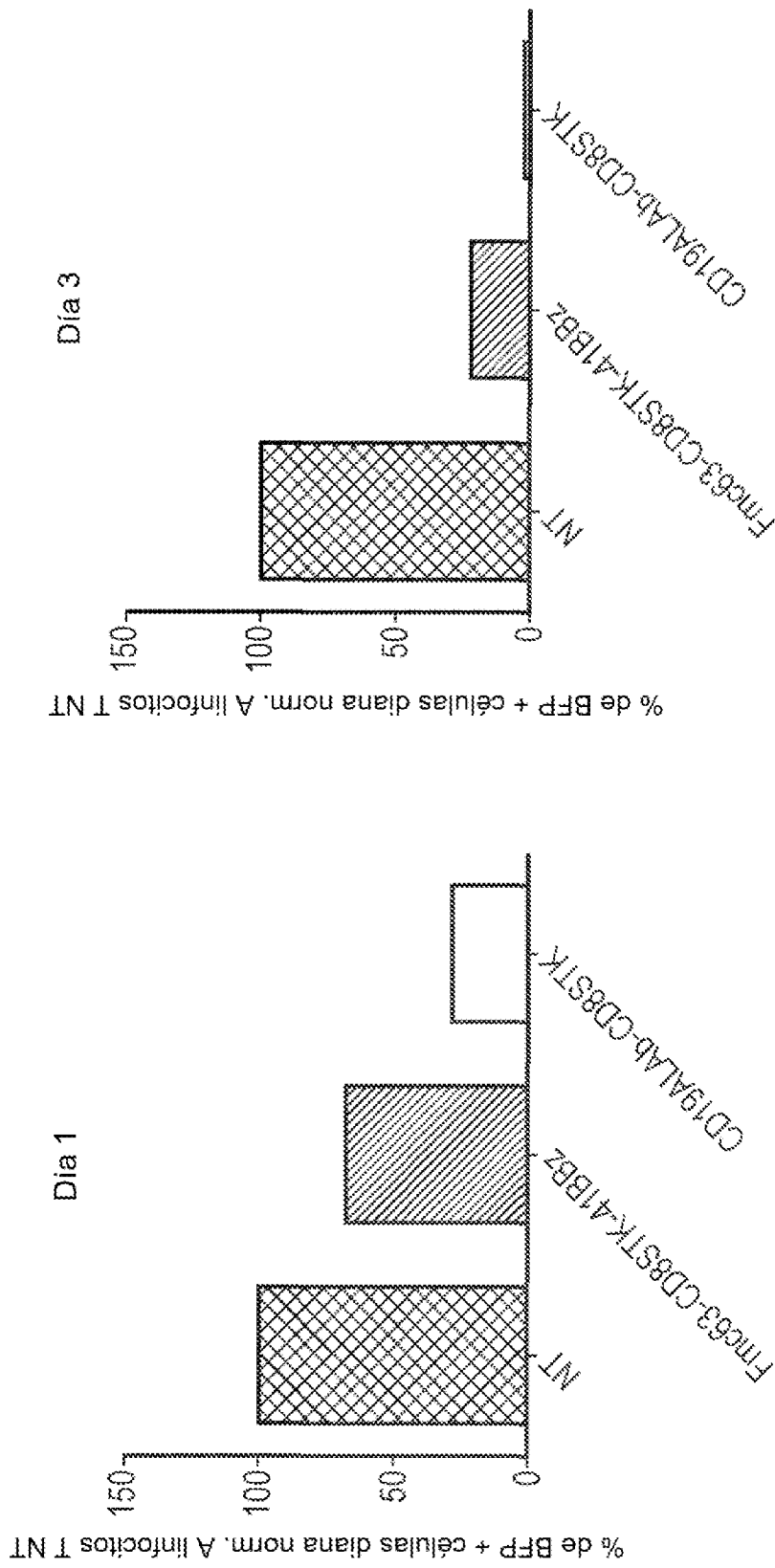


FIG. 10

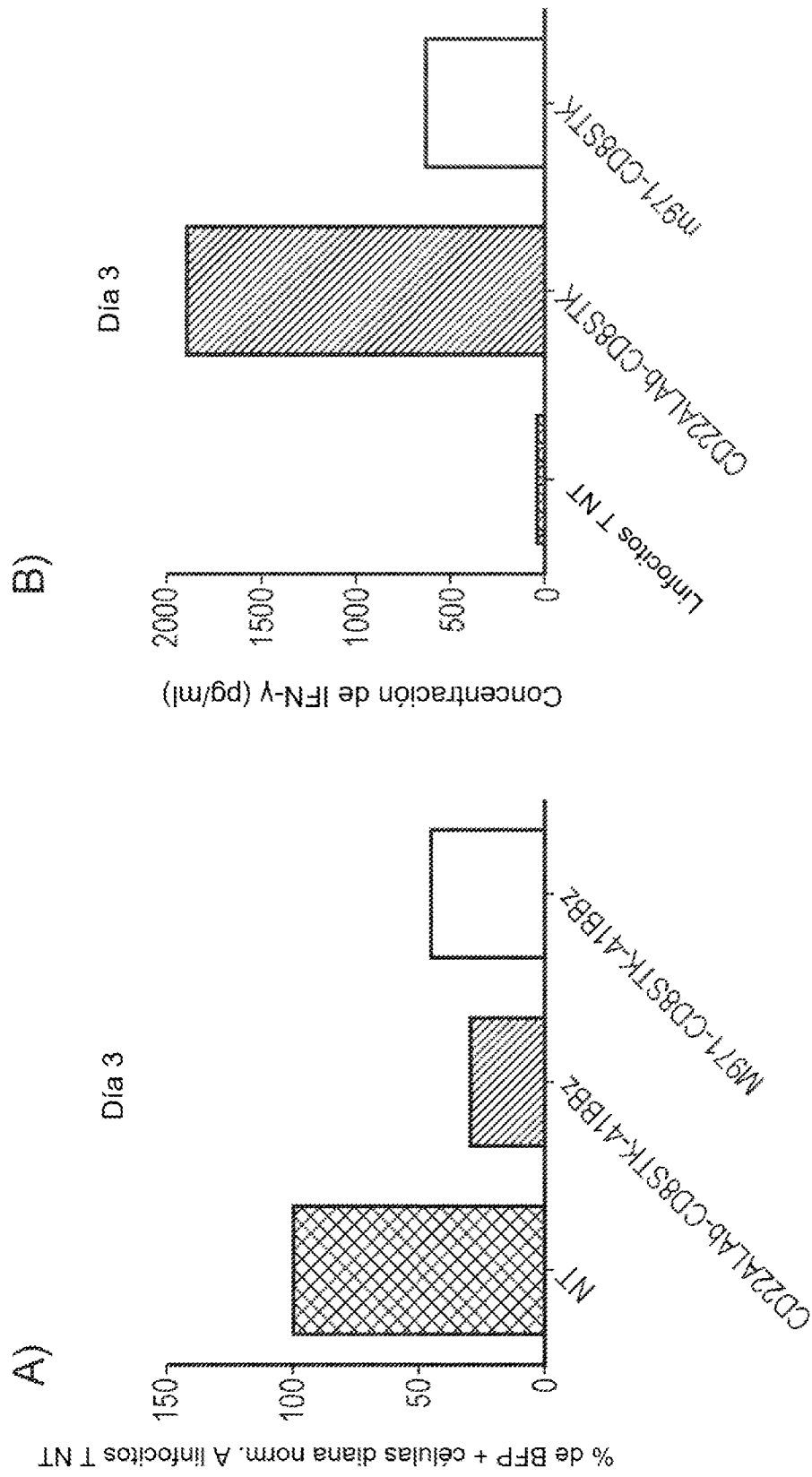


FIG. 11

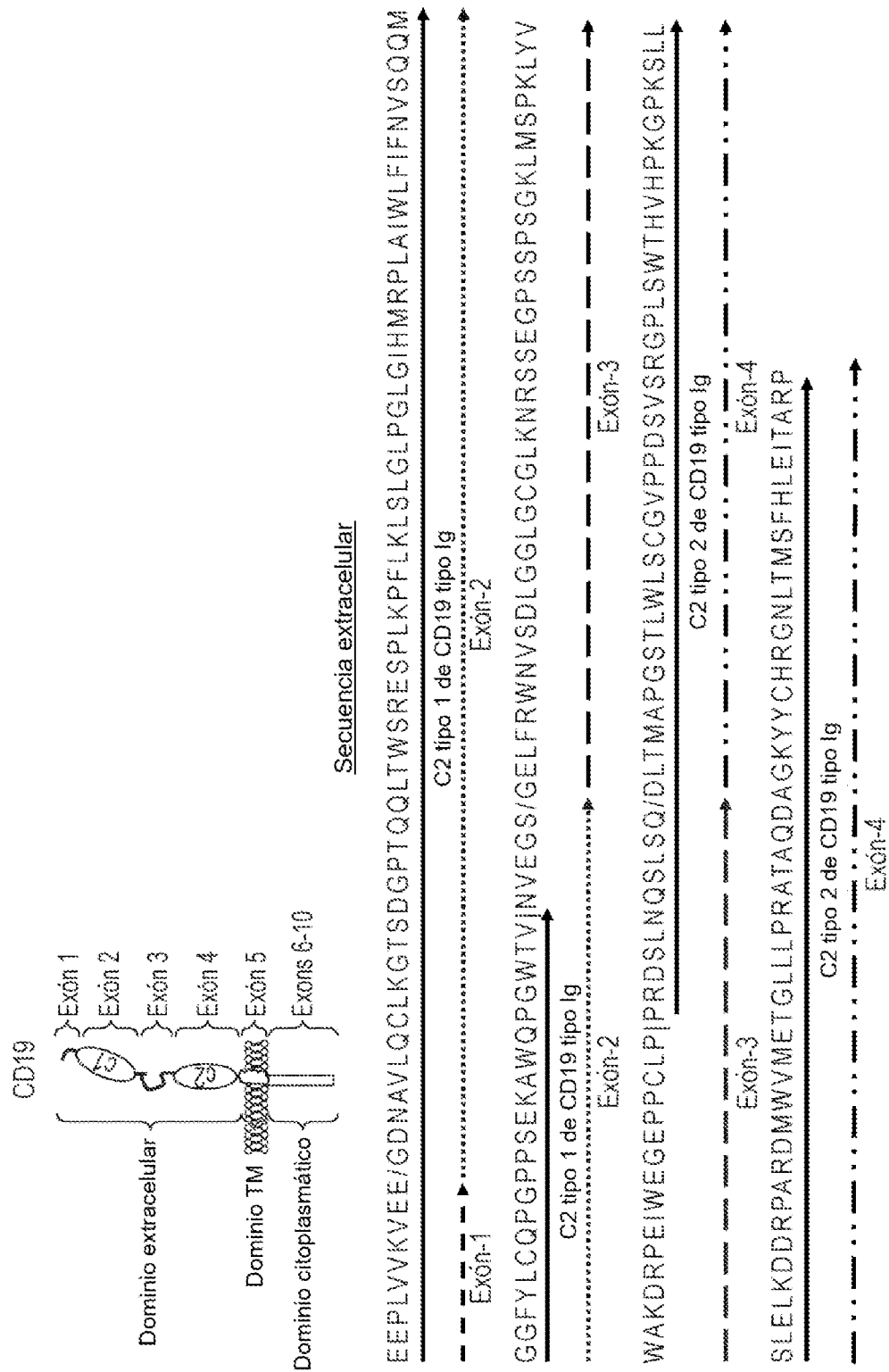


FIG. 12

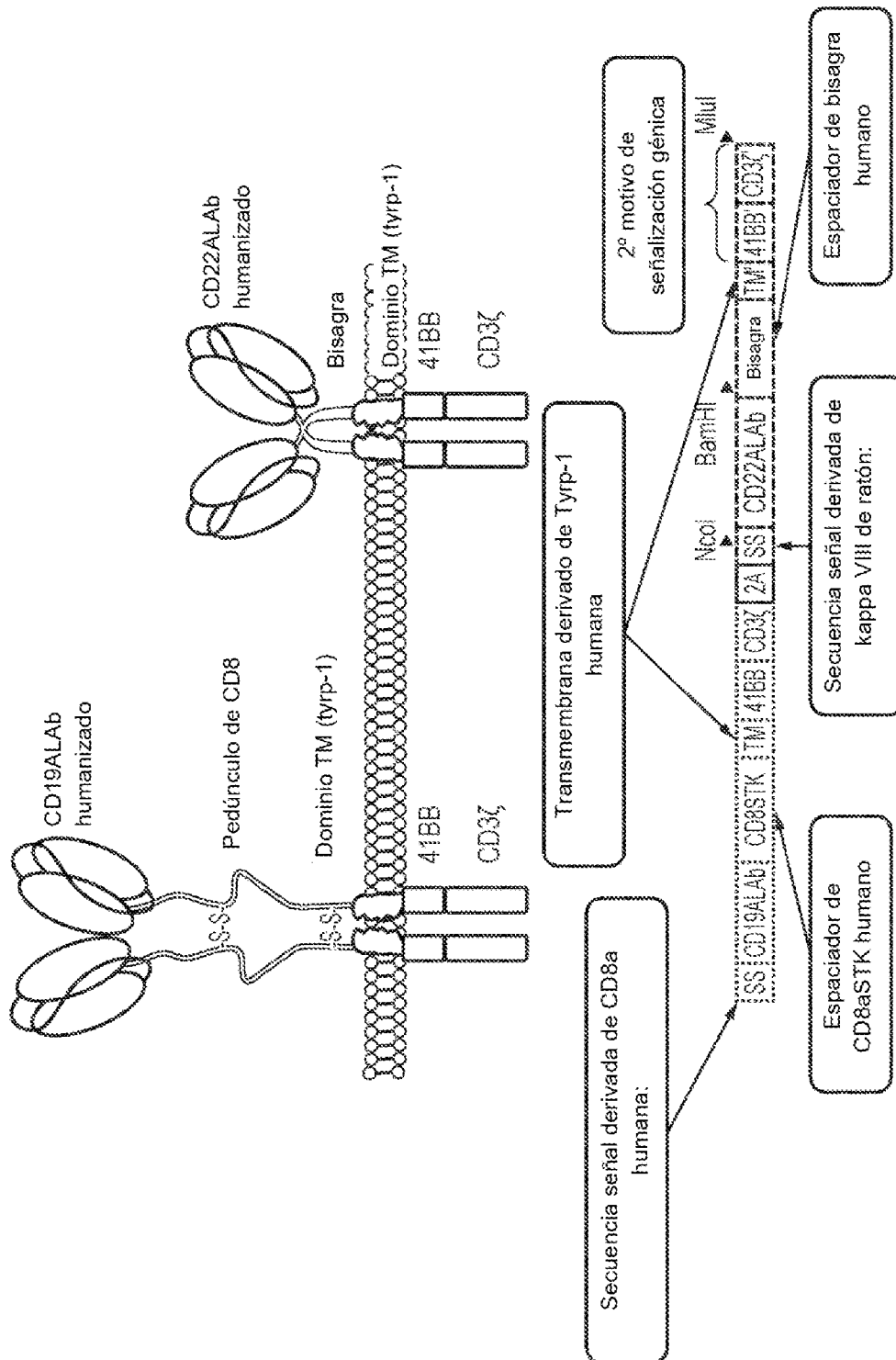


FIG. 13A

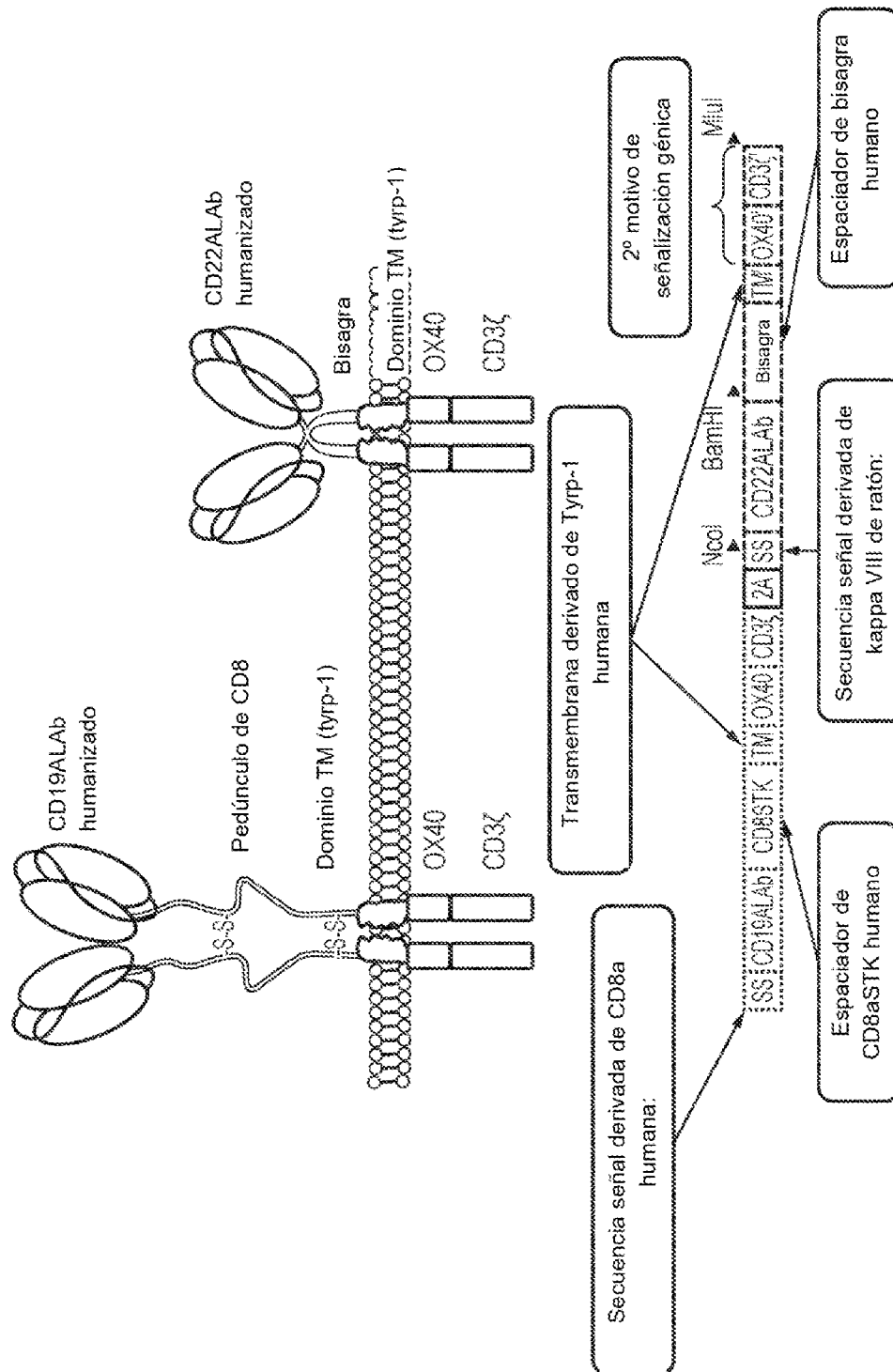


FIG. 13B

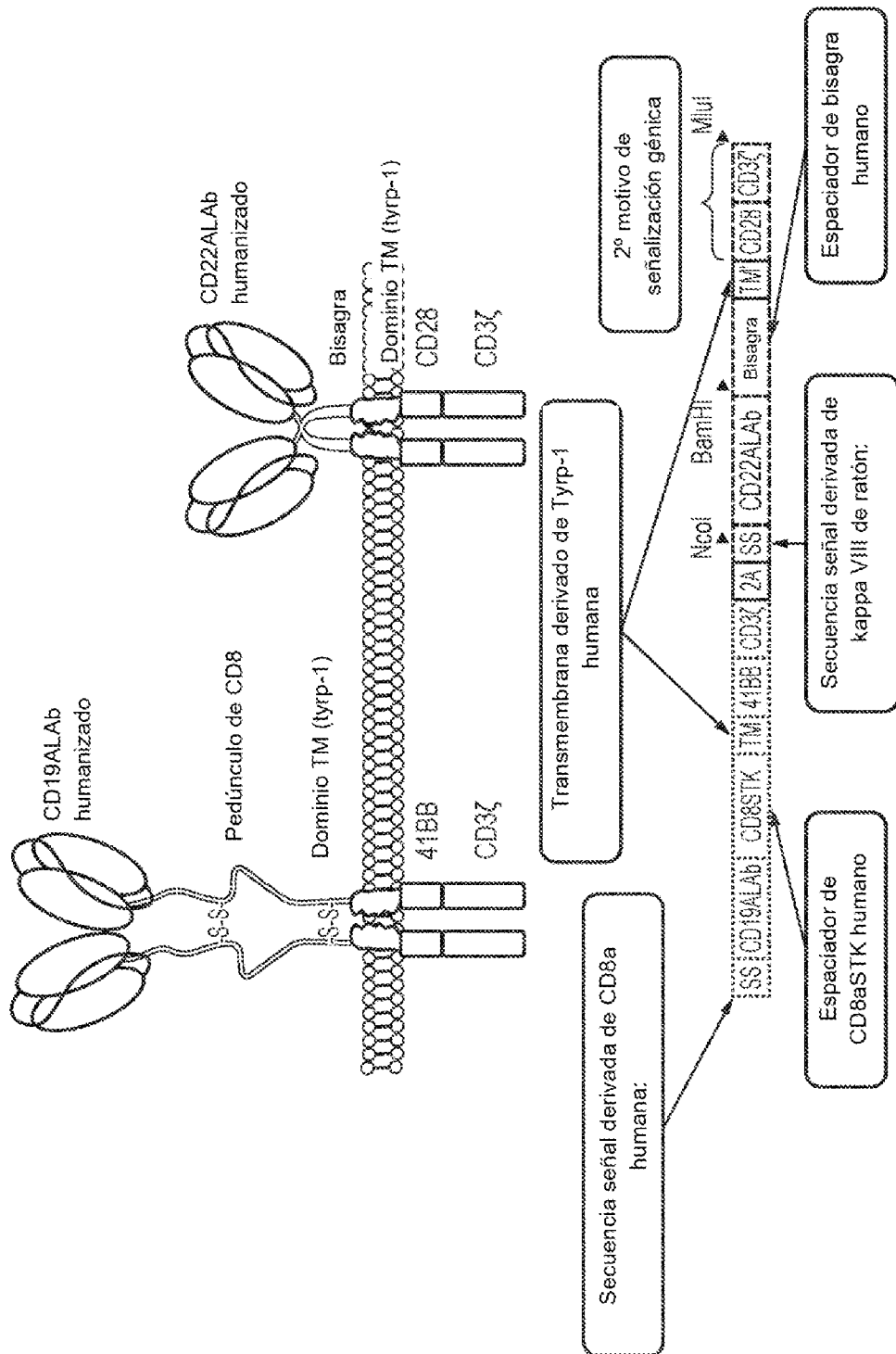


FIG. 13C

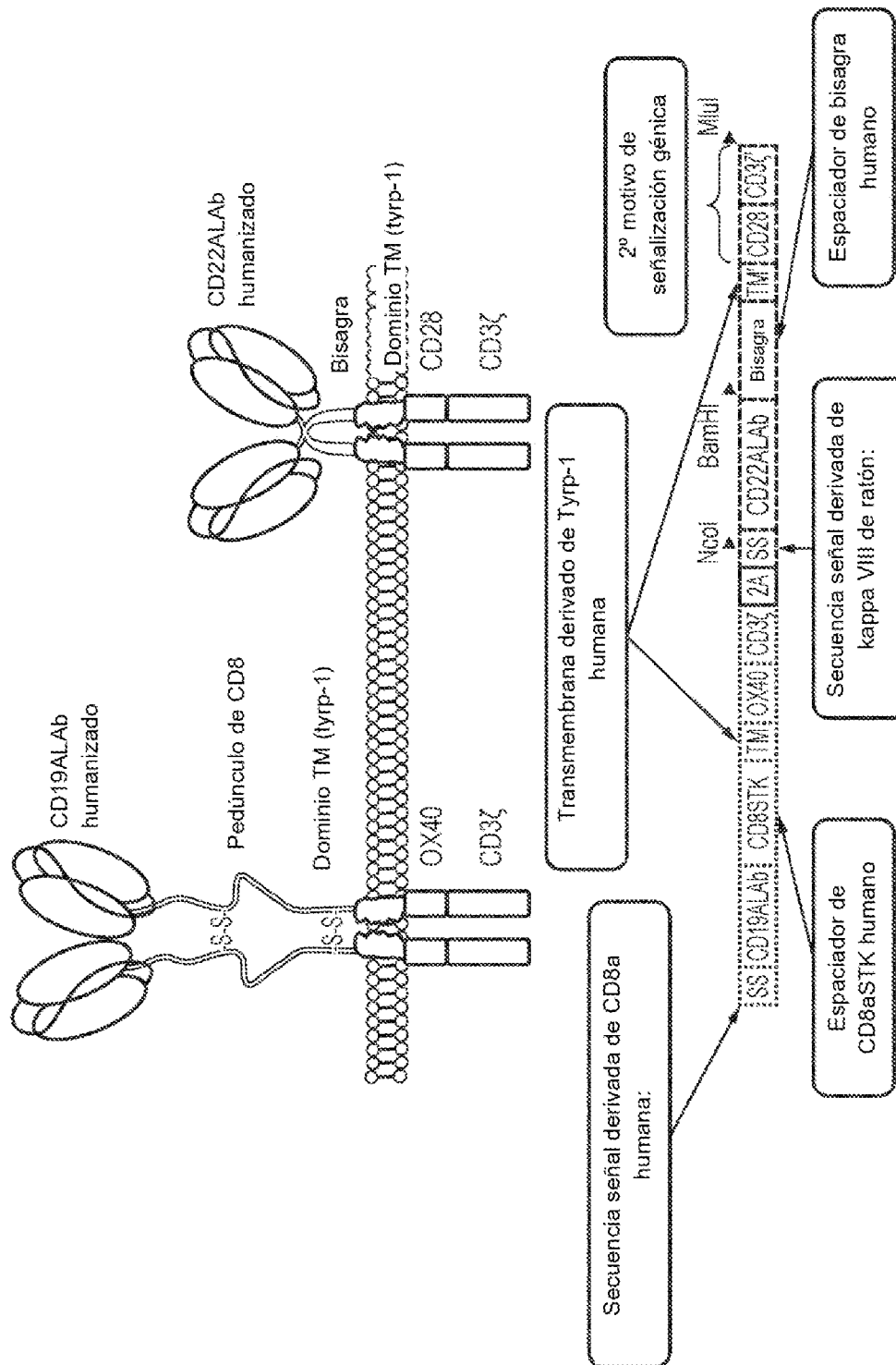


FIG. 13D

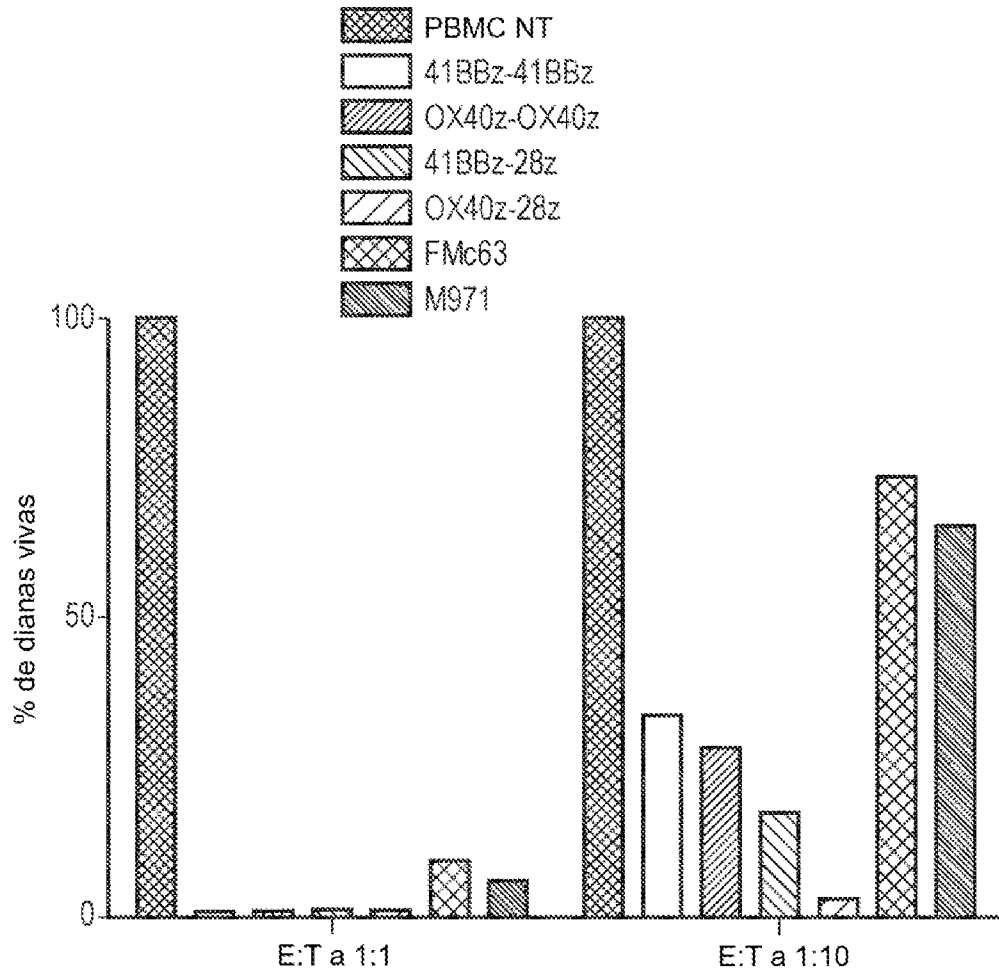


FIG. 14