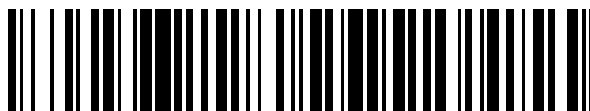


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 160**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2013** **PCT/US2013/025953**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13123061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2013** **E 13748596 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020** **EP 2814846**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos biespecíficos y usos terapéuticos de los mismos**

30 Prioridad:

13.02.2012 US 201261598216 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2020

73 Titular/es:

**SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL D/B/A
SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE
(100.0%)
1900 Ninth Avenue M/S C9S-10
Seattle, WA 98101, US**

72 Inventor/es:

JENSEN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 774 160 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígenos quiméricos biespecíficos y usos terapéuticos de los mismos

CAMPO DE INVENCIÓN

[0001] La invención se refiere a receptores de antígenos quiméricos y a células genéticamente modificadas usando los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Las inmunoterapias actuales están diseñadas para reconocer antígenos únicos en células cancerosas. Sin embargo, por ejemplo, las células cancerosas son inestables y algunas células pueden dejar de poseer el antígeno diana. Estas células, denominadas variantes de escape por pérdida de antígeno, escapan a la destrucción por la terapia y pueden continuar creciendo y extendiéndose. Casucci y Bondanza 2011, Journal of Cancer 2: 378-382 revelan la combinación de un control terapéutico con un CAR, donde la región de reconocimiento de antígeno es un scFv. Patel et al., 2000, Cancer Gene Therapy, 7: 1127-1134, revelan CARs biespecíficos (también llamados CIRs por respuesta inmunitaria quimérica en inglés) que llevan el scFv de, por ejemplo, TAG-72, CEA, HIVenv gp120, HIVenv gp41, con el objetivo de tratar variantes de escape. Los autores usan el gen suicida HSV-1 TK como "control terapéutico". La US20050113564 divulga CARs que comprenden un scFv anti-CD19. Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de terapias que eviten o minimicen fracasos terapéuticos en cáncer y otras enfermedades.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0003] La invención es como se describe en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0004] Se ilustran formas de realización ejemplares en las figuras referenciadas. Se pretende que las formas de realización y las figuras descritas aquí se consideren ilustrativas más que restrictivas.

La figura 1 representa una representación esquemática de un receptor de antígenos quimérico. ASTR es una región de reconocimiento específico de antígeno, L es un conector, ESD es un dominio separador extracelular, TM es un dominio transmembrana, CSD es un dominio coestimulador e ISD es un dominio de señalización intracelular.

La figura 2 representa (a) los componentes de un CAR anti-CD19xCD20 y (b) un ADNc completo empaquetado en un plásmido de transferencia del vector de lentivirus epHIV-7.

La figura 3 representa, conforme a una forma de realización de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico de una GMCSFRss de CAR biespecífico CD19scFv-Gly4SerIconector-CD20scFv-IgG4Bisagra-CD28tm-41BB-CD3zeta-T2A-EGFRt_epHIV7 (SEQ ID 1).

La figura 4 representa, conforme a una forma de realización de la presente invención, las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de una GMCSFRss de CAR biespecífico CD19scFv-Gly4SerIconector-CD20scFv-IgG4Bisagra-CD28tm-41BB-CD3zeta-T2A-EGFRt_epHIV7 (SEQ ID 3).

La figura 5 representa una construcción transgénica CD19scFv-Gly4SerIconector-CD20scFv-IgG4bisagra-CD28tm-CD28gg-CD3Zeta.

La figura 6 representa el desarrollo de una plataforma CyCR para sostener el crecimiento independiente de yc exógena, (a) diagramas esquemáticos de receptores de citocina de tipo salvaje frente a quiméricos. El receptor de citocina constitutivo IL-7Rα (CyCR7) consiste en la citocina IL-7 humana ligada a la cadena de longitud total de IL-7Rα humano mediante un conector (G4S)₂. El receptor de citocina constitutivo IL-2Rβ (CyCR2) es idéntico a CyCR7 excepto en que el dominio de señalización intracelular IL-7Rα está sustituido con el dominio citoplásmico IL-2/IL-15Rβ humano, (b) diagrama de la construcción de expresión CyCR-T2A-CD19t.

La figura 7 representa las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de un CAR de esqueleto que comprende la región bisagra de la IgG4, el dominio transmembrana de CD28, el dominio coestimulador de 4-1BB y el dominio citoplásmico de CD3zeta.

5 La figura 8 representa la secuencia de ácido nucleico de GMCSFRss-CD19scFv-Gly4Serconector-CD20scFv-hulgGBisagra/CH2/CH3-CD28tm/CD28cito-41BB-CD3zeta. GMCSFRss es la secuencia señal de GMCSFR.

La figura 9 representa las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de GMCSFRss-CD19scFv-Gly4Serconector-CD20scFv-hulgGBisagra/CH2/CH3-CD28tm/CD28cito-41BB-CD3zeta. GMCSFRss es la secuencia señal de GMCSFR.

10 La figura 10 representa, conforme a una forma de realización de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico de una forma de realización de la invención, específicamente el GMCSFRss-CD19scFv-Gly4Serconector-CD20scFv-CD8αBisagra-CD8αtm-41BB-CD3zeta-T2A-EGFRt. GMCSFRss es la secuencia señal de GMCSFR (SEQ ID 10).

15 La figura 11 representa, conforme a una forma de realización de la presente invención, las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de una forma de realización de la invención, específicamente GMCSFRss-CD19scFv-Gly4Serconector-CD20scFv-CD8αBisagra-CD8αtm-41BB-CD3zeta-T2A-EGFRt. GMCSFRss es la secuencia señal de GMCSFR (SEQ ID 12).

La figura 12 representa la secuencia de ácido nucleico de T2A-EGFRt.

La figura 13 representa las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de T2A-EGFRt.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 [0005] A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona experta en la materia a la que esta invención pertenece. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 3ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 5ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); y Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001) proporcionan a una persona experta en la materia una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

30 [0006] Una persona experta en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos. Para fines de la presente invención, los términos siguientes se definen a continuación.

35 [0007] La invención descrita aquí proporciona receptores de antígenos quiméricos. Los receptores de antígenos quiméricos son receptores diseñados que injertan una especificidad inmunitaria sobre una célula genéticamente modificada. Mediante el alojamiento de especificidades para múltiples antígenos en un único receptor de antígenos quimérico (CAR), pueden conseguirse varios beneficios, incluidos, entre otros, una reducción significativa en el esfuerzo en comparación con producir múltiples productos de células T por paciente.

[0008] La invención se define en las reivindicaciones.

Definiciones

Componentes de los receptores de antígenos quiméricos

40 [0009] "Región de reconocimiento específico de antígeno" (ASTR) como se utiliza en este caso se refiere a la región del CAR que reconoce antígenos específicos. Los CARs de la divulgación comprenden al menos dos regiones de reconocimiento que reconocen al menos dos antígenos diferentes. En una forma de realización de la divulgación, los CARs comprenden tres o más regiones de reconocimiento que reconocen al menos tres o más antígenos diferentes.

Las regiones de reconocimiento en el CAR son extracelulares. En algunas formas de realización de la divulgación, las regiones de reconocimiento específico de antígeno comprenden un anticuerpo o un equivalente funcional del mismo o un fragmento del mismo o un derivado del mismo y cada una de las regiones de reconocimiento reconocen un antígeno diferente. Las regiones de reconocimiento pueden comprender una cadena pesada de longitud total, fragmentos Fab, fragmentos Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios bivalentes o diacuerpos, cada uno de los cuales es específico para el antígeno diana. Hay, sin embargo, numerosas alternativas, tales como citocinas enlazadas (que conduce al reconocimiento de células que llevan el receptor de citocina), anticuerpos, dominios de unión a ligandos de receptores de origen natural, un ligando proteico/peptídico soluble para un receptor (por ejemplo, en una célula tumoral), péptidos y vacunas para provocar una respuesta inmunitaria, que pueden usarse cada uno en varias formas de realización de la invención. De hecho, casi cualquier molécula que se una a un antígeno dado con una alta afinidad se puede usar como una región de reconocimiento específico de antígeno, como será apreciado por las personas expertas en la materia.

[0010] "Receptor de antígenos quimérico" o "CAR" o "CARs" como se utiliza en este caso se refiere a receptores diseñados, que injertan una especificidad de antígeno sobre las células (por ejemplo, células T tales como células T vírgenes, células T de memoria central, células T de memoria efectora o combinaciones de las mismas). Los CARs se conocen también como receptores de células T artificiales, receptores de células T quiméricos o inmunorreceptores quiméricos. Los CARs de la divulgación comprenden al menos dos regiones de reconocimiento específico de antígeno, un dominio extracelular, un dominio transmembrana, uno o más dominios coestimuladores y un dominio de señalización intracelular. Las dos o más regiones de reconocimiento específico de antígeno reconocen al menos dos antígenos diferentes y pueden estar dispuestas en tándem y separadas por secuencias conectoras. El dominio separador extracelular es opcional. Los CARs de la invención son biespecíficos. Un CAR biespecífico es específico para dos antígenos diferentes.

[0011] "Dominio coestimulador" (CSD) como se utiliza en este caso se refiere a la porción del CAR que mejora la proliferación, la supervivencia y/o el desarrollo de las células de memoria. Los CARs de la divulgación pueden comprender uno o más dominios coestimuladores. Cada dominio coestimulador comprende el dominio coestimulador de cualquiera de uno o más de entre, por ejemplo, miembros de la superfamilia TNFR, CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 o combinaciones de los mismos. Otros dominios coestimuladores (por ejemplo, de otras proteínas) serán evidentes para las personas expertas en la materia.

[0012] "Dominio separador extracelular" (ESD) como se utiliza en este caso se refiere a la región hidrófila que está entre la región de reconocimiento específico de antígeno y el dominio transmembrana. Los CARs de la divulgación pueden o pueden no comprender un dominio separador extracelular. Los dominios separadores extracelulares incluyen, pero de forma no limitativa, fragmentos Fc de anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos, regiones bisagra de anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos, regiones CH2 de anticuerpos, regiones CH3 de anticuerpos, secuencias separadoras artificiales o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de dominios separadores extracelulares incluyen, pero de forma no limitativa, la bisagra de CD8α y espaciadores artificiales constituidos por polipéptidos que pueden ser tan pequeños como, por ejemplo, la Gly3 o los dominios CH1 y CH3 de las IgGs (tal como la IgG4 humana). En algunos CARs, el dominio separador extracelular es cualquiera de uno o más de entre (i) una bisagra, regiones CH2 y CH3 de la IgG4, (ii) una región bisagra de la IgG4, (iii) una bisagra y una CH2 de la IgG4, (iv) una región bisagra de CD8α, (v) una bisagra, regiones CH2 y CH3 de la IgG1, (vi) una región bisagra de la IgG1 o (vi) una bisagra y una región CH2 de la IgG1. Otros dominios separadores extracelulares serán evidentes para las personas expertas en la materia.

[0013] "Dominio de señalización intracelular" (ISD) o "dominio citoplásmico" como se utiliza en este caso se refieren a la porción del CAR que transduce la señal de función efectora y dirige la célula a ejecutar su función especializada. Los ejemplos de dominios que transducen la señal de función efectora incluyen, pero de forma no limitativa, la cadena ζ del complejo receptor de células T o cualquiera de sus homólogos (por ejemplo, la cadena η, las cadenas FcεR1γ y β, la cadena MB1 (Igα), la cadena B29 (Igβ), etc.), la cadena zeta de la CD3 humana, polipéptidos de CD3 (Δ, δ y ε), tirosina quinasas de la familia syk (Syk, ZAP 70, etc.), tirosina quinasas de la familia src (Lck, Fyn, Lyn, etc.) y otras moléculas implicadas en la transducción de células T, tales como CD2, CD5 y CD28. Otros dominios de señalización intracelulares serán evidentes para las personas expertas en la materia.

[0014] "Conector" (L) o "dominio conector" o "región conectora" como se utiliza en este caso se refieren a una región oligo- o polipeptídica de aproximadamente 1 a 100 aminoácidos de longitud, que enlaza cualquiera de los dominios/las regiones de un CAR de la divulgación. Los conectores pueden estar compuestos de residuos flexibles como la glicina y la serina de modo que los dominios proteicos adyacentes son libres de moverse el uno con respecto al otro. Se pueden

usar conectores más largos cuando es deseable asegurar que dos dominios adyacentes no interfieren estéricamente entre sí. Los conectores pueden ser escindibles o no escindibles. Los ejemplos de conectores escindibles incluyen conectores 2A (por ejemplo, T2A), conectores de tipo 2A o equivalentes funcionales de los mismos y combinaciones de los mismos. En algunos CARs, los conectores incluyen el conector de tipo 2A picornaviral, secuencias CHYSEL de teschovirus porcino (P2A), virus de *Thosea asigna* (T2A) o combinaciones, variantes y equivalentes funcionales de los mismos. En otros CARs, las secuencias conectoras pueden comprender el motivo Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly^(2A)-Pro^(2B), que resulta en la escisión entre la glicina 2A y la prolina 2B. Otros conectores serán evidentes para las personas expertas en la materia.

[0015] "Dominio transmembrana" (TMD) como se utiliza en este caso se refiere a la región del CAR que cruza la membrana plasmática. El dominio transmembrana es la región transmembrana de una proteína transmembrana (por ejemplo, proteínas transmembrana de tipo I), una secuencia hidrofóbica artificial o una combinación de las mismas. Otros dominios transmembrana serán evidentes para las personas expertas en la materia.

Otros

[0016] "Variantes de escape por pérdida de antígeno" como se utiliza en este caso se refiere a células que muestran una expresión reducida o una pérdida de expresión del antígeno diana, cuyos antígenos son reconocidos por los CARs de la invención.

[0017] "Enfermedades asociadas a células B" como se utiliza en este caso incluyen inmunodeficiencias de células B, enfermedades autoinmunes y/o proliferación celular excesiva/descontrolada asociada a células B (incluidos linfomas y/o leucemias). Los ejemplos de tales enfermedades, donde los CARs biespecíficos de la divulgación se pueden usar para métodos terapéuticos incluyen, pero de forma no limitativa, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes, artritis reumatoide (AR), artritis reactiva, esclerosis múltiple (EM), pénfigo vulgar, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad tiroidea autoinmune, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, leucemia linfoblástica aguda pre-B, lupus eritematoso sistémico, inmunodeficiencia variable común, leucemia linfocítica crónica, enfermedades asociadas a una deficiencia de IgA selectiva y/o deficiencia de subclases de IgG, linfomas de linaje B (linfoma de Hodgkin y/o linfoma no Hodgkin), inmunodeficiencia con timoma, hipogammaglobulinemia transitoria y/o síndrome de hiper IgM, al igual que enfermedades de células B mediadas por virus tales como la enfermedad linfoproliferativa mediada por EBV, e infecciones crónicas donde las células B participan en la patofisiología.

[0018] "Resultados beneficiosos" pueden incluir, pero no están limitados de ninguna manera a, reducir o aliviar la gravedad de la condición de enfermedad, prevenir que la condición de enfermedad empeore, curar la condición de enfermedad, prevenir el desarrollo de la condición de enfermedad, reducir las probabilidades de que un paciente desarrolle la condición de enfermedad y prolongar la vida o la esperanza de vida de un paciente.

[0019] "Cáncer" y "canceroso" describen o se refieren a la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero de forma no limitativa, linfomas de células B (linfomas de Hodgkin y/o linfomas no Hodgkin), tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pulmonar, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma, cáncer del cuello y de la cabeza, cáncer cerebral y cáncer de próstata, incluidos, pero de forma no limitativa, cáncer de próstata dependiente de andrógenos y cáncer de próstata independiente de andrógenos.

[0020] "Coexpresar" como se utiliza en este caso se refiere a la expresión simultánea de dos o más genes. Los genes pueden ser ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, una proteína única o una proteína quimérica como una única cadena polipeptídica. Por ejemplo, los CARs de la invención se coexpresan con un control terapéutico (factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt)), donde el CAR está codificado por una primera cadena polinucleotídica y el control terapéutico está codificado por una segunda cadena polinucleotídica. La primera y la segunda cadena polinucleotídica están enlazadas por una secuencia de ácido nucleico que codifica un conector escindible. En formas de realización de la divulgación, los polinucleótidos que codifican el CAR y el sistema de control terapéutico se pueden enlazar mediante secuencias IRES. Alternativamente, un CAR y un control terapéutico pueden estar codificados por dos polinucleótidos diferentes que no están enlazados mediante un conector, sino que, en cambio, están codificados por, por ejemplo, dos vectores diferentes. Además, los CARs pueden estar coexpresados con un control terapéutico y CCR, un control terapéutico y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) o un control terapéutico y CCR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante). Un CAR, control terapéutico y CCR pueden estar coexpresados y codificados por las secuencias

- polinucleotídicas primera, segunda y tercera, respectivamente, donde las secuencias polinucleotídicas primera, segunda y tercera están enlazadas mediante secuencias IRES o secuencias que codifican conectores escindibles. Alternativamente, las secuencias pueden no estar enlazadas mediante conectores sino, en cambio, codificadas mediante, por ejemplo, vectores separados. Un CAR, control terapéutico y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) pueden estar coexpresados y codificados por las secuencias polinucleotídicas primera, segunda y cuarta, respectivamente, donde las secuencias polinucleotídicas primera, segunda y cuarta están enlazadas mediante secuencias IRES o mediante secuencias que codifican conectores escindibles. Alternativamente, las secuencias pueden no estar enlazadas mediante conectores sino, en cambio, codificadas mediante, por ejemplo, vectores separados. Un CAR, control terapéutico, CCR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) pueden estar coexpresados y codificados por las secuencias polinucleotídicas primera, segunda, tercera y cuarta, respectivamente, donde las secuencias polinucleotídicas primera, segunda, tercera y cuarta están enlazadas mediante secuencias IRES o secuencias que codifican conectores escindibles. Alternativamente, las secuencias pueden no estar enlazadas mediante conectores sino, en cambio, codificadas mediante, por ejemplo, vectores separados. Si las secuencias anteriormente mencionadas están codificadas por vectores separados, estos vectores se pueden transfectar simultánea o consecutivamente.
- [0021] "Condiciones", "condiciones de enfermedad", "enfermedades" y "estado patológico" como se utiliza en este caso incluyen estados fisiológicos donde las células enfermas pueden ser reconocidas con CARs de la divulgación, expresando, por ejemplo, anticuerpos contra los antígenos específicos en las células enfermas. Los ejemplos de antígenos que pueden ser reconocidos incluyen, pero de forma no limitativa, antígenos expresados en células B (tales como CD19 y CD20), antígenos expresados en carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemia, tumores de células germinales, blastomas, antígenos expresados en varias células inmunitarias y antígenos expresados en células asociadas a varias enfermedades hematológicas, enfermedades autoinmunes y/o enfermedades inflamatorias.
- [0022] "Enfermedad reconocida por células modificadas genéticamente" como se utiliza en este caso abarca el reconocimiento de cualquier célula implicada de cualquier manera en cualquier enfermedad por las células modificadas genéticamente de la divulgación, con independencia de si las células modificadas genéticamente reconocen células enfermas o células sanas para efectuar un resultado terapéuticamente beneficioso. Las células modificadas genéticamente incluyen, pero de forma no limitativa, células T, células NK, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias pluripotentes o células madre embrionarias modificadas genéticamente. Las células modificadas genéticamente expresan CARs, CARs que pueden reconocer cualquiera de los antígenos expresados en la superficie de las células diana. Los ejemplos de antígenos que pueden ser reconocidos incluyen, pero de forma no limitativa, antígenos expresados en células B; antígenos expresados en carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemia, tumores de células germinales y blastomas; antígenos expresados en varias células inmunitarias; y antígenos expresados en células asociadas a varias enfermedades hematológicas, enfermedades autoinmunes y/o enfermedades inflamatorias. Otros antígenos que pueden ser reconocidos serán evidentes para las personas expertas en la materia.
- [0023] "Función efectora" se refiere a la función especializada de una célula diferenciada. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o una actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas.
- [0024] "Células modificadas genéticamente", "células redirigidas", "células genéticamente modificadas" o "células modificadas" como se utiliza en este caso se refieren a células que expresan CARs.
- [0025] "Célula inmunitaria" como se utiliza en este caso se refiere a las células del sistema inmunitario de mamíferos, incluidas, pero de forma no limitativa, células presentadoras de antígenos, células B, basófilos, células T citotóxicas, células dendríticas, eosinófilos, granulocitos, células T auxiliares, leucocitos, linfocitos, macrófagos, mastocitos, células de memoria, monocitos, células asesinas naturales, neutrófilos, fagocitos, células plasmáticas y células T.
- [0026] "Respuesta inmunitaria" como se utiliza en este caso se refiere a inmunidades incluidas, pero de forma no limitativa, inmunidad innata, inmunidad humoral, inmunidad celular, inmunidad, respuesta inflamatoria, inmunidad (adaptativa) adquirida, autoinmunidad y/o inmunidad hiperactiva.
- [0027] "Mamífero" como se utiliza en este caso se refiere a cualquier miembro de la clase *Mammalia*, incluidos, sin limitación, seres humanos y primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de mono; animales de granja tales como ganado bovino, oveja, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluidos roedores tales como ratones, ratas y conejillos de Indias, y similares. El término no indica una edad o sexo particular. Así, sujetos adultos y recién nacidos, al igual que fetos, ya sean machos o hembras, se destinan estar incluídos en el alcance de este término.

[0028] "Polinucleótido" como se utiliza en este caso incluye, pero no está limitado a, ADN, ARN, ADNc (ADN complementario), ARNm (ARN mensajero), ARNr (ARN ribosómico), ARNh_c (ARN horquillado corto), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNnop (ARN nucleolar pequeño), miARN (microARN), ADN genómico, ADN sintético, ARN sintético y/o ARNt.

5 [0029] "ADN desnudo" como se utiliza en este caso se refiere a ADN que codifica un CAR clonado en un vector de expresión adecuado en una orientación apropiada para la expresión. Vectores virales que se pueden usar incluyen, pero no están limitados a, vectores lentivirales SIN, vectores retrovirales, vectores de virus espumoso, vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores híbridos y/o transposones plasmídicos (por ejemplo, el sistema de transposón bella durmiente) o sistemas vectores basados en integrasas. Otros vectores que se pueden usar en relación con formas de
10 realización alternativas de la invención serán evidentes para las personas expertas en la materia.

[0030] "Fragmento variable monocatenario", "fragmentos variables de anticuerpos monocatenarios" o anticuerpos "scFv" como se utilizan en este caso se refieren a formas de anticuerpos que comprenden las regiones variables solo de las cadenas ligeras y pesadas, conectadas por un péptido conector.

15 [0031] "Célula diana" como se utiliza en este caso se refiere a células que están implicadas en una enfermedad y pueden ser reconocidas por células modificadas genéticamente (incluidas, pero de forma no limitativa, células T modificadas genéticamente, células NK, células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes y células madre embrionarias). Otras células dianas serán evidentes para las personas expertas en la materia.

20 [0032] Los términos "célula T" y "linfocito T" son intercambiables y se usan como sinónimos aquí. Los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, células T vírgenes, células T de memoria central, células T de memoria efectora o combinaciones de las mismas.

25 [0033] "Agentes terapéuticos" como se utiliza en este caso se refiere a agentes que se utilizan para, por ejemplo, tratar, inhibir, prevenir, mitigar los efectos de, reducir la gravedad de, reducir la probabilidad de desarrollar, ralentizar la progresión de y/o curar una enfermedad. Las enfermedades reconocidas por los agentes terapéuticos incluyen, pero de forma no limitativa, carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemia, tumores de células germinales, blastomas, antígenos expresados en varias células inmunitarias y antígenos expresados en células asociadas a varias enfermedades hematológicas, enfermedades autoinmunes y/o enfermedades inflamatorias.

30 [0034] "Controles terapéuticos" como se utiliza en este caso se refiere a agentes que regulan proliferación celular, facilitan la selección celular (por ejemplo, la selección de células que expresan los receptores de antígenos quiméricos de la invención), facilitan el seguimiento de las células o una combinación de los mismos. La regulación de la proliferación celular puede comprender opcionalmente regular por aumento la proliferación celular para promover la propagación celular. La regulación de la proliferación celular puede comprender opcionalmente regular por disminución la proliferación celular para reducir o inhibir la propagación celular. Los agentes que sirven como controles terapéuticos pueden promover opcionalmente el enriquecimiento de células que expresan los receptores de antígenos quiméricos biespecíficos que pueden resultar en una ventaja terapéutica.

35 [0035] "Transducción" como se utiliza en este caso se refiere a la introducción de un ácido nucleico extraño en una célula usando un vector viral.

40 [0036] "Transfección" como se utiliza en este caso se refiere a la introducción de un ácido nucleico extraño en una célula usando tecnología del ADN recombinante. El término "transformación" significa la introducción de un gen, una secuencia de ADN o ARN "extraña" (es decir, extrínseca o extracelular) en una célula huésped, de modo que la célula huésped expresará el gen o la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, tal como una proteína o enzima codificada por el gen o la secuencia introducida. El gen o la secuencia introducida también se puede denominar un gen o una secuencia "clonada" o "extraña", puede incluir secuencias de control o reguladoras, tales como secuencias de inicio, de parada, promotoras, señal, de secreción u otras usadas por la maquinaria genética de una célula. El gen o la secuencia puede incluir secuencias no funcionales o secuencias sin función conocida. Una célula huésped que
45 recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha "transformado" y es un "transformante" o un "clon." El ADN o el ARN introducido en una célula huésped puede venir de cualquier fuente, incluidas células del mismo género o especie que la célula huésped o células de un género o especie diferente.

[0037] "Tratamiento" y "tratar", como se utiliza en este caso, se refieren tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la condición patológica

reconocida, prevenir la condición patológica, perseguir u obtener resultados beneficiosos o reducir las probabilidades del individuo que está desarrollando la condición, incluso si el tratamiento es, en última instancia, fallido. Aquellos que necesitan un tratamiento incluyen aquellos ya con la condición al igual que aquellos propensos a tener la condición o aquellos en los que debe prevenirse la condición.

5 [0038] "Tumor", como se utiliza en este caso, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásica, ya sea maligna o benigna, y todas las células y los tejidos precancerosos y cancerosos.

[0039] "Vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" como se utiliza en este caso se refieren al vehículo mediante el que una secuencia polinucleotídica (por ejemplo, un gen extraño) se puede introducir en una célula huésped, para transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia
10 introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etc.

Descripción de la invención

Receptores de antígenos quiméricos

[0040] Aunque no se desea estar limitado por ninguna de las premisas, se cree que los receptores de antígenos quiméricos biespecíficos de la presente invención pueden superar fracasos terapéuticos convencionales debido a, por
15 ejemplo, el brote de variantes de escape por pérdida de antígeno que pueden surgir en el curso de varias terapias cuando se reconoce un único antígeno. Por consiguiente, la invención se dirige a secuencias de aminoácidos de CARs biespecíficos referidas por las SEQ N.^{os} 3 y 12, secuencias de ácido nucleico que codifican a las mismas, vectores y virus que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico y células modificadas genéticamente que comprenden dichos CARs biespecíficos (células redirigidas).

[0041] Los CARs de la invención reconocen CD19 y CD20. Los CARs biespecíficos se coexpresan con un control terapéutico; el receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt). Los polinucleótidos que codifican el CAR y el EGFRt están enlazados mediante secuencias polinucleotídicas que codifican conectores escindibles. Los CARs de la invención se construyen de modo que se puedan expresar en células, que a su vez proliferan en respuesta a la presencia de al menos una molécula que interactúa con al menos una región de reconocimiento específico de antígeno,
20 por ejemplo, un antígeno.

[0042] Otros aspectos/formas de realización de la invención se describen en las reivindicaciones.

[0043] En algunas divulgaciones, los controles terapéuticos comprenden cualquiera de uno o más de entre receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt), timidina quinasa, citosina desaminasa, nitrorreductasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, caspasa 8 humana, caspasa 9 humana, purina nucleósido fosforilasa, linamarasa/linamarina/glucosa oxidasa, desoxirribonucleósidos quinasa, peroxidasa de rábano (HRP)/ácido indol-3-
30 acético (IAA), gamma-glutamylcisteína sintetasa, CD20/alfaCD20, quimera de CD34/timidina quinasa, caspasa-2 dependiente de dox, timidina quinasa mutante (HSV-TKSR39) o sistema AP1903/Fas. En una divulgación, los CARs están enlazados a EGFRt mediante un conector escindible o secuencias IRES. En la invención, un CAR biespecífico está enlazado a EGFRt mediante un conector escindible.

[0044] Los CARs descritos aquí se pueden sintetizar como cadenas polipeptídicas únicas y pueden comprender al menos dos regiones de reconocimiento específico de antígeno, un dominio separador extracelular, un dominio transmembrana, uno o más dominios coestimuladores y un dominio de señalización intracelular. En este CAR, las regiones de reconocimiento específico de antígeno están en el extremo N-terminal, dispuestas en tándem, y están separadas por un péptido conector. La región de reconocimiento específico de antígeno está enlazada a un dominio separador extracelular que está enlazado al dominio transmembrana. El dominio transmembrana está enlazado al dominio coestimulador. El dominio coestimulador está enlazado al dominio de señalización intracelular que está en el extremo C-terminal. Si se usa más de un dominio coestimulador, los múltiples dominios coestimuladores pueden estar dispuestos en tándem con el dominio transmembrana en su extremo N-terminal y el dominio de señalización intracelular en su extremo C-terminal. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos pueden comprender además una
40 secuencia señal N-terminal que dirige el CAR a la superficie celular como una proteína transmembrana de tipo I. La región de reconocimiento específico de antígeno puede ser de orientación extracelular y el dominio de señalización intracelular puede ser citoplásmico.

[0045] La figura 1 muestra una representación esquemática de un receptor de antígenos quimérico.

[0046] Un dominio separador extracelular en el CAR es opcional. En tal CAR, las regiones de reconocimiento específico de antígeno están en el extremo N-terminal, dispuestas en tándem, y separadas por un péptido conector. La región de reconocimiento específico de antígeno se puede enlazar al dominio transmembrana. El dominio transmembrana se puede enlazar al dominio coestimulador. El dominio coestimulador se puede enlazar al dominio de señalización intracelular, que está en el extremo C-terminal. Si se usa más de un dominio coestimulador, los múltiples dominios coestimuladores pueden estar dispuestos en tándem con el dominio transmembrana en su extremo N-terminal y el dominio de señalización intracelular en su extremo C-terminal. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos pueden comprender además una secuencia señal N-terminal que dirija el CAR a la superficie celular como una proteína transmembrana de tipo I. La región de reconocimiento específico de antígeno puede ser de orientación extracelular y el dominio de señalización intracelular puede ser citoplásmico.

Regiones de reconocimiento específico de antígeno de receptores de antígenos quiméricos

[0047] Los CARs de la divulgación pueden reconocer varios (tal como dos o más, tres o más) antígenos diferentes. En la invención, el CAR es un CAR biespecífico y reconoce CD19 y CD20. Como se ha descrito anteriormente, las regiones de reconocimiento específico de antígeno de un CAR de la divulgación pueden estar dispuestas en tándem y pueden estar separadas por péptidos conectores. Los antígenos reconocidos por un CAR pueden ser antígenos en una única célula enferma (tal como una célula B cancerosa) o antígenos que se expresan en células separadas que contribuye cada uno a la enfermedad. Los antígenos reconocidos son antígenos que están o directa o indirectamente implicados en una enfermedad.

[0048] En un CAR biespecífico, al menos dos anticuerpos específicos de antígeno diferentes o fragmentos de los mismos o derivados de los mismos se pueden clonar en la región de reconocimiento específico de antígeno. Los anticuerpos pueden ser específicos para cualquier, pero al menos dos, antígenos de elección distintos. El anticuerpo específico para el antígeno puede ser el fragmento Fab del anticuerpo o el fragmento variable monocatenario (scFv) del anticuerpo.

[0049] Por ejemplo, la figura 2 representa un CAR específico para CD19 y CD20. Usando métodos bien conocidos por una persona experta en la materia, los scFvs específicos para múltiples, pero al menos dos, antígenos diferentes se pueden clonar aguas arriba (es decir, hacia el extremo N-terminal) de los dominios IgG4-CD28-zeta siempre y cuando los antígenos diana se expresen en células que puedan ser reconocidas por las células modificadas genéticamente descritas a continuación. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. (Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Current Protocols in Molecular Biology. Volúmenes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)], Cell Biology: A Laboratory Handbook. Volúmenes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)], Current Protocols in Immunology. Volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)], Oligonucleotide Synthesis. (M. J. Gait ed. 1984), Nucleic Acid Hybridization [B. D. Hames y S. J. Higgins eds. (1985)], Transcription And Translation [B. D. Hames y S. J. Higgins, eds. (1984)], Animal Cell Culture [R. I. Freshney, ed. (1986)], Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)], Practical Guide To Molecular Cloning B. Perbal (1984), Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, eds., 1991), Annual Review of Immunology, al igual que monografías en revistas tales como Advances in Immunology).

[0050] En una divulgación, cada región de reconocimiento específico de antígeno comprende la cadena pesada de IgG en toda su longitud (específica para el antígeno diana) que tiene los dominios de Ig (Fc) V_H, CH1, bisagra y los CH2 y CH3, si el dominio V_H solo es suficiente para conferir especificidad de antígeno ("anticuerpos de dominio único"). La cadena pesada de IgG de longitud total se puede enlazar al dominio coestimulador y el dominio de señalización intracelular mediante el dominio transmembrana apropiado. Si ambos, los dominios V_H y V_L, son necesarios para generar una región de reconocimiento específico de antígeno completamente activa, el CAR que contiene V_H y la cadena ligera lambda en toda su longitud (IgL) se introducen ambos en las células para generar una región de reconocimiento específico de antígeno activa. En una divulgación, un dominio separador extracelular se puede enlazar entre el dominio de unión específico de antígeno y el dominio transmembrana. Las células incluyen, pero de forma no limitativa, linfocitos T (células T), células asesinas naturales, células madre hematopoyéticas y/o células madre embrionarias/pluripotentes inducidas capaces de dar lugar a una progenie terapéuticamente pertinente.

[0051] En otra divulgación, cada región de reconocimiento específico de antígeno del CAR comprende al menos dos fragmentos variables de anticuerpo monocatenarios (scFv), cada uno específico de un antígeno diana diferente. Se han desarrollado scFvs, donde el extremo C-terminal de un dominio variable (V_H o V_L) está ligado al extremo N-terminal del

otro (V_L o V_H , respectivamente) mediante un conector polipeptídico, sin alterar significativamente la unión de antígenos o la especificidad de la unión. (Chaudhary et al., A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. 1990 Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 9491; Bedzyk et al. Immunological and structural characterization of a high affinity anti-fluorescein single-chain antibody. 1990 J. Biol. Chem., 265: 18615). El conector conecta el extremo N-terminal del V_H con el extremo C-terminal de V_L o el extremo C-terminal de V_H con el extremo N-terminal de V_L . Estos scFvs carecen de las regiones constantes (Fc) presentes en las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo nativo. Los scFvs, específicos para al menos dos antígenos diferentes, están dispuestos en tándem y enlazados al dominio coestimulador y el dominio de señalización intracelular mediante un dominio transmembrana. En una divulgación, un dominio separador extracelular se puede enlazar entre la región de unión específica de antígeno y el dominio transmembrana.

[0052] En otra divulgación, cada fragmento scFv puede estar fusionado con todos o una porción de los dominios constantes de la cadena pesada. La región de reconocimiento específico de antígeno resultante, específica para al menos dos antígenos diferentes, se une al dominio coestimulador y el dominio de señalización intracelular mediante un dominio transmembrana. En una divulgación, un dominio separador extracelular se puede enlazar entre el dominio de unión específico de antígeno y el dominio transmembrana.

[0053] En otra divulgación, cada región de reconocimiento específico de antígeno del CAR comprende un fragmento variable monocatenario divalente (o bivalente) (di-scFvs, bi-scFvs). En CARs que comprenden di-scFvs, dos scFvs específicos para cada antígeno están enlazados produciendo una cadena peptídica única con dos regiones V_H y dos V_L , produciendo un scFv en tándem. (Xiong, Cheng-Yi; Natarajan, A; Shi, XB; Denardo, GL; Denardo, SJ (2006). "Development of tumor targeting anti-MUC-1 multimer: effects of di-scFv unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding". Protein Engineering Design and Selection 19 (8): 359-367; Kufer, Peter; Lutterbüse, Ralf; Baeuerle, Patrick A. (2004). "A revival of bispecific antibodies". Trends in Biotechnology 22 (5): 238-244). Los CARs que comprenden al menos dos regiones de reconocimiento específico de antígeno expresarían dos scFvs específicos para cada uno de los dos antígenos. La región de reconocimiento específico de antígeno resultante, específica para al menos dos antígenos diferentes, se une al dominio coestimulador y el dominio de señalización intracelular mediante un dominio transmembrana. En una divulgación, un dominio separador extracelular se puede enlazar entre el dominio de unión específica de antígeno y el dominio transmembrana.

[0054] En una divulgación adicional, cada región de reconocimiento específico de antígeno del CAR comprende un diacuerpo. En un diacuerpo, los scFvs se crean con péptidos conectores que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen juntas, llevando a los scFvs a dimerizar. Conectores todavía más cortos (uno o dos aminoácidos) conducen a la formación de trímeros, los denominados triacuerpos o tricuerpos. También pueden usarse tetracuerpos.

[0055] Para crear los CARs de la presente divulgación, dos o más regiones de reconocimiento específico de antígeno individuales se conectan entre sí, o de manera covalente o de manera no covalente, en una única molécula de proteína. Un conector oligo- o polipeptídico, una región bisagra de Fc o bisagra de membrana se pueden usar para conectar estos dominios entre sí. Los CARs pueden comprender dos o más de las diferentes regiones de reconocimiento específico de antígeno conectadas en diferentes combinaciones. Por ejemplo, dos o más regiones de reconocimiento específico de antígeno que contengan secuencias de inmunoglobulina (por ejemplo, scFvs y/o anticuerpos de dominio único) se pueden enlazar entre sí.

Dianas de regiones de reconocimiento específico de antígeno de receptores de antígenos quiméricos

[0056] En algunas divulgaciones, la región de reconocimiento específico de antígeno del CAR (por ejemplo, CAR biespecífico) reconoce antígenos específicos para cáncer, enfermedad inflamatoria, trastornos neuronales, diabetes, enfermedad cardiovascular, enfermedades infecciosas o una combinación de las mismas. Los ejemplos de antígenos que pueden ser reconocidos por los CARs (por ejemplo, CARs biespecíficos) incluyen, pero de forma no limitativa, antígenos expresados en células B, antígenos expresados en carcinomas, sarcomas, linfomas, leucemia, tumores de células germinales, blastomas, antígenos expresados en varias células inmunitarias y antígenos expresados en células asociadas a varias enfermedades hematológicas, enfermedades autoinmunes y/o enfermedades inflamatorias. Los CARs de la invención, que son específicos para CD19 y CD20, pueden ser capaces de redirigir la función efectora de las células que los expresan a cualquiera de ambos antígenos diana. Esta característica de la construcción puede superar el problema de las variantes de escape por pérdida de antígeno durante el reconocimiento, por ejemplo, de neoplasias del linaje de células B genéticamente inestables usando la especificidad de antígeno único.

[0057] Los antígenos específicos para cáncer que pueden ser reconocidos por los CARs (por ejemplo, CARs biespecíficos) de la divulgación incluyen, pero de forma no limitativa, cualquiera de uno o más de entre 4-1BB, 5T4, antígeno de adenocarcinoma, alfa-fetoproteína, BAFF, célula de linfoma B, antígeno C242, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD152, CD19, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (receptor de IgE), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNTO888, CTLA-4, DR5, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, dominio B extra de fibronectina, receptor de folato 1, gangliósido GD3, GD2, glicoproteína 75, GPNMB, HER2/neu, HGF, quinasa del receptor de factor de difusión humano, receptor de IGF-1, IGF-I IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, receptor de factor de crecimiento insulínico I, integrina $\alpha 5 \beta 1$, integrina $\alpha v \beta 3$, MORAb-009, MS4A1, MUC1, mucina CanAg, ácido N-glicolilneuramínico, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, fosfatidilserina, células de carcinoma prostático, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, tenascina C, TGF beta 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, antígeno tumoral CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2 o vimentina. Otros antígenos específicos para cáncer serán evidentes para las personas expertas en la materia. Los ejemplos de CARs que reconocen los antígenos anteriores incluyen, pero de forma no limitativa, CARs biespecíficos, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CCR, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) o CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CDR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante).

[0058] En algunas divulgaciones, los receptores de antígenos quiméricos biespecíficos reconocen y se unen a al menos dos antígenos diferentes. Los ejemplos de parejas de al menos dos antígenos que se unen a CARs biespecíficos incluyen, pero de forma no limitativa, CD19 y CD20, CD19 y CD22, CD20 y L1-CAM, L1-CAM y GD2, EGFR y L1-CAM, EGFR y C-MET, EGFR y HER2, C-MET y HER2 y EGFR y ROR1. Otras parejas de antígenos específicos para cáncer serán evidentes para las personas expertas en la materia. En la invención, el receptor de antígenos quimérico biespecífico reconoce CD19 y CD20. Los ejemplos de CARs que reconocen los antígenos anteriores incluyen, pero de forma no limitativa, CARs biespecíficos, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CCR, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) o CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CDR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante). Aquellos de la invención se denotan por las reivindicaciones.

[0059] Los antígenos específicos para enfermedades inflamatorias que pueden ser reconocidos por CARs de la divulgación incluyen, pero de forma no limitativa, cualquiera de uno o más de entre AOC3 (VAP-1), CAM-3001, CCL11 (eotaxina-1), CD125, CD147 (basigina), CD154 (CD40L), CD2, CD20, CD23 (receptor de IgE), CD25 (cadena α de receptor de IL-2), CD3, CD4, CD5, IFN- α , IFN- γ , IgE, región Fc de IgE, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-22, IL-4, IL-5, IL-6, receptor de IL-6, integrina $\alpha 4$, integrina $\alpha 4 \beta 7$, *Lama glama*, LFA-1 (CD11a), MEDI-528, miostatina, OX-40, rhuMab $\beta 7$, escleroscina, SOST, TGF beta 1, TNF- α o VEGF-A. Otros antígenos específicos para enfermedades inflamatorias serán evidentes para las personas expertas en la materia. Los ejemplos de CARs que reconocen los antígenos anteriores incluyen, pero de forma no limitativa, CARs biespecíficos, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CCR, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) o CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CDR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante).

[0060] Los antígenos específicos para trastornos neuronales que pueden ser reconocidos por CARs de la divulgación incluyen, pero de forma no limitativa, cualquiera de una o más de entre beta-amiloide o MABT5102A. Otros antígenos específicos para trastornos neuronales serán evidentes para las personas expertas en la materia. Los ejemplos de CARs que reconocen los antígenos anteriores incluyen, pero de forma no limitativa, CARs biespecíficos, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CCR, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) o CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CDR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante).

[0061] Los antígenos específicos para diabetes que pueden ser reconocidos por CARs de la divulgación incluyen, pero de forma no limitativa, cualquiera de una o más de entre L-1 β o CD3. Otros antígenos específicos para diabetes u otros trastornos metabólicos serán evidentes para las personas expertas en la materia. Los ejemplos de CARs que reconocen los antígenos anteriores incluyen, pero de forma no limitativa, CARs biespecíficos, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CCR, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) o CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CDR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante).

[0062] Los antígenos específicos para enfermedades cardiovasculares que pueden ser reconocidos por CARs de la divulgación incluyen, pero de forma no limitativa, cualquiera de una o más de entre C5, miosina cardíaca, CD41 (integrina alfa-IIb), fibrina II, cadena beta, ITGB2 (CD18) y esfingosina-1-fosfato. Otros antígenos específicos para enfermedades cardiovasculares serán evidentes para las personas expertas en la materia. Los ejemplos de CARs que

reconocen los antígenos anteriores incluyen, pero de forma no limitativa, CARs biespecíficos, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CCR, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) o CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CDR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante).

- 5 [0063] Los antígenos específicos para enfermedades infecciosas que pueden ser reconocidos por CARs de la divulgación incluyen, pero de forma no limitativa, cualquiera de una o más de entre toxina del carbunco, CCR5, CD4, factor de aglutinación A, citomegalovirus, glicoproteína B del citomegalovirus, endotoxina, *Escherichia coli*, antígeno de superficie de la hepatitis B, virus de la hepatitis B, HIV-1, Hsp90, hemaglutinina A de la gripe, ácido lipoteicoico, *Pseudomonas aeruginosa*, glicoproteína del virus de la rabia, virus respiratorio sincitial y TNF- α . Otros antígenos
- 10 específicos para enfermedades infecciosas serán evidentes para las personas expertas en la materia. Los ejemplos de CARs que reconocen los antígenos anteriores incluyen, pero de forma no limitativa, CARs biespecíficos, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CCR, CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) o CARs biespecíficos coexpresados con EGFRt y CDR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante).
- 15 [0064] Los ejemplos adicionales de antígenos diana incluyen, pero de forma no limitativa, proteínas de superficie encontradas en células cancerosas de una forma específica o amplificada (por ejemplo, el receptor de IL-14, CD19, CD20 y CD40 para el linfoma de células B, los antígenos Lewis Y y CEA para una variedad de carcinomas, el antígeno Tag72 para cáncer de mama y colorrectal, EGF-R para cáncer pulmonar, proteína de unión a folato y la proteína HER-2 que está a menudo amplificada en los carcinomas de mama y ováricos humanos), o proteínas virales (por ejemplo,
- 20 proteínas de la envoltura gp120 y gp41 del VIH, proteínas de la envoltura de los virus de la hepatitis B y C, la glicoproteína B y otras glicoproteínas de la envoltura del citomegalovirus humano, las proteínas de la envoltura de oncovirus tales como el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi). Otras dianas potenciales de los CARs incluyen CD4, donde el ligando es la glicoproteína de la envoltura gp120 del VIH, y otros receptores virales, por ejemplo, ICAM, que es el receptor para el rinovirus humano, y la molécula receptora relacionada para el poliovirus.
- 25 [0065] Las dianas adicionales de los CARs incluyen antígenos implicados en enfermedades asociadas a las células B. Aún más dianas de los CARs serán evidentes para las personas expertas en la materia.

Dominios coestimuladores de receptores de antígenos quiméricos

- [0066] Los CARs de la divulgación también pueden comprender un dominio coestimulador. Este dominio puede mejorar la proliferación celular, la supervivencia celular y el desarrollo de células de memoria. Los CARs pueden comprender
- 30 uno o más dominios coestimuladores. Cada dominio coestimulador comprende el dominio coestimulador de cualquiera de uno o más de entre, por ejemplo, miembros de la superfamilia TNFR, CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-1, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 o combinaciones de los mismos. También se pueden usar con los CARs dominios coestimuladores de otras proteínas. Dominios coestimuladores adicionales serán evidentes para las personas expertas en la materia. Si un CAR comprende más de un dominio coestimulador,
- 35 estos dominios pueden estar dispuestos en tándem, opcionalmente separados por un conector. Los productos de la invención comprenden dominios 41BB.

Dominio separador extracelular de un receptor de antígenos quimérico

- [0067] Los CARs de la divulgación pueden comprender además un dominio separador extracelular. En algunos CARs, este dominio facilita un plegamiento de las proteínas apropiado. El dominio separador extracelular comprende una
- 40 región hidrófila que está unida a la región de reconocimiento específico de antígeno y el dominio transmembrana. Los dominios separadores extracelulares pueden incluir, pero de forma no limitativa, fragmentos Fc de anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos, regiones bisagra de anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos, regiones CH2 de anticuerpos, regiones CH3 de anticuerpos, secuencias separadoras artificiales o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de dominios separadores extracelulares incluyen, pero de forma no limitativa, bisagra de
- 45 CD8 α , espaciadores artificiales constituidos por polipéptidos tales como Gly3, o los dominios CH1, CH3 de las IgG (tales como la IgG4 humana). Específicamente, el dominio separador extracelular puede ser (i) una bisagra, regiones CH2 y CH3 de la IgG4, (ii) una región bisagra de la IgG4, (iii) una bisagra y CH2 de la IgG4, (iv) una región bisagra de CD8 α , (v) una bisagra, regiones CH2 y CH3 de la IgG1, (vi) una región bisagra de la IgG1 o (vi) una bisagra y CH2 de la IgG1 o una combinación de las mismas. Dominios separadores extracelulares adicionales serán evidentes para las personas
- 50 expertas en la materia. Los productos de la invención comprenden los dominios bisagra de CD8 α /bisagra de la IgG4.

Dominio transmembrana de los receptores de antígenos quiméricos

- [0068] Los CARs de la divulgación también pueden comprender un dominio transmembrana. El dominio transmembrana puede comprender la secuencia transmembrana de cualquier proteína que tenga un dominio transmembrana, incluida cualquiera de las proteínas transmembrana de tipo I, tipo II o tipo III. El dominio transmembrana de un CAR también puede comprender una secuencia hidrofóbica artificial. Los dominios transmembrana de los CARs se pueden seleccionar para que no dimericen. Dominios transmembrana adicionales serán evidentes para las personas expertas en la materia. Los productos de la invención comprenden dominios transmembrana de CD28/CD8α.

Dominio de señalización intracelular de receptores de antígenos quiméricos

- [0069] Los CARs de la divulgación también pueden comprender un dominio de señalización intracelular. Este dominio puede ser citoplásmico y puede transducir la señal de función efectora y dirigir la célula para ejecutar su función especializada. Los ejemplos de dominios de señalización intracelular incluyen, pero de forma no limitativa, cadena ζ del receptor de las células T o cualquiera de sus homólogos (por ejemplo, la cadena η, las cadenas FcεR1γ y β, la cadena MB1 (Igα), la cadena B29 (Igβ), etc.), polipéptidos CD3 (Δ, δ y ε), tirosina quinasas de la familia syk, (Syk, ZAP 70, etc.), tirosina quinasas de la familia src (Lck, Fyn, Lyn, etc.) y otras moléculas implicadas en la transducción de las células T, tales como CD2, CD5 y CD28. Específicamente, el dominio de señalización intracelular puede ser la cadena zeta de CD3 humana, FcγRIII, FcεRI, colas citoplásmicas de receptores de Fc, receptores citoplásmicos que llevan motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM) o combinaciones de los mismos. Dominios de señalización intracelular adicionales serán evidentes para las personas expertas en la materia. Los productos de la invención comprenden dominios CD3 zeta.

Conectores en los receptores de antígenos quiméricos

- [0070] En algunas divulgaciones, dos o más componentes de los CARs están separados por uno o más conectores. Por ejemplo, en CARs que comprenden al menos dos regiones de reconocimiento específico de antígeno, la primera región de reconocimiento en el CAR puede estar separada de la segunda región de reconocimiento en el CAR mediante un conector. Adicionalmente, el CAR se puede enlazar a controles terapéuticos mediante un conector. Los conectores son una región oligo- o polipeptídica de aproximadamente 1 a 100 aminoácidos de longitud que enlazan cualquiera de los dominios/regiones del CAR de la invención. Los conectores pueden tener, por ejemplo, 5-12 aminoácidos de longitud, 5-15 aminoácidos de longitud o de 5 a 20 aminoácidos de longitud. Los conectores pueden estar compuestos de residuos flexibles como la glicina y la serina de modo que los dominios proteicos adyacentes sean libres de moverse el uno con respecto al otro. Se pueden usar conectores más largos, por ejemplo, aquellos más largos que 100 aminoácidos, y se pueden seleccionar para, por ejemplo, asegurar que dos dominios adyacentes no interfieren estéricamente el uno con el otro. Los ejemplos de conectores que se pueden usar incluyen, pero de forma no limitativa, conectores 2A (por ejemplo, T2A), conectores de tipo 2A o equivalentes funcionales de los mismos. Los productos de la invención comprenden conectores T2A.

Controles terapéuticos

- [0071] Los controles terapéuticos regulan la proliferación celular, facilitan la selección celular (por ejemplo, la selección de células que expresan los receptores de antígenos quiméricos de la invención) o una combinación de los mismos. Opcionalmente, la regulación de la proliferación celular comprende regular por aumento la proliferación celular para promover la propagación celular. Opcionalmente, la regulación de la proliferación celular comprende regular por disminución para reducir o inhibir la propagación celular. Opcionalmente, los agentes que sirven como controles terapéuticos pueden promover el enriquecimiento de células que expresan los receptores de antígenos quiméricos biespecíficos que pueden resultar en una ventaja terapéutica. Los agentes que sirven como controles terapéuticos pueden interactuar bioquímicamente con composiciones adicionales para regular el funcionamiento de los controles terapéuticos. Por ejemplo, el EGFRt (un control terapéutico) puede interactuar bioquímicamente con el cetuximab para regular la función del EGFRt en la selección, el seguimiento, la ablación celular o una combinación de los mismos.
- [0072] Los ejemplos de controles terapéuticos incluyen, pero de forma no limitativa, cualquiera de uno o más de entre receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt), timidina quinasa, citosina desaminasa, nitrorreductasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, caspasa 8 humana, caspasa 9 humana, purina nucleósido fosforilasa, linamirasa/linamirasa/glucosa oxidasa, desoxirribonucleósido quinasa, peroxidasa de rábano (HRP)/ácido indol-3-acético (IAA), gamma-glutamylcisteína sintetasa, CD20/alfaCD20, quimera de CD34/timidina quinasa, caspasa-2 dependiente de dox, timidina quinasa mutante (HSV-TKSR39), sistema AP1903/Fas, un receptor de citocina quimérico

(CCR), un marcador de selección y combinaciones de los mismos. En algunas divulgaciones, los controles terapéuticos se coexpresan con receptores de antígenos quiméricos biespecíficos.

[0073] Los ejemplos de agentes que regulan el funcionamiento de los controles terapéuticos incluyen, pero de forma no limitativa, cualquiera de uno o más de entre Herceptin, metotrexato, cetuximab, análogos de timidina (por ejemplo, ganciclovir), (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVDU), 5-fluorocitosina (5-FC), 5-(azaridin-1-il)-2,4-dinitrobenzamida (CB1954), 6-tioguanina, un fármaco dimerizante sintético (por ejemplo, AP1903), fosfato de fludarabina, linamarina (lin), análogos de nucleósidos (por ejemplo, BVDU, difluorodesoxicidina (dFdC), 1-β-D-arabinofuranosiltimina (ara-T)), ácido indol-3-acético (IAA), 1-butionina-S,R-sulfoximina (BSO), rituximab (RTX), doxiciclina, inhibidores de tirosina quinasas o combinaciones de los mismos. Estos agentes se pueden administrar antes, durante o después del uso de los controles terapéuticos.

[0074] Como se ha descrito anteriormente, los CARs se pueden sintetizar como cadenas polipeptídicas únicas. Si el CAR es un CAR biespecífico, la secuencia polinucleotídica que codifica el CAR puede estar, por ejemplo, en la siguiente configuración en la dirección N-terminal a C-terminal: secuencia señal N-terminal - región de reconocimiento específico de antígeno 1 - conector - región de reconocimiento específico de antígeno 2 - dominio separador extracelular - dominio transmembrana - dominio coestimulador - dominio de señalización intracelular. Tal CAR puede comprender dos o más dominios coestimuladores.

[0075] Alternativamente, la secuencia polinucleotídica que codifica el CAR puede estar en la siguiente configuración en la dirección N-terminal a C-terminal: secuencia señal N-terminal - región de reconocimiento específico de antígeno 1 - conector - región de reconocimiento específico de antígeno 2 - dominio transmembrana - dominio coestimulador - dominio de señalización intracelular. Tal CAR puede comprender dos o más dominios coestimuladores.

[0076] Si un CAR comprende más de dos regiones de reconocimiento específico de antígeno, la secuencia polinucleotídica que codifica el CAR puede estar en la siguiente configuración en la dirección N-terminal a C-terminal: secuencia señal N-terminal - región de reconocimiento específico de antígeno 1-conector - región de reconocimiento específico de antígeno 2 - conector - (región de reconocimiento específico de antígeno)_n-dominio transmembrana - dominio coestimulador - dominio de señalización intracelular. Tal CAR puede comprender además un dominio separador extracelular. Cada región de reconocimiento específico de antígeno puede estar separada por un conector. Tal CAR puede comprender dos o más dominios coestimuladores.

[0077] La divulgación proporciona una secuencia de ácido nucleico del esqueleto de un CAR ejemplar que incluye un dominio separador extracelular, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador y un dominio de señalización intracelular. Específicamente, un esqueleto ejemplar para un CAR puede comprender, en la orientación N-terminal a C-terminal, IgG4bisagra-CD28tm-41BB-CD3zeta, donde el dominio separador extracelular es la región bisagra de la IgG4, el dominio transmembrana es la región transmembrana de CD28, el dominio coestimulador es de 4-1BB y el dominio de señalización intracelular es de la cadena zeta de CD3 (figura 7). Al menos dos o más regiones de reconocimiento específico de antígeno se pueden insertar en el extremo N-terminal en la bisagra de la IgG4.

[0078] La invención proporciona secuencias de ácido nucleico donde el CAR es específico para CD19 y CD20. Las secuencias que codifican CARs biespecíficos anti-CD19xCD20 de la divulgación se exponen en las figuras 3, 8, 10, 4, 9 y 11. En estas figuras, el CAR biespecífico comprende scFvs específicos para CD19 y CD20 con cada scFv separado por un conector, unido a un dominio separador extracelular, que está unido a los dominios coestimulador y de señalización intracelular mediante un dominio transmembrana. Aunque los CARs representan un conjunto de secuencias de scFv, se puede usar cualquier scFv específico de CD19 y CD20. En una forma de realización particular de la invención, el CAR biespecífico específico de CD19 y CD20 es CD19scFv-Gly4Serconector-CD20scFv-IgG4-Bisagra-CD28tm-41BB(cito)-zeta(cito) y está codificado por las secuencias expuestas en las figuras 3 y 4 (SEQ IDs 1 y 3, respectivamente). Este CAR biespecífico comprende fragmentos Fv monocatenarios específicos para CD19 y CD20 enlazados por un conector Gly4Ser, un dominio separador extracelular bisagra de la IgG4, un dominio transmembrana de CD28, un dominio coestimulador de 41BB y el dominio citoplásmico de la cadena zeta de CD3.

[0079] En otra divulgación, el CAR biespecífico específico de CD19 y CD20 comprende CD19scFv-Gly4serconector-CD20scFv-hulgG4-bisagraCH2CH3-CD28tm/cito-41BB-zeta (figuras 8-9). Este CAR biespecífico comprende fragmentos Fv monocatenarios específicos para CD19 y CD20 enlazados por un conector Gly4Ser, una bisagra de la IgG4 humana, dominio separador extracelular CH2 y CH3, un dominio transmembrana de CD28, un dominio coestimulador de 4-1BB y el dominio citoplásmico de la cadena zeta de CD3.

[0080] En otra forma de realización de la invención, el CAR biespecífico específico de CD19 y CD20 es CD19-Gly4serconector-CD20scFv-CD8abisagra-CD8αTM-41BBcoestim-zetacito (figuras 10-11; SEQ IDs 10 y 12, respectivamente). Este CAR biespecífico comprende fragmentos Fv monocatenarios específicos para CD19 y CD20 enlazados por un conector Gly4Ser, un dominio separador extracelular bisagra de CD8alfa, un dominio transmembrana de CD8alfa, un dominio coestimulador de 41BB y el dominio citoplásmico de la cadena zeta de CD3.

[0081] Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de productos de la invención se muestran en las figuras 3 (SEQ ID 1), 4 (SEQ ID 3), 10 (SEQ ID 10) y 11 (SEQ ID 12).

Receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt)

[0082] El receptor de factor de crecimiento epidérmico humano (huEGFR) (EGFR; ErbB-1, HER1 en seres humanos) es un receptor tirosina quinasa de la familia ErbB de receptores de factores de crecimiento que no es expresado por las células de los sistemas hematopoyético y linfopoyético. La unión de ligandos (EGF, TGF-α) ocurre en los dominios extracelulares N-terminales I y II del EGFR resultante de la transición de los monómeros inactivos del receptor tirosina quinasa a homodímeros activos.

[0083] El dominio extracelular III del EGFR contiene los sitios de unión de anticuerpos (por ejemplo, cetuximab (Erbix), un anticuerpo quimérico de IgG1). Se cree que el EGFR humano se puede volver incapaz de unir ligandos (EGF, TGF-α) por eliminación de los dominios I y II y desprovisto de actividad de señalización por delección de su cola citoplásmica, a la vez que retiene un sitio de unión a anticuerpos intacto (por ejemplo, sitio de unión a cetuximab), por ejemplo en el dominio extracelular III, IV o una combinación de los mismos (Wang et al., A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells Blood 118(5): 1255-1263).

[0084] Un polipéptido de EGFRt truncado descrito aquí tiene al menos tres usos para ingeniería genética de terapias celulares: purificación celular *ex vivo*, seguimiento celular *in vivo* y ablación celular. El EGFRt, para el uso como un control terapéutico con CARs, se une opcionalmente a cualquiera de uno o más de entre ARNip específico de EGFR, una molécula pequeña que reconoce EGFR, un anticuerpo anti-EGFR o una combinación de los mismos. En otra divulgación, el EGFRt comprende la secuencia expuesta en las figuras 12 o 13 o secuencias que son aproximadamente un 70%, aproximadamente un 75%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90% o aproximadamente un 95% homólogas a las secuencias expuestas en las figuras 12 o 13.

[0085] El huEGFRt puede estar coexpresado con CARs para purificar células que expresan los CARs (por ejemplo, purificación celular *ex vivo*), seguir células (por ejemplo, seguimiento de células *in vitro* o *in vivo*) que expresan los CARs o regular células (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro* o *ex vivo*) que expresan los CARs activando la ablación celular según sea necesario.

Receptor de citocinas quimérico (CCR)

[0086] Basándose en las limitaciones de usar citocinas yc exógenas en la inmunoterapia adoptiva, la invención proporciona células T con un mecanismo de señalización de citocinas yc intrínseco. La utilidad de las señales de los receptores de citocinas quiméricos constitutivos forzados IL-2/IL-15Rβ (CyCR2) y el receptor IL-7Rα (CyCR7) se compararon. Como se describe a continuación, los receptores de citocinas quiméricos tienen la capacidad para mejorar la supervivencia, la persistencia y el injerto *in vivo* de células T citotóxicas (CTLs).

[0087] Por consiguiente, los CARs de la divulgación pueden estar coexpresados con CCR. Por ejemplo, un CAR biespecífico puede estar coexpresado con EGFRt y CCR. Alternativamente, un CAR biespecífico puede estar coexpresado con CCR. Los ejemplos de receptor de citocinas quimérico incluyen, pero de forma no limitativa, citocina IL-7-conector- IL7Rα, citocina IL-7-conector-dominio extracelular de IL-7Rα- dominio transmembrana de IL-7Rα-dominio citoplásmico de IE-2Pβ, citocina IL-7-conector-IL2Rβ.

[0088] Un CCR que comprende citocina IL-7-conector- IL7Rα comprende una secuencia señal N-terminal unida al extremo N-terminal de la citocina IL-7 que está enlazada mediante un conector a los dominios extracelular, transmembrana y citoplásmico del IL-7Rα (la cadena alfa del receptor de IL-7).

[0089] Un CCR que comprende citocina IL-7-conector-dominio extracelular de IL-7Rα-dominio transmembrana de IL-7Rα-dominio citoplásmico de IL-2Rβ comprende una secuencia señal N-terminal unida al extremo N-terminal de la

citocina IL-7 que está enlazada mediante un conector al dominio extracelular y el dominio transmembrana del IL-7R α y al dominio citoplásmico del IL-2R β (la cadena beta del receptor de IL-2).

[0090] Un CCR que comprende citocina IL-7-conector-IL2R β comprende una secuencia señal N-terminal unida al extremo N-terminal de la citocina IL-7 que está enlazada mediante un conector a los dominios extracelular, transmembrana y citoplásmico del IL-2R β .

Receptor de dihidrofolato (DHFR)

[0091] La modificación genética de células T para coexpresar un transgén terapéutico y un transgén resistente a fármacos que confiera resistencia a fármacos linfotóxicos proporciona la oportunidad de seleccionar células terapéuticas tanto *in vivo* como *ex vivo*. Un transgén de enzima humana mutado, mutante doble de la dihidrofolato reductasa (DHFR^{FS}; L22F, F31S), que confiere resistencia de las células T diseñadas al metotrexato (MTX), lo que permite la selección de células que coexpresan un receptor de antígenos quimérico específico de CD19 (CD19CAR) que específicamente reconoce células tumorales del linaje B.

[0092] Los CARs de la divulgación (por ejemplo, CARs biespecíficos) pueden estar coexpresados con DHFR (por ejemplo, DHFR mutante). Además, un CAR biespecífico puede estar coexpresado con EGFRt, CCR y DHFR (incluido DHFR mutante). Alternativamente, un CAR biespecífico puede estar coexpresado con EGFRt y DHFR (incluido DHFR mutante).

[0093] Otros marcadores de selección que se pueden usar con CARs incluyen, pero de forma no limitativa, ADN metilado-proteína-cisteína metiltransferasa (MDMT), inosina monofosfato deshidrogenasa II (IMPDH2) o una combinación de las mismas. La MDMT hace a las células resistentes a la quimioterapia y por lo tanto se puede usar si se desea una sinergia entre la quimioterapia y la terapia con células T.

[0094] Los vectores que codifican CARs de la divulgación también se proporcionan aquí. Los vectores que codifican CARs también codifican EGFRt. Opcionalmente, los vectores que codifican CARs y EGFRt también codifican CCR o DHFR (por ejemplo, DHFR mutante). Opcionalmente, los vectores que codifican CARs y EGFRt también codifican CCD y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante). Opcionalmente, los vectores pueden codificar un CAR biespecífico y EGFRt, un CAR biespecífico y EGFRt y CCR, un CAR biespecífico y EGFRt y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) o un CAR biespecífico y EGFRt y CCR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante). Los vectores que se pueden usar para expresar CARs incluyen, pero de forma no limitativa, vectores de lentivirus, vectores de gamma retrovirus, vectores de virus espumoso, vectores de AAV, vectores de adenovirus, virus híbridos diseñados, ADN desnudo (incluidos, pero de forma no limitativa, vectores mediados por transposones, tales como Bella durmiente, Piggybak, e integrasas tal como Phi31).

[0095] Vectores de la invención se describen en las reivindicaciones. En una forma de realización ejemplar de la invención, el CAR biespecífico específico para CD19 y CD20 descrito aquí es expresado mediante un vector lentiviral como se ilustra en la figura 5.

Células genéticamente modificadas de la invención

[0096] La divulgación proporciona también células genéticamente modificadas que comprenden y expresan de forma estable CARs. Un CAR expresado por una célula genéticamente modificada puede comprender al menos dos regiones de reconocimiento específico de antígeno, un dominio extracelular, un dominio transmembrana, uno o más dominios coestimuladores y un dominio de señalización intracelular. La secuencia polinucleotídica que codifica el CAR también puede comprender una secuencia señal N-terminal. En una divulgación, el CAR es un CAR biespecífico. Cada uno de los al menos dos regiones de reconocimiento específico de antígeno, dominio separador extracelular, dominio transmembrana, uno o más dominios coestimuladores y un dominio de señalización intracelular se describen arriba. Los dominios de reconocimiento específico de antígeno pueden ser capaces de unirse específicamente, de una manera no restringida por el MHC, a un antígeno que normalmente no se une a un receptor de células T de esa manera.

[0097] En una divulgación, las células genéticamente modificadas que expresan CARs (por ejemplo, CARs biespecíficos) coexpresan EGFRt. Además, las células genéticamente modificadas que expresan CARs (por ejemplo, CARs biespecíficos) pueden coexpresar EGFRt y CCR. Las células genéticamente modificadas que expresan CARs (por ejemplo, CARs biespecíficos) pueden coexpresar opcionalmente EGFRt y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante).

Las células genéticamente modificadas que expresan CARs (por ejemplo, CARs biespecíficos) pueden coexpresar opcionalmente EGFRt, CCR y DHFR (por ejemplo, DHFR mutante).

[0098] Las células genéticamente modificadas expresan un CAR que tiene al menos dos regiones de reconocimiento específico de antígeno que son específicas para al menos dos antígenos diana diferentes. En una divulgación, las regiones de reconocimiento específico de antígeno comprenden anticuerpos específicos de diana o equivalentes funcionales o fragmentos o derivados de los mismos. El anticuerpo específico de antígeno puede ser el fragmento Fab del anticuerpo o el fragmento variable monocatenario (scFv) del anticuerpo.

[0099] Las células genéticamente modificadas que pueden comprender y expresar CARs incluyen, pero de forma no limitativa, linfocitos T (células T), células T vírgenes (T_N), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria central (T_{CM}), células de memoria efectora (T_{EM})), células asesinas naturales, células madre hematopoyéticas y/o células madre embrionarias/pluripotentes inducidas capaces de dar lugar a una progenie terapéuticamente pertinente. Opcionalmente, las células genéticamente modificadas son células autólogas. A modo de ejemplo, las células T individuales de la invención pueden ser CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4-/CD8- o CD4+/CD8+. Las células T pueden ser una población mixta de células CD4+/CD8- y CD4-/CD8+ o una población de un único clon. Las células T CD4+ de la invención pueden producir IL-2, IFN γ , TNF α y otras citocinas de células T efectoras cuando se cocultivan *in vitro* con células que expresan los antígenos diana (por ejemplo, células tumorales CD20+ y/o CD19+). Las células T CD8+ de la invención pueden lisar células diana específicas de antígeno cuando se cocultivan *in vitro* con las células diana. En algunas formas de realización, las células T pueden ser cualquiera de una o más de entre células vírgenes CD45RA+ CD62L+, células de memoria central CD45RO+ CD62L+, células de memoria efectora CD62L- o una combinación de las mismas (Berger et al., Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity. Curr Opin Immunol 2009 21(2): 224-232)).

[0100] Las células T de la invención se describen en las reivindicaciones.

[0101] Las células modificadas genéticamente se pueden producir mediante transfección estable de células con ADN que codifica un CAR de la divulgación. El ADN que codifica un CAR (por ejemplo, CAR biespecífico) también puede codificar EGFRt, CCR y/o DHFR (por ejemplo, DHFR mutante). Opcionalmente, un primer polinucleótido codifica el CAR (por ejemplo, CAR biespecífico) y está enlazado, mediante secuencias IRES o un polinucleótido que codifica un conector escindible, a un segundo polinucleótido que codifica EGFRt. Opcionalmente, el primer polinucleótido codifica el CAR (por ejemplo, CAR biespecífico) y está enlazado, mediante secuencias IRES o un polinucleótido que codifica un conector escindible, a un segundo polinucleótido que codifica EGFRt y los polinucleótidos primero o segundo están enlazados a un tercer polinucleótido que codifica CCR o DHFR (por ejemplo, DHFR mutante), también mediante secuencias IRES o un polinucleótido que codifica un conector escindible. Opcionalmente, el primer polinucleótido codifica el CAR (por ejemplo, CAR biespecífico) y está enlazado, mediante secuencias IRES o un polinucleótido que codifica un conector escindible, a un segundo polinucleótido que codifica EGFRt y los polinucleótidos primero y segundo están enlazados a un tercer polinucleótido que codifica CCR y un cuarto polinucleótido que codifica DHFR (por ejemplo, DHFR mutante) mediante secuencias IRES o un polinucleótido que codifica un conector escindible. Los vectores virales se usan comúnmente para llevar genes heterólogos al interior de las células (por ejemplo, células T). Los ejemplos de vectores virales que se pueden usar para generar células modificadas genéticamente incluyen, pero de forma no limitativa, vectores lentivirales SIN, vectores retrovirales, vectores de virus espumoso, vectores de virus adenoasociados (AAV) y/o transposones plasmídicos (por ejemplo, el sistema de transposón Bella durmiente).

[0102] Varios métodos producen transfectantes estables que expresan CARs de la divulgación. En un procedimiento, un método de transfección estable y de redirección de células es por electroporación usando ADN desnudo. Mediante el uso de ADN desnudo, el tiempo requerido para producir células redirigidas puede reducirse significativamente. Los métodos adicionales para modificar genéticamente células usando ADN desnudo que codifica un CAR incluyen, pero de forma no limitativa, métodos de transformación químicos (por ejemplo, usando fosfato cálcico, dendrímeros, liposomas y/o polímeros catiónicos), métodos de transformación no químicos (por ejemplo, electroporación, transformación óptica, electrotransferencia de genes y/o administración hidrodinámica) y/o métodos basados en partículas (por ejemplo, empalfección (impalefection), usando una pistola génica y/o magnetofección). Las células transfectadas que demuestran la presencia de un único vector sin reorganizar integrado y la expresión del CAR se pueden expandir *ex vivo*. Opcionalmente, las células seleccionadas para la expansión *ex vivo* son CD8+ y demuestra la capacidad de reconocer y lisar específicamente células diana específicas de antígeno.

[0103] También se pueden usar métodos de transducción viral para generar células redirigidas que expresan CARs. Los tipos celulares que se pueden usar para generar células modificadas genéticamente que expresan un CAR biespecífico incluyen, pero de forma no limitativa, linfocitos T (células T), células asesinas naturales, células madre

hematopoyéticas y/o células madre embrionarias/pluripotentes inducidas capaces de dar lugar a una progenie terapéuticamente pertinente.

[0104] La estimulación de las células T por un antígeno bajo condiciones apropiadas resulta en la proliferación (expansión) de las células y/o la producción de IL-2. Las células que comprenden un CAR se expandirán en número en respuesta a la unión de uno o más antígenos a las regiones de reconocimiento específico de antígeno del CAR. La divulgación proporciona también un método de producción y expansión de células que expresan un CAR. El método comprende la transfección o la transducción de las células con el vector que expresa el CAR y la estimulación de las células con células que expresan los antígenos diana, antígenos diana recombinantes o un anticuerpo para el receptor para hacer que las células proliferen, para producir y expandir células T. Opcionalmente, las células pueden ser cualquiera de uno o más de entre linfocitos T (células T), células asesinas naturales (NK), células madre hematopoyéticas (HSCs) o células madre embrionarias/pluripotentes inducidas capaces de dar lugar a una progenie terapéuticamente pertinente.

[0105] Las células genéticamente modificadas de la invención expresan un CAR biespecífico que es específico de los antígenos CD19 y CD20. En otra divulgación, una célula T genéticamente modificada expresa los CARs biespecíficos CD19scFv-Gly4ser-conector-CD20scFv-hulgG4-bisagra-CD28-41BB(cito)-zeta(cito) o CD19scFv-Gly4ser-conector-CD20scFv-hulgG4-bisagraCH2CH3-CD28tm/cito-zeta o CD19-Gly4serconector-CD20scFv-CD8alfabisagra-CD8alfaTM-41BBcoestim-zeta-cito.

[0106] La divulgación proporciona un método de producción y expansión de células T que expresan un CAR específico de CD19 y específico de CD20. El método comprende usar un lentivirus para transducir células T de memoria central (tales como células T de sangre periférica) purificadas estimuladas con esferas CD3xCD28 con el vector que expresa el CAR biespecífico de CD19 y CD20, cultivando las células T en presencia de rhIL-2 y/o IL-15 y volviendo a estimular las células T con células CD19⁺ y CD20⁺, CD19 y CD20 recombinantes o un anticuerpo para el receptor para hacer que las células T proliferen, para producir y expandir células T específicas de CD19 y específicas de CD20.

Métodos terapéuticos de la invención

[0107] Los CARs de la divulgación se pueden usar para superar fracasos terapéuticos que surgen de variantes de escape por pérdida de antígenos, para reducir la resistencia a terapias existentes y/o para tratar enfermedades asociadas a los antígenos reconocidos por los CARs.

[0108] Por consiguiente, la divulgación proporciona también métodos para tratar una enfermedad asociada al antígeno reconocido por un CAR en un sujeto que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un CAR y administrar una cantidad eficaz de la composición para tratar la enfermedad asociada al antígeno en el sujeto.

[0109] La divulgación proporciona también métodos para superar fracasos terapéuticos que surgen de variantes de escape por pérdida de antígenos en estados patológicos (por ejemplo, enfermedades de las células B) en sujetos que lo necesiten. El método comprende proporcionar una composición que comprende el CAR de la invención y administrar una cantidad eficaz de la composición para tratar la enfermedad asociada al antígeno en el sujeto.

[0110] En algunas divulgaciones, la composición comprende un polinucleótido que codifica el CAR, una proteína que comprende el CAR o células modificadas genéticamente que comprenden el CAR. Opcionalmente, las células modificadas genéticamente de la composición son linfocitos T (células T), células T vírgenes (T_N), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria central (T_{CM}), células de memoria efectora (T_{EM})), células asesinas naturales (NK), células madre hematopoyéticas (HSCs) o células madre embrionarias/pluripotentes inducidas capaces de dar lugar a una progenie terapéuticamente pertinente, que expresan el CAR. Las composiciones se pueden administrar solas o conjuntamente con terapias existentes. Si otras terapias se usan conjuntamente, las composiciones se pueden administrar al mismo tiempo o consecutivamente con las otras terapias existentes.

Composiciones farmacéuticas

[0111] La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un CAR (por ejemplo, un CAR biespecífico). El CAR en la composición puede ser cualquiera de uno o más de entre un polinucleótido que codifica el CAR, una

proteína que comprende el CAR o células modificadas genéticamente que comprenden el CAR. La composición puede comprender además polinucleótidos que codifican EGFRt, CCR y/o DHFR (por ejemplo, DHFR mutante), proteínas coexpresadas con el CAR incluidas EGFRt, CCR y/o DHFR o células modificadas genéticamente que expresan el CAR y coexpresan EGFRt, CCR y/o DHFR. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que sea segura generalmente, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario al igual que para uso farmacéutico humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosos. La invención proporciona composiciones farmacéuticas según las reivindicaciones 6 y 7.

[0112] En varias formas de realización, las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular para la administración por cualquier vía de administración. "Vía de administración" puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, incluidas, pero de forma no limitativa, aerosol, nasal, oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inhalación, transmucosa, transdérmica, parenteral, bomba implantable, infusión continua, aplicación tópica, cápsulas y/o inyecciones.

[0113] Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden contener también cualquier portador farmacéuticamente aceptable. "Portador farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en este caso se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que está implicado en llevar o transportar un compuesto de interés de un tejido, órgano o parte del cuerpo a otro tejido, órgano o parte del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser un relleno, diluyente, excipiente, solvente o material de encapsulación líquidos o sólidos, o una combinación de los mismos. Cada componente del portador debe ser "farmacéuticamente aceptable" en el sentido de que debe ser compatible con los otros constituyentes de la formulación. También debe ser adecuado para usar en contacto con cualquier tejido u órgano con los que pueda entrar en contacto, lo que significa que no debe suponer un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que sobrepase en exceso sus beneficios terapéuticos.

[0114] Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden también encapsularse, comprimirse o prepararse en una emulsión o jarabe para la administración oral. Se pueden añadir portadores sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para mejorar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Los portadores líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Los portadores sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio, dihidrato, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, acacia, agar o gelatina. El portador también puede incluir un material de liberación prolongada tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

[0115] Los productos farmacéuticos se preparan siguiendo las técnicas convencionales de farmacia que implican molienda, mezclado, granulación y compresión, cuando sea necesario, para las formas en comprimidos; o molienda, mezclado y relleno para las formas en cápsulas de gelatina dura. Cuando se usa un portador líquido, la preparación será en forma de jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Tal formulación líquida se puede administrar directamente por vía oral o introducir en una cápsula de gelatina blanda.

[0116] Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz precisa es la cantidad de la composición que producirá los resultados más eficaces en cuanto a eficacia de tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, incluidos, pero de forma no limitativa, las características del compuesto terapéutico (incluidas actividad, farmacocinética, farmacodinamia y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluidos la edad, el sexo, el tipo y la fase de la enfermedad, la condición física general, la receptividad a una dosificación dada y el tipo de medicación), la naturaleza del portador o los portadores farmacéuticamente aceptables en la formulación y la vía de administración. Una persona experta en las técnicas clínicas y farmacológicas será capaz de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz a través de experimentación rutinaria, por ejemplo, controlando la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosificación en consecuencia. Para una guía adicional, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed., 20ª edición, Williams & Wilkins PA, EE.UU.) (2000).

EJEMPLOS

[0117] Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es meramente para fines de ilustración y no están destinados a limitar la invención. Una persona experta en la materia puede

desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1

[0118] La figura 1 es una representación esquemática de un receptor de antígenos quimérico biespecífico. La figura 2 representa los componentes de un CAR biespecífico anti-CD19xanti-CD20 biespecífico. La figura 3 representa también una representación esquemática del ADNc completo empaquetado en un plásmido de transferencia del vector de lentivirus ephIV-7. Las figuras 3 y 4 muestran las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de productos de la invención, es decir, GMCSFss-CD19scFv-Gly4SerIconector-CD20scFv-IgG4Bisagra-CD28tm-41BBzeta-T2A-EGFRt_epHIV7.

Ejemplo 2

[0119] La figura 5 es una representación esquemática que muestra la construcción de vector de un CAR ejemplar, es decir, la construcción transgénica CD19scFv-CD20scFv-IgG4-CD28tm-CD28coestim-CD3zeta. El transgén CD19scFv-CD20scFv-IgG4-CD28tm-CD28coestim-CD3zeta se ensambló usando el método de ensamblaje de ADN isotérmico de un solo paso previamente descrito por Gibson et. Al. (Enzymatic assembly of DNA molecules upto several hundred kilobases. Nature Methods. 2009; 6: 343-345). Los dominios V_L y V_H de la construcción de scFv de CD19 se secuenciaron a partir de un transgén CD19CAR-CD28-Zeta previamente descrito (Schmitz N, Dreger P, Glass B, Sureda A. Allogeneic transplantation in lymphoma: current status. Haematologica. 2007; 92(11): 1533-1548) a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los dominios V_H y V_L del scFv de CD20 se ensamblaron por reacción en cadena de la polimerasa con empalme por solapamiento usando un transgén CD20R-CD28-Zeta previamente descrito (Michael Jensen et al., CD20 is a molecular target for scFvFc:zeta receptor redirected T-cells: implications for cellular immunotherapy of CD20+ malignancy. Biology of Blood and Marrow Transplant. 1998; 4: 75-83). Los dominios V_H y V_L del scFv de CD19 y del scFv de CD20 se enlazaron con un péptido conector de 18 residuos tal y como se ha descrito anteriormente. El dominio IgG4-CD28tm-CD28coestim se secuenció usando el transgén CD19R-CD28-CD3zeta por PCR. El vector lentiviral de destino CD3zeta-T2A-EGFRt_epHIV7 se preparó por digestión de restricción con NheI y RsrII de la porción CD19R-CD28 de un plásmido CD19R-CD28-Zeta-T2A-EGFRt_epHIV7 previamente descrito (Seitaro Terakura et al., Generation of CD19-CAR modified CD8+ T-cells derived from virus-specific central memory T-cells. Blood. Oct. 26, 2011). La construcción final CD19scFv-CD20scFv-IgG4-CD28tm-CD28coestim-CD3zeta se ensambló por el método de ensamblaje de ADN isotérmico de un solo paso de Gibson usando el vector de destino digerido por restricción Zeta-epHIV7 y los fragmentos de ADN CD19scFv, CD20scFv e IgG4-CD28tm-CD28coestim con cebadores para cada uno con un solapamiento de 30 pb en el extremo 5'.

Tabla 1: Elementos reguladores presentes en el plásmido de transferencia del CAR biespecífico ephIV-7

Elemento regulador	Función
U5	Secuencia única 5'
Psi	Señal de empaquetamiento
RRE	Elemento sensible a rev
flap	Contiene una secuencia de seguimiento de polipurina y una secuencia de terminación central para facilitar la importación nuclear del complejo de preintegración
Promotor EF1p	Secuencia promotora eucariótica EF1-alfa que lleva a la expresión del CAR CD19xCD20
WPRES	Elemento regulador derivado del virus de la hepatitis de marmota para mejorar el transporte de ARN viral
delU3	U3 3' con delección para generar el vector SIN
R	Secuencia de repetición dentro de la LTR
U5	Secuencia U5 3' en la LTR
Amp ^R	Gen de resistencia a la ampicilina
CoEI ori	Origen de replicación del plásmido

SV40 ori	Origen de replicación del SV40
Promotor del CMV	Promotor del CMV para generar ARN del genoma viral
R	Secuencia de repetición dentro de la LTR

Ejemplo 3

[0120] Se transfectaron células HEK 293T con el plásmido de transferencia anti-CD19xCD20CAR-T2A-EGFRt epHIV-7 o con el plásmido de transferencia anti-CD20xCD19CAR-T2A-EGFRt epHIV-7. Las células transfectadas se tiñeron con anticuerpos anti-Fc biotinilados y estreptavidina PE (SA-PE) y luego se sometieron a un análisis por citometría de flujo para la detección de la expresión de los dos CARs anteriores. Tanto el CAR anti-CD19xCD20 como el CAR anti-CD20xCD19 se expresaron en células HEK 293T transfectadas.

[0121] El plásmido de transferencia epHIV-7 coexpresó EGFRt con los dos CARs biespecíficos anteriores. La coexpresión de EGFRt fue detectada en las mismas células transfectadas usando una combinación de tinción de anticuerpos anti-EGFR biotinilados/SA-PE y análisis por citometría de flujo.

Ejemplo 4

[0122] Las células T primarias humanas derivadas de sangre periférica fueron activadas con OKT3 y luego fueron transducidas mediante lentivirus con CAR anti-CD19 monoespecífico, CAR anti-CD20 monoespecífico o vector de lentivirus epHIV7 anti-CD19xCD20CAR-T2A-EGFRt biespecífico. El vector de lentivirus epHIV7 también codificó EGFRt junto con CAR anti-CD19 monoespecífico, CAR anti-CD20 monoespecífico o anti-CD19xCD20 biespecífico. Así, las células que expresaban los CARs coexpresaron EGFRt. Las células transfectadas se tiñeron con anticuerpos anti-EGFR biotinilados y SA-PE y luego se sometieron a análisis por citometría de flujo para la detección de la expresión de EGFRt y la coexpresión de CARs monoespecíficos o biespecíficos. De las células transfectadas con CAR anti-CD19 monoespecífico, el 51% expresó EGFRt; de las células transfectadas con CAR anti-CD20 monoespecífico, el 38,5% expresó EGFRt; de las células transfectadas con el CAR anti-CD19xCD20 biespecífico, el 63,8% expresó EGFRt.

[0123] El complejo receptor de células T (TCR) en células transfectadas también se detectó en las mismas células transfectadas usando tinción con anticuerpos anti-TCR α y anti-TCR β conjugados con FITC y análisis por citometría de flujo.

Ejemplo 5

[0124] Se modificaron genéticamente células H9 para expresar CD19 o CD20 o tanto CD19 como CD20. Las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20 y luego se sometieron a análisis por citometría de flujo para detectar la expresión de CD19 y CD20. El análisis citométrico confirmó el perfil de expresión deseado de las células H9 CD19⁺CD20⁻, CD19⁺CD20⁺ y CD19⁻CD20⁺, es decir, las células H9 genéticamente modificadas expresaron CD19 o CD20 o tanto CD19 como CD20 simulando así células diana cancerosas, que contienen variantes de escape por pérdida de antígenos negativos para los antígenos. Como se describe posteriormente, estas líneas celulares se usaron posteriormente como células diana para estimular líneas de células T que expresan CARs, que actúan como células efectoras para matar las células diana.

[0125] Además, los niveles de expresión endógena de CD19 y CD20 en las líneas celulares SUP-B15 y DHL-6 se analizaron utilizando tinción con APC anti-CD19 y PE anti-CD20 y análisis por citometría de flujo. La línea celular SUP-B15 expresó un nivel alto de CD19 con un nivel bajo de CD20 (por tanto, CD19⁺CD20⁻), y la línea celular DHL-16 expresó un nivel alto de CD20 con un nivel bajo de CD19 (por tanto, CD19⁻CD20⁺).

Ejemplo 6

[0126] Un ensayo de liberación de cromo de 4 horas se usó para medir la lisis de las células diana por las células efectoras. Las células efectoras son células T humanas primarias transducidas mediante lentivirus para expresar CAR anti-CD19 monoespecífico, CAR anti-CD20 monoespecífico o CAR anti-CD19xCD20 biespecífico. Las células T efectoras con CAR anti-CD19xCD20 biespecífico lisaron eficazmente todas las células diana CD19⁺CD20⁻, CD19⁺CD20⁺ y CD19⁻CD20⁺, que incluyen las células H9 CD19⁺CD20⁻, las células H9 CD19⁺CD20⁺, las células H9 CD19⁻CD20⁺ y

las células SUP-B15. Con proporciones efectoras a dianas de 1:1, 3:1, 10:1 y 30:1, fueron lisadas aproximadamente un 25%, un 45%, un 50% y un 60%, respectivamente, de células diana.

5 [0127] En cambio, las líneas de células T que expresan un CAR monoespecífico no consiguen lisar variantes de escape por pérdida de antígenos negativas para los antígenos, que escaparon de las células efectoras con CAR monoespecífico. Las células T efectoras con CAR anti-CD19 no consiguieron lisar las dianas CD19⁺CD20⁺ y las células T efectoras con CAR anti-CD20 no consiguieron lisar las dianas CD19⁺CD20⁻.

Ejemplo 7

10 [0128] Las células T enriquecidas en CD4 que expresan CAR biespecífico fueron activadas para la secreción de citocinas (interferón gamma (IFN- γ , IFN- γ)) tras la estimulación con células diana CD19⁺CD20⁻, CD19⁺CD20⁺ y CD19⁺CD20⁺, que incluyen las células H9 CD19⁺CD20⁻, las células H9 CD19⁺CD20⁺, las células H9 CD19⁺CD20⁺ y las células SUP-B15. El contenido de IFN- γ se midió por matriz de esferas de citocinas de los sobrenadantes de cultivos de células T y células diana después de 24 horas de cocultivo. Las células T enriquecidas en CD4 que expresan CAR biespecífico activadas secretaron al menos 2500 pg/ml de INF- γ tras la estimulación con cada tipo de células diana. En cambio, las líneas de células T que expresan CAR monoespecífico no se activaron para la secreción de la citocina INF- γ tras la estimulación con variantes de escape por pérdida de antígenos negativas para los antígenos, que escaparon de las células efectoras con CAR monoespecífico. Las células T CAR CD19 no consiguieron segregar IFN- γ tras el cocultivo con células diana CD19⁺CD20⁺, y las células T CAR CD20 no consiguieron segregar IFN- γ tras el cocultivo con células diana CD19⁺CD20⁻.

Ensayo de estimulación *in vitro*

20 [0129]

• Estimuladores (3x10⁵):

- TM-LCL	- progenitor H9
- OKT3-TM-LCL	- H9 CD19R
- SUP-B15	- H9 CD20R
- DHL-6	- H9 CD19/20R

• Elementos que responden (1x10⁶ en S₁R₂D₁₇):

- simulación enriquecida en CD4	- simulación enriquecida en CD8
- CD19R enriquecido en CD4	- CD19R enriquecido en CD8
- CD20R enriquecido en CD4	- CD20R enriquecido en CD4
- CD19/20R enriquecido en CD4	- CD19/20R enriquecido en CD8

• Células incubadas durante 24 h y sobrenadante sin células se recogerán hoy para un ensayo BioPlex

Ejemplo 8

25 [0130] El ejemplo siguiente describe un receptor de antígenos quimérico específico de CD19 enlazado a un receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt) mediante una secuencia T2A. El EGFRt se puede enlazar a y coexpresarse con otros receptores de antígenos quiméricos, por ejemplo, receptores de antígenos quiméricos biespecíficos.

30 [0131] Los solicitantes demostraron la utilidad de tal EGFR truncado (huEGFRt) expresado por células T transducidas para la purificación inmunomagnética usando cetuximab biotinilado, el seguimiento celular por citometría de flujo e inmunohistoquímica y la ablación celular *in vivo* después de la administración sistémica de cetuximab. En esta forma

de realización ejemplar, el dominio I y el II del EGFRt se han eliminado, mientras que los dominios III y IV se han retenido.

[0132] La construcción lentiviral CD19CAR-T2A-EGFRt-epHIV7 contiene: (1) la secuencia de receptor de antígenos quimérico (CAR) que consiste en los segmentos génicos V_H y V_L del anticuerpo monoclonal (mAb) FMC63 específico de CD19, una bisagra-C_{H2}-C_{H3} de la IgG4, los dominios transmembrana y citoplásmico de señalización de la molécula coestimuladora CD28 y el dominio citoplásmico de la cadena CD3ζ (Kowolik CK. et al., CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. Cancer Res. 2006, 66(22): 10995-11004; (2) la secuencia T2A autoescindible (Szymczak AL. et al., Correction of multi-gene deficiency in vivo using a "self-cleaving" 2A peptide-based retroviral vector. Nat Biotechnol 2004; 22(5): 589-594); y (3) la secuencia de EGFR truncado indicada.

Enriquecimiento inmunomagnético de células T humanas huEGFRt⁺ después de la transducción lentiviral

[0133] El cetuximab biotinilado se usó o para la selección inmunomagnética o la selección FACS de células las huEGFRt⁺. Los solicitantes usaron cetuximab biotinilado conjuntamente con microesferas antibiotina disponibles comercialmente para la selección inmunomagnética de las células T humanas transducidas con un lentivirus autoinactivante que dirige la coexpresión de CD19CAR y huEGFRt.

[0134] Se estimularon subconjuntos de PBMCs o células T purificadas de memoria central (CD45RO⁺CD62L⁺ T_{CM}) o de memoria efectora (CD45RO⁺CD62L⁺ T_{EM}) con esferas anti-CD3/anti-CD28 y luego se transdujeron con un vector lentiviral para generar un panel de líneas de células T humanas primarias, de las cuales 2,6%-40% expresaron huEGFRt y CAR. Las células no seleccionadas fueron marcadas con cetuximab biotinilado y microesferas anti-biotina; y luego fueron separadas para obtener de manera consistente una población celular seleccionada, de la cual un 90% expresa huEGFRt y CAR.

[0135] Las células T no seleccionadas y la fracción seleccionada se tiñeron con cetuximab biotinilado y o estreptavidina conjugada con PE o Ab anti-biotina conjugado con PE, y luego se sometieron a un análisis por citometría de flujo. La selección de células CD19CAR⁺EGFRt⁺ se realizó o 3 días después de la transducción de blastos OKT3 (enriquecidos del 38% al 98%), o después de 1 ciclo rápido de expansión de células derivadas de CD62LCD45RO⁺ de memoria efectora transducidas (enriquecidas del 20% al 96%), después de 3 ciclos rápidos de expansión de células derivadas de TCM específicas de CMVpp65 transducidas (enriquecidas del 12% al 91%) o después de 2 ciclos rápidos de expansión de células derivadas de CD8⁺TCM transducidas (enriquecidas del 3% al 97%). La selección de células CD19CAR⁺EGFRt⁺IMPdH2dm⁺ se realizó después de 1 ciclo rápido de expansión de células derivadas de TCM transducidas (enriquecidas del 25 al 92%).

[0136] Las construcciones CD19CAR-T2A-EGFRt-IMPdH2dm contenidas en vectores lentivirales incluyen porciones de secuencia con optimización de codones del CAR coestimulador de CD28 específico de CD19 (CD19CAR), seguido de la T2A autoescindible y los marcadores de selección huEGFRt e IMPdH2dm (un mutante doble del gen de la inosina monofosfato deshidrogenasa 2 que permite la supervivencia celular tras la adición de micofenolato 27), junto con las secuencias del promotor del factor de alargamiento 1 (EF-1p), las secuencias señal de la cadena alfa del receptor de GM-CSF (GMCSFRss) y el codón de parada de 3 nucleótidos.

[0137] Antes de la selección inmunomagnética, una ventaja proliferativa de las células huEGFRt⁺ sobre las células huEGFRt⁺ se observó en cultivos de células T transducidas no seleccionadas sometidas a la expansión mediada por OKT3. Sin embargo, después de la selección inmunomagnética, el nivel de expresión de huEGFRt y la frecuencia de las células que lo expresan permanecieron estables durante 3 ciclos consecutivos de 14 días de expansión basada en OKT3¹⁴. El factor de expansión de las células EGFRt⁺ después de la selección inmunomagnética mejoró significativamente sobre el de las células huEGFRt⁺ en los cultivos no seleccionados.

[0138] Estos datos demuestran que el huEGFRt puede servir como un marcador de superficie celular único para las células T humanas transducidas y permiten la posterior purificación inmunomagnética con cetuximab de poblaciones de células que expresan huEGFRt estables que también expresan CARs.

Seguimiento de células T huEGFRt⁺ adoptivamente transferidas usando citometría de flujo e inmunohistoquímica

[0139] Para probar la utilidad del huEGFRt para seguir el injerto de células T adoptivamente transferidas, los solicitantes recogieron sangre y muestras de médula ósea de ratones deficientes NOD/Scid IL-2RyC injertados con células T humanas CD19CAR⁺EGFRt⁺.

[0140] Primero, muestras de sangre periférica y células mononucleadas de médula ósea no fijadas se sometieron a análisis por citometría de flujo después de ser teñidas con cetuximab biotinilado y estreptavidina conjugada con PE. Aunque el nivel de injerto de células T CD45⁺ humanas (20%-25%) fue similar en animales administrados o con células T negativas o con células T positivas para EGFRt, la tinción doble para CD45 y EGFR humanos permitió la resolución de células T huEGFRt⁺ (es decir, que expresan el transgén) humanas de sus homólogas negativas para huEGFRt.

[0141] Segundo, los solicitantes trataron de determinar si las muestras de tejido fijado incluido en parafina estándar eran susceptibles a la detección de infiltrados de células T huEGFRt⁺ usando kits de diagnóstico específicos para EGFR. Los solicitantes realizaron análisis inmunohistoquímicos de fémures incluidos en parafina de ratones injertados y detectaron células huEGFRt⁺ en la médula ósea. Estos datos sostienen la utilidad del huEGFRt para servir como un marcador de seguimiento para cuantificar la frecuencia y la distribución tisular de las células T adoptivamente transferidas.

La unión de cetuximab a huEGFRt sensibiliza las células T humanas a la ADCC

[0142] Una característica valiosa de un marcador de selección/seguimiento de superficie celular sería su capacidad para servir como un diana para la ablación celular *in vivo*. Los solicitantes evaluaron la extensión a la que el Cetuximab unido a huEGFRt en células T activa la ADCC de células T huEGFRt⁺ *in vitro* y si la administración de Cetuximab podría atenuar el injerto de células T huEGFRt⁺ adoptivamente transferidas en ratones *Nod/scid*.

[0143] Se cocultivaron células T huEGFRt⁺ marcadas con ⁵¹Cr como las células diana y PBMCs activadas con GM-CSF frescas humanas como efectoras. Luego, la adición de Cetuximab sensibilizó específicamente las células T huEGFRt⁺ para la citólisis ADCC por las efectoras. La lisis de las células T huEGFRt⁺ se midió mediante un ensayo de liberación de cromo de 4 horas y los resultados mostraron que la adición de Cetuximab aumentó significativamente la lisis de menos de un 5% a aproximadamente un 50%, un 45%, un 40% y un 15%, respectivamente, con proporciones efectora a diana (efectora:diana) de 50:1, 25:1, 5:1 y 1:1.

[0144] En cambio, la adición del mAb específico de CD20 Rituxan no tuvo ningún efecto sobre la activación de la ADCC de las células T huEGFRt⁺ en este ensayo.

[0145] A continuación, los solicitantes derivaron células T murinas CTLL-2 huEGFRt⁺ que fueron modificadas adicionalmente para segregar IL-2 autocrina y expresar el indicador biofotónico de luciferasa de luciérnaga, y adoptivamente transfirieron estas células CTLL-2 ffLuc⁺huEGFRt⁺ mediante inyección intravenosa a ratones *Nod/SCID*, que posteriormente recibieron Cetuximab o Rituxan. El injerto *in vivo* de CTLL-2 transferidas, medido por obtención de imágenes biofotónicas *in vivo*, fue inhibido significativamente (97%, P< ,05) en ratones que recibieron Erbitux (1 mg intraperitonealmente a diario). La eliminación mediada por cetuximab de las células CTLL-2 ffLuc⁺huEGFRt⁺ ocurrió entre los 4 y 6 días. Estos datos sostienen el uso de la administración de Cetuximab como un control terapéutico para pacientes que reciben células T huEGFRt⁺.

Ejemplo 9

[0146] Este ejemplo describe células T con un mecanismo de señalización de citocina yc intrínseco y muestra que los receptores de citocinas quiméricos (CCR) IL-2/IL-15Rβ (CyCR2) e IL-7Rα (CyCR7) tienen la capacidad para mejorar la supervivencia, la persistencia y el injerto *in vivo* de células T citotóxicas (CTLs). El antígeno CD19 truncado (CD19t) se enlazó a un CyCR mediante un conector T2A para mostrar la expresión del CyCR en la superficie celular. Los receptores de citocinas quiméricos descritos aquí se pueden enlazar a receptores de antígenos quiméricos, tales como los CARs biespecíficos descritos aquí.

[0147] Para desarrollar una plataforma de citocina yc independiente de ligando e intrínseca de las células, los solicitantes diseñaron receptores de citocina yc quiméricos (CyCR) compuestos por la citocina IL-7 ligada por diez

aminoácidos al dominio extracelular del IL-7R α . Para diseñar un CyCR que confiera una señal de IL-7R, la citocina IL-7 se ligó a la cadena IL-7R α (CyCR7) de longitud total. Un CyCR que proporcione una señal de IL-2/IL-15R β se diseñó ligando la citocina IL-7 al dominio extracelular y transmembrana del IL-7R α fusionado al dominio citoplásmico del IL-2/IL-15R β (CyCR2). Se espera que estos receptores quiméricos monocatenarios requieran la cadena γ c endógena para la señalización.

[0148] Se generaron luego construcciones donde los transgenes CyCR estaban seguidos por la secuencia T2A autoescindible y un antígeno CD19 citoplásmicamente truncado (CD19t). CyCR y CD19t se expresan como un transcrito único y se escinden postraduccionalmente en el extremo C-terminal del péptido T2A autoescindible para producir dos proteínas de membrana de tipo 1 separadas CyCR(T2A) y CD19t. Basándose en la expresión de dos proteínas a partir de un único transcrito, la proporción de la expresión de CyCR(T2A) a CD19t es 1:1, por lo tanto, el CD19t de superficie celular es una indicación de la expresión en la superficie celular del CyCR. La transducción lentiviral y la expresión de estas construcciones podrían luego medirse por la expresión de CD19t de superficie, tal como la que se observa en ambas líneas celulares Jurkat y NK-92.

[0149] también se diseñó un tercer CyCR, que tiene una citocina IL-7 ligada a un IL-7R α truncado (CyCR7t), al que le faltan los aminoácidos 1-126 del dominio extracelular del IL-7R α . Un modelo molecular de la dimerización del CyCR7t con la cadena γ c endógena es necesario para la transducción de señales. La falta de los aminoácidos 1-126 del dominio extracelular del IL-7R α hace que el CyCR7t sea no funcional.

[0150] La expresión del CyCR7 truncado no señala o sostiene funcionalmente el crecimiento celular independiente de citocinas. La citometría de flujo detectó CD19t de la superficie celular en las líneas celulares Jurkat (95% CD19t⁺ CyCR7t⁺) y Teff (97% CD19t⁺ CyCR7t⁺) transducidas con lentivirus. El análisis de transferencia Western de la fosforilación de STAT5 en la línea celular Jurkat que expresa CyCR7t no detectó un aumento obvio de STAT5 fosforilada en comparación con la línea celular Jurkat de control no transducida. Los controles positivos OKT3 estimularon PBMC cultivadas en 50 U/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-15 y K562 mostraron una activación de STAT5 fosforilada aumentada. Por consiguiente, la expansión y la viabilidad de las CTLs transducidas con CyCR7t cultivadas durante 20 días eran todavía dependientes de citocinas.

[0151] Para determinar si CyCRs funcionales tales como CyCR2 y CyCR7 podrían sostener el crecimiento de las células T CD8⁺ primarias humanas en ausencia de citocina exógena, medimos la expansión de CTLs que expresan cada CyCR. Las células T primarias humanas que expresan CyCR7t fueron incapaces de expandirse en ausencia de citocina exógena. Tanto CyCR2 como CyCR7 fueron capaces de sostener la supervivencia y la proliferación de las células T CD8⁺ a través del mantenimiento de la viabilidad, de una manera similar a la de las células parentales cultivadas en 5 U/ml y 0,5 U/ml de IL-2, respectivamente. La expansión celular total aumentada medida para CTL CyCR2⁺ frente a CyCR7⁺ se correlaciona con la expresión aumentada (es decir, una MFI de 26 para el CyCR7 frente a 52 para el CyCR2) de Ki67, una proteína antigénica nuclear presente en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular. Se observó una expresión más alta de Bcl-2, una proteína antiapoptótica clave inducida en respuesta a la señalización de IL-2 e IL-7, para CTL CyCR7⁺ frente a CyCR2⁺, que sostiene la capacidad de CyCR7 para mantener la supervivencia de las células T primarias humanas. Juntos, estos datos sugieren que, aunque ambos CyCRs sostienen la viabilidad y la expansión de las células T independientes de citocinas, el CyCR2 proporciona una ventaja proliferativa, mientras que el CyCR7 mantiene la supervivencia para las CTLs CD8⁺ efectoras.

Las células T CD8⁺ que expresan CyCR muestran un injerto independiente de citocinas in vivo

[0152] Los estudios por nuestro laboratorio y por otros indican que el injerto de CTL humanas en ratones deficientes IL-2R γ C NOD/Scid depende de la administración exógena de IL-15 o IL-2 humanas. Para probar el potencial de la expresión de CyCR en las CTLs para superar esta dependencia, las células T efectoras parentales, CTLs CyCR7⁺, y CTLs CyCR2⁺ fueron inyectadas en la vena caudal de ratones deficientes IL-2R γ C NOD/Scid inmunodeficientes en ausencia de administración de citocina exógena. El injerto total se comparó recogiendo al menos cuatro ratones por grupo el día 8, 17, 24 y 48 y analizando los niveles de células T en la sangre y la médula ósea.

[0153] En la sangre, las CTLs CyCR2⁺ tuvieron un injerto independiente de citocina exógena contundente significativo (P<0,007) en comparación con las CTLs CyCR7⁺ y las células parentales. En la médula ósea, tanto las CTLs CyCR7⁺ (P<0,03) como las CTLs CyCR2⁺ (P<0,0005) tuvieron un injerto independiente de citocina exógena significativo en comparación con las células parentales. Las CTLs CyCR2⁺ tuvieron un mayor injerto en comparación con las CTLs CyCR7⁺. Esto indica que tanto las CTLs CyCR7⁺ como las CTLs CyCR2⁺ son capaces de sostener el injerto independiente de citocina exógena, pero el porcentaje total de células fue diferente. La sangre sostuvo un porcentaje

de injerto más alto de las CTLs CyCR2⁺ en comparación con la médula ósea. La médula ósea sostuvo el injerto de las CTLs CyCR7⁺ a lo largo de un periodo más largo de tiempo. De manera importante, el injerto no fue infinito, ya que las células ya no estaban presentes en la sangre y la médula ósea el día 48 en ninguno de los grupos.

- 5 [0154] Las señales de citocina y c intrínsecas celulares pueden reemplazar la necesidad de la administración de citocina exógena para el soporte de las CTLs adoptivamente transferidas. La provisión de receptores de citocinas intrínsecos celulares puede superar la principal limitación de la inmunoterapia adoptiva; la persistencia a largo plazo de las CTL adoptivamente transferidas. Esto puede eliminar la necesidad de administrar citocina exógena, lo que puede reducir toxicidades y efectos de activación inespecífica en los tipos celulares endógenos.

Ejemplo 10

- 10 [0155] Este ejemplo muestra que el receptor de antígenos quimérico de CD19 enlazado a EGFRt y DHFR puede ser regulado por el metotrexato. Usando los métodos descritos aquí, el receptor de dihidrofolato descrito aquí puede enlazarse a receptores de antígenos quiméricos biespecíficos.

- 15 [0156] Los solicitantes han desarrollado un transgén seleccionable humano usando una variante de la dihidrofolato reductasa humana (hDHFR) que permitiría la selección de células T con el fármaco menos tóxico y farmacéuticamente disponible metotrexato (MTX). El MTX ejerce su efecto antiproliferativo a través de una inhibición competitiva de la DHFR, una enzima clave esencial para la síntesis de novo de nucleótidos timidilato.

- 20 [0157] En el presente ejemplo, los solicitantes evaluaron el potencial de la selección *in vitro* mediada por la DHFR^{FS} (variante L22F/F31S de la hDHFR) de células T humanas primarias que coexpresan un receptor de antígenos quimérico específico de CD19 (CD19CAR para el reconocimiento de tumores que expresan CD19). En esta estrategia, hipotetizamos que la exposición de una población mixta transducida de células T al fármaco linfotóxico MTX debería llevar a la eliminación de las células T sin transducir y a la expansión selectiva de las células T que coexpresan células T DHFR^{FS}/CD19CAR, aumentando la eficacia antitumoral de la población de células T como conjunto. Aquí los solicitantes muestran que la selección mediada por DHFR^{FS} de células T modificadas génicamente impusieron la expresión del transgén terapéutico CD19CAR y permitieron la derivación de integrantes estables CAR⁺ en presencia de concentraciones clínicamente alcanzables de MTX (por ejemplo, 0,1 µM de MTX).

- [0158] Para traducir el método de selección de hDHFR^{FS} para una potencial utilidad terapéutica, los solicitantes han diseñado un vector lentiviral que coexpresa hDHFR^{FS} conjuntamente con un receptor de antígenos quimérico específico de CD19 (CD19CAR) y un polipéptido EGFR humano truncado como marcador de seguimiento (huEGFRt), cada uno separado por una secuencia T2A de salto ribosómico.

- 30 [0159] Las células T CTLL2 fueron transducidas primero con este vector lentiviral CD19CAR-huEGFRt-hDHFR^{FS} y se evaluó su resistencia al MTX. Diez días después de la transducción lentiviral, el 7-8 % de las células fueron positivas para la expresión de CD19CAR y huEGFRt.

- 35 [0160] En ausencia de MTX, las células CTLL2 no transducidas y transducidas se expandieron con una tasa equivalente (21 y 27 veces respectivamente). Tras la incubación con MTX (0-0,1 µM) durante 8 días, una expansión de 7 veces con un 80% de supervivencia se observó con las células transducidas, mientras que la exposición de las células CTLL2 no transducidas a ≥ 0,05 µM de MTX resultó en la fuerte inhibición de la expansión y la viabilidad de las células CTLL2 no transducidas.

- 40 [0161] La evaluación de los niveles de expresión de huEGFRt de las células CTLL2 transducidas después de 8 días en cultivo con diversas concentraciones de MTX reveló además un enriquecimiento mediado por MTX significativo de las células huEGFRt⁺ que expresan el transgén (49%, 93%, 98,5%, 99% a 0,01, 0,025, 0,05 y 0,1 µM de MTX, respectivamente).

- 45 [0162] Para caracterizar adicionalmente la dosis máxima de MTX que podría ser tolerada por las células CTLL2 seleccionadas, las células CTLL2 transducidas que se habían cultivado en 0,1 µM de MTX durante 8 días se volvieron a sembrar con un rango más amplio de concentraciones de MTX (hasta 0,75 µM). Estas células transducidas y seleccionadas pre-MTX fueron capaces de expandirse 90-100 veces con concentraciones de MTX de hasta 0,25 µM, lo que es equivalente a la expansión de las CTLL2 de control no transducidas en ausencia de MTX.

- 5 [0163] Los solicitantes transdujeron células T humanas primarias con el mismo vector lentiviral CD19CAR-huEGFRt-hDHFR^{FS}. Se usaron células T CD62L⁺CD45RO⁺ purificadas como una población de partida por su potencial para la persistencia después de una transferencia adoptiva. Diez días después de la transducción, estas células T se cultivaron en diversas concentraciones de MTX y se evaluaron el número celular y la viabilidad a lo largo del tiempo. Después de 10 días, las células T transducidas y no transducidas se expandieron igualmente (80 veces) en ausencia de MTX. Además, incluso en 0,1 µM de MTX, las células T transducidas mantuvieron una viabilidad del 63%, mientras que las células T humanas primarias no transducidas mostraron una fuerte inhibición tanto de la viabilidad como del factor de expansión empezando con concentraciones tan bajas como 0,025 µM de MTX.
- 10 [0164] La evaluación por citometría de flujo de células T transducidas después de 10 días en cultivo con diversas concentraciones de MTX revelaron un enriquecimiento mediado por MTX significativo de las células que expresan el transgén (por ejemplo, 0,025 µM de MTX produjo un enriquecimiento de aproximadamente un 54% CD19CAR⁺ y un 79% EGFRt⁺; 0,05 µM de MTX produjo un enriquecimiento de aproximadamente un 76% CD19CAR⁺ y un 89% EGFRt⁺).
- 15 [0165] La comparación de la expresión de CD19CAR y de EGFRt el día 6 vs. el día 10 de cultivo reveló la progresión estable de esta selección mediada por MTX/DHFR^{FS} a lo largo del tiempo (día 0: 18% CD19CAR⁺, 28% EGFRt⁺; día 6: 48% CD19CAR⁺, 71% EGFRt⁺; día 10: 70% CD19CAR⁺, 88% EGFRt⁺).
- 20 [0166] A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona experta en la materia a la que esta invención pertenece. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 5^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); y Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001) proporcionan a una persona experta en la materia una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud.
- 25 [0167] Será entendido por aquellos en la técnica que, en general, los términos usados aquí están destinados generalmente como términos "abiertos" (por ejemplo, el término "incluido/a/os/as" debería interpretarse como "incluido/a/os/as, pero de forma no limitativa", el término "que tiene" debería interpretarse como "que tiene al menos", el término "incluye" debería interpretarse como "incluye, pero de forma no limitativa", etc.).

LISTADO DE SECUENCIAS

- [0168]
- 30 <110> Seattle Children's Hospital d/b/a Seattle Children's Research Institute
Jensen, Michael
- <120> Receptores de antígenos quiméricos biespecíficos y usos terapéuticos de los mismos
- <130> 067505-000001WO00
- <150> US 61/598,216
<151> 13-02-2012
- 35 <160> 15
- <170> versión de PatentIn 3.5
- <210> 1
<211> 3273
<212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial

ES 2 774 160 T3

<220>

<223> GMCSFRss-CD19scFv-Gly4SerIconector-CD20scFv-IgG4Bisagra-CD28tm-41BB-C D3zeta-T2A-EGFRt_epHIV7

<400> 1

atgctgctgc tgggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccacccccgc ctttctgctg	60
atcccatga cccagaccac ctccagcctg agcgccagcc tgggcgaccg ggtgaccatc	120
agctgccggg ccagccagga catcagcaag tacctgaact ggtatcagca gaagcccgc	180
ggcaccgtca agctgctgat ctaccacacc agccggctgc acagcggcgt gccagccgg	240
tttagcggca gcggtctccg caccgactac agcctgacca tctccaacct ggaacaggaa	300
gatatcgcca cctacttttg ccagcagggc aacacactgc cctacacctt tggcggcgga	360
acaaagctgg aaatcaccgg cagcacctcc ggcagcggca agcctggcag cggcgagggc	420
agcaccaagg gcgaggtgaa gctgcaggaa agcggccctg gcctggtggc cccagccag	480
agcctgagcg tgacctgcac cgtgagcggc gtgagcctgc ccgactacgg cgtgagctgg	540
atccggcagc cccccaggaa gggcctggaa tggctgggcg tgatctgggg cagcgagacc	600
acctactaca acagcgcct gaagagccgg ctgaccatca tcaaggacaa cagcaagagc	660
caggtgttcc tgaagatgaa cagcctgcag accgacgaca ccgccatcta ctactgcgcc	720
aagcactact actacggcgg cagctacgcc atggactact ggggccaggg caccagcgtg	780
accgtgagca gcggaggtgg tggatccgag gtgcagctgc agcagtctgg ggctgagctg	840
gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt	900
tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct ggacagggcc tggaatggat tggagctatt	960
tatccaggaa atggtgatac ttcctacaat cagaagttca aaggcaaggc cacattgact	1020
gcagacaaat cctccagcac agcctacatg cagctcagca gcctgacatc tgaggactct	1080

5

ES 2 774 160 T3

gcggactatt actgtgcaag atctaattat tacggtagta gctactgggtt cttcgatgtc 1140
tggggcgagcag ggaccacggt caccgtctcc tcaggcagta ctagcgggtg tggctccggg 1200
ggcgggttccg gtggggggcgg cagcagcgac attgtgctga cccaatctcc agctatcctg 1260
tctgcatctc caggggagaa ggtcacaatg acttgccagg ccagctcaag tgtaaattac 1320
atggactgggt accagaagaa gccaggatcc tccccaaaac cctggattta tgccacatcc 1380
aacctggctt ctggagtccc tgctcgcttc agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct 1440
ctcacaatca gcagagtggg ggctgaagat gctgccactt attactgccg gcagtggagt 1500
tttaatccac ccacgttcgg aggggggacc aagctggaaa taaaagagag caagtacgga 1560
ccgccctgcc ccccttgccc tatgttctgg gtgctgggtg tggctggagg cgtgctggcc 1620
tgctacagcc tgctggtcac cgtggccttc atcatctttt gggtgaaacg gggcagaaag 1680
aaactcctgt atatatcaa acaaccattt atgagaccag taaaaactac tcaagaggaa 1740
gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gcgggtgaag 1800
ttcagcagaa gcgccgacgc ccctgcctac cagcagggcc agaatcagct gtacaacgag 1860
ctgaacctgg gcagaaggga agagtacgac gtcctggata agcggagagg ccgggaccct 1920
gagatgggag gcaagcctcg gcggaagaac cccaggaag gcctgtataa cgaactgcag 1980
aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag atcggcatga agggcgagcg gaggcggggc 2040
aagggccacg acggcctgta tcagggcctg tccaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc 2100
ctgcacatgc agggcctgcc cccaaggctc gagggcggcg gagaggcag aggaagtctt 2160
ctaactgctg gtgacgtgga ggagaatccc ggccctagga tgcttctcct ggtgacaagc 2220
cttctgctct gtgagttacc acaccagca ttcctcctga tcccacgcaa agtgtgtaac 2280
ggaataggta ttggtgaatt taaagactca ctctccataa atgtacgaa tattaacac 2340
ttcaaaaact gcacctccat cagtggcgat ctccacatcc tgccggtggc atttaggggt 2400
gactccttca cacatactcc tcctctggat ccacaggaac tggatattct gaaaaccgta 2460
aaggaaatca cagggttttt gctgattcag gcttggcctg aaaacaggac ggacctccat 2520
gcctttgaga acctagaaat catacgcggc aggaccaagc aacatggtca gttttctctt 2580
gcagtcgtca gcctgaacat aacatccttg ggattacgct ccctcaagga gataagtgat 2640
ggagatgtga taatttcag aaacaaaaat ttgtgctatg caaatacaat aaactggaaa 2700
aaactgtttg ggacctccgg tcagaaaacc aaaattataa gcaacagagg tgaaaacagc 2760
tgcaaggcca caggccaggt ctgccatgcc ttgtgctccc ccgagggtg ctggggcccg 2820
gagcccaggg actgcgtctc ttgccggaat gtcagccgag gcagggaatg cgtggacaag 2880
tgcaaccttc tggagggtga gccaaaggag tttgtggaga actctgagtg catacagtc 2940

ES 2 774 160 T3

```

caccagaggt gcctgcctca ggccatgaac atcacctgca caggacgggg accagacaac      3000
tgtatccagt gtgcccacta cattgacggc cccactgcg tcaagacctg cccggcagga      3060
gtcatgggag aaaacaacac cctgggtctgg aagtaacgag acgccggcca tgtgtgccac      3120
ctgtgccatc caaactgcac ctacggatgc actgggccag gtcttgaagg ctgtccaacg      3180
aatgggccta agatcccgtc catcgccact gggatggtgg gggccctcct cttgctgctg      3240
gtggtggccc tggggatcgg cctcttcatg tga                                     3273

```

<210> 2
 <211> 3273
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> GMCSFRss-CD19scFv-Gly4SerIconector-CD20scFv-IgG4Bisagra-CD28tm-41BB-C D3zeta-T2A-EGFRt_epHIV7

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(3273)

<400> 2

ES 2 774 160 T3

atg ctg ctg ctg gtg acc agc ctg ctg ctg tgc gag ctg ccc cac ccc	48
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro	
1 5 10 15	
gcc ttt ctg ctg atc ccc atg acc cag acc acc tcc agc ctg agc gcc	96
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala	
20 25 30	
agc ctg ggc gac cgg gtg acc atc agc tgc cgg gcc agc cag gac atc	144
Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile	
35 40 45	
agc aag tac ctg aac tgg tat cag cag aag ccc gac ggc acc gtc aag	192
Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys	
50 55 60	
ctg ctg atc tac cac acc agc cgg ctg cac agc ggc gtg ccc agc cgg	240
Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg	
65 70 75 80	
ttt agc ggc agc ggc tcc ggc acc gac tac agc ctg acc atc tcc aac	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn	
85 90 95	
ctg gaa cag gaa gat atc gcc acc tac ttt tgc cag cag ggc aac aca	336
Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr	
100 105 110	
ctg ccc tac acc ttt ggc ggc gga aca aag ctg gaa atc acc ggc agc	384
Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser	
115 120 125	
acc tcc ggc agc ggc aag cct ggc agc ggc gag ggc agc acc aag ggc	432
Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly	
130 135 140	

ES 2 774 160 T3

gag	gtg	aag	ctg	cag	gaa	agc	ggc	cct	ggc	ctg	gtg	gcc	ccc	agc	cag	480
Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	
145					150					155					160	
agc	ctg	agc	gtg	acc	tgc	acc	gtg	agc	ggc	gtg	agc	ctg	ccc	gac	tac	528
Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	
				165					170					175		
ggc	gtg	agc	tgg	atc	cgg	cag	ccc	ccc	agg	aag	ggc	ctg	gaa	tgg	ctg	576
Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	
			180					185					190			
ggc	gtg	atc	tgg	ggc	agc	gag	acc	acc	tac	tac	aac	agc	gcc	ctg	aag	624
Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	
		195					200					205				
agc	cgg	ctg	acc	atc	atc	aag	gac	aac	agc	aag	agc	cag	gtg	ttc	ctg	672
Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	
	210					215					220					
aag	atg	aac	agc	ctg	cag	acc	gac	gac	acc	gcc	atc	tac	tac	tgc	gcc	720
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
225					230					235					240	
aag	cac	tac	tac	tac	ggc	ggc	agc	tac	gcc	atg	gac	tac	tgg	ggc	cag	768
Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				245					250					255		
ggc	acc	agc	gtg	acc	gtg	agc	agc	gga	ggt	ggt	gga	tcc	gag	gtg	cag	816
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	
			260					265					270			
ctg	cag	cag	tct	ggg	gct	gag	ctg	gtg	aag	cct	ggg	gcc	tca	gtg	aag	864
Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	
		275					280					285				
atg	tcc	tgc	aag	gct	tct	ggc	tac	aca	ttt	acc	agt	tac	aat	atg	cac	912
Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	
	290					295					300					
tgg	gta	aag	cag	aca	cct	gga	cag	ggc	ctg	gaa	tgg	att	gga	gct	att	960
Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	
305					310				315						320	
tat	cca	gga	aat	ggt	gat	act	tcc	tac	aat	cag	aag	ttc	aaa	ggc	aag	1008
Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	
				325					330					335		
gcc	aca	ttg	act	gca	gac	aaa	tcc	tcc	agc	aca	gcc	tac	atg	cag	ctc	1056
Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	
			340					345					350			
agc	agc	ctg	aca	tct	gag	gac	tct	gcg	gac	tat	tac	tgt	gca	aga	tct	1104
Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	
		355					360					365				
aat	tat	tac	ggt	agt	agc	tac	tgg	ttc	ttc	gat	gtc	tgg	ggc	gca	ggg	1152
Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	Phe	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	
	370					375					380					
acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	ggc	agt	act	agc	ggt	ggt	ggc	tcc	ggg	1200
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	

ES 2 774 160 T3

385		390		395		400	
ggc ggt tcc ggt ggg ggc ggc agc agc gac att gtg ctg acc caa tct							1248
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser		405		410		415	
cca gct atc ctg tct gca tct cca ggg gag aag gtc aca atg act tgc							1296
Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys		420		425		430	
agg gcc agc tca agt gta aat tac atg gac tgg tac cag aag aag cca							1344
Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Lys Lys Pro		435		440		445	
gga tcc tcc ccc aaa ccc tgg att tat gcc aca tcc aac ctg gct tct							1392
Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser		450		455		460	
gga gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct							1440
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser		465		470		475	480
ctc aca atc agc aga gtg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc							1488
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys		485		490		495	
cag cag tgg agt ttt aat cca ccc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg							1536
Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu		500		505		510	
gaa ata aaa gag agc aag tac gga cgg ccc tgc ccc cct tgc cct atg							1584
Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met		515		520		525	
ttc tgg gtg ctg gtg gtg gtc gga ggc gtg ctg gcc tgc tac agc ctg							1632
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu		530		535		540	
ctg gtc acc gtg gcc ttc atc atc ttt tgg gtg aaa cgg ggc aga aag							1680
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys		545		550		555	560
aaa ctc ctg tat ata ttc aaa caa cca ttt atg aga cca gta caa act							1728
Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr		565		570		575	
act caa gag gaa gat ggc tgt agc tgc cga ttt cca gaa gaa gaa gaa							1776
Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu		580		585		590	
gga gga tgt gaa ctg cgg gtg aag ttc agc aga agc gcc gac gcc cct							1824
Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro		595		600		605	
gcc tac cag cag ggc cag aat cag ctg tac aac gag ctg aac ctg ggc							1872
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly		610		615		620	
aga agg gaa gag tac gac gtc ctg gat aag cgg aga ggc cgg gac cct							1920
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro		625		630		635	640
gag atg ggc ggc aag cct cgg cgg aag aac ccc cag gaa ggc ctg tat							1968

ES 2 774 160 T3

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr	
645 650 655	
aac gaa ctg cag aaa gac aag atg gcc gag gcc tac agc gag atc ggc	2016
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly	
660 665 670	
atg aag ggc gag cgg agg cgg ggc aag ggc cac gac ggc ctg tat cag	2064
Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln	
675 680 685	
ggc ctg tcc acc gcc acc aag gat acc tac gac gcc ctg cac atg cag	2112
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln	
690 695 700	
gcc ctg ccc cca agg ctc gag ggc ggc gga gag ggc aga gga agt ctt	2160
Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu	
705 710 715 720	
cta aca tgc ggt gac gtg gag gag aat ccc ggc cct agg atg ctt ctc	2208
Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu	
725 730 735	
ctg gtg aca agc ctt ctg ctc tgt gag tta cca cac cca gca ttc ctc	2256
Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu	
740 745 750	
ctg atc cca cgc aaa gtg tgt aac gga ata ggt att ggt gaa ttt aaa	2304
Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys	
755 760 765	
gac tca ctc tcc ata aat gct acg aat att aaa cac ttc aaa aac tgc	2352
Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys	
770 775 780	
acc tcc atc agt ggc gat ctc cac atc ctg ccg gtg gca ttt agg ggt	2400
Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly	
785 790 795 800	
gac tcc ttc aca cat act cct cct ctg gat cca cag gaa ctg gat att	2448
Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile	
805 810 815	
ctg aaa acc gta aag gaa atc aca ggg ttt ttg ctg att cag gct tgg	2496
Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp	
820 825 830	
cct gaa aac agg acg gac ctc cat gcc ttt gag aac cta gaa atc ata	2544
Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile	
835 840 845	
cgc ggc agg acc aag caa cat ggt cag ttt tct ctt gca gtc gtc agc	2592
Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser	
850 855 860	
ctg aac ata aca tcc ttg gga tta cgc tcc ctc aag gag ata agt gat	2640
Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp	
865 870 875 880	
gga gat gtg ata att tca gga aac aaa aat ttg tgc tat gca aat aca	2688
Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr	
885 890 895	

ES 2 774 160 T3

ata aac tgg aaa aaa ctg ttt ggg acc tcc ggt cag aaa acc aaa att Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile 900 905 910	2736
ata agc aac aga ggt gaa aac agc tgc aag gcc aca ggc cag gtc tgc Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys 915 920 925	2784
cat gcc ttg tgc tcc ccc gag ggc tgc tgg ggc ccg gag ccc agg gac His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp 930 935 940	2832
tgc gtc tct tgc cgg aat gtc agc cga ggc agg gaa tgc gtg gac aag Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys 945 950 955 960	2880
tgc aac ctt ctg gag ggt gag cca agg gag ttt gtg gag aac tct gag Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu 965 970 975	2928
tgc ata cag tgc cac cca gag tgc ctg cct cag gcc atg aac atc acc Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr 980 985 990	2976
tgc aca gga cgg gga cca gac aac tgt atc cag tgt gcc cac tac att Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile 995 1000 1005	3024
gac ggc ccc cac tgc gtc aag acc tgc ccg gca gga gtc atg gga Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly 1010 1015 1020	3069
gaa aac aac acc ctg gtc tgg aag tac gca gac gcc ggc cat gtg Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val 1025 1030 1035	3114
tgc cac ctg tgc cat cca aac tgc acc tac gga tgc act ggg cca Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro 1040 1045 1050	3159
ggt ctt gaa ggc tgt cca acg aat ggg cct aag atc ccg tcc atc Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile 1055 1060 1065	3204
gcc act ggg atg gtg ggg gcc ctc ctc ttg ctg ctg gtg gtg gcc Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala 1070 1075 1080	3249
ctg ggg atc ggc ctc ttc atg tga Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met 1085 1090	3273

<210> 3

<211> 1090

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 3

ES 2 774 160 T3

Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro	1	5	10	15
Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	20	25	30	
Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	35	40	45	
Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	50	55	60	
Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	65	70	75	80
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	85	90	95	
Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	100	105	110	
Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly	Ser	115	120	125	
Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	130	135	140	
Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	145	150	155	160
Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	165	170	175	
Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	180	185	190	
Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	195	200	205	
Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	210	215	220	
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	225	230	235	240
Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	245	250	255	

ES 2 774 160 T3

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
 260 265 270
 Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 275 280 285
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
 290 295 300
 Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile
 305 310 315 320
 Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys
 325 330 335
 Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
 340 345 350
 Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
 355 360 365
 Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 370 375 380
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser
 405 410 415
 Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 420 425 430
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Lys Lys Pro
 435 440 445
 Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 450 455 460
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 465 470 475 480
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 485 490 495
 Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 500 505 510

ES 2 774 160 T3

Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met
515 520 525

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
530 535 540

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys
545 550 555 560

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
565 570 575

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu
580 585 590

Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
595 600 605

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
610 615 620

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
625 630 635 640

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
645 650 655

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
660 665 670

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
675 680 685

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
690 695 700

Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu
705 710 715 720

Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu
725 730 735

Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu
740 745 750

Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys

ES 2 774 160 T3

755					760					765					
Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys
770						775					780				
Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly
785					790					795					800
Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile
				805					810					815	
Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp
			820					825					830		
Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile
		835					840					845			
Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser
850						855					860				
Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp
865					870					875					880
Gly	Asp	Val	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr
			885						890					895	
Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile
			900					905					910		
Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys
		915					920					925			
His	Ala	Leu	Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp
		930				935					940				
Cys	Val	Ser	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys
945					950					955					960
Cys	Asn	Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu
				965					970					975	
Cys	Ile	Gln	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr
			980					985					990		
Cys	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile
		995					1000					1005			

ES 2 774 160 T3

Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly
 1010 1015 1020
 Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val
 1025 1030 1035
 Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
 1040 1045 1050
 Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile
 1055 1060 1065
 Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala
 1070 1075 1080
 Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
 1085 1090

<210> 4
 <211> 582
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IgG4bisagra-CD28tm-41BB-CD3Zeta
 <400> 4

gagagcaagt acggaccgcc ctgccccct tgcctatgt tctgggtgct ggtggtggtc 60
 ggaggcgtgc tggcctgcta cagcctgctg gtcaccgtgg ccttcatcat cttttgggtg 120
 aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 180
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 240
 gaactgcggg tgaagttcag cagaagcgcc gacgcccctg cctaccagca gggccagaat 300
 cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga agggaagagt acgacgtcct ggataagcgg 360
 agaggccggg accctgagat gggcggcaag cctcggcgga agaaccacca ggaaggcctg 420
 tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc 480
 gagcggaggc ggggcaaggg ccacgacggc ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag 540
 gatacctacg acgccctgca catgcaggcc ctgcccccaa gg 582

<210> 5
 <211> 582
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 774 160 T3

<220>

<223> IgG4bisagra-CD28tm-41BB-CD3Zeta

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(582)

<400> 5

gag agc aag tac gga ccg ccc tgc ccc cct tgc cct atg ttc tgg gtg	48
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val	
1 5 10 15	
ctg gtg gtg gtc gga ggc gtg ctg gcc tgc tac agc ctg ctg gtc acc	96
Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr	
20 25 30	
gtg gcc ttc atc atc ttt tgg gtg aaa cgg ggc aga aag aaa ctc ctg	144
Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu	
35 40 45	
tat ata ttc aaa caa cca ttt atg aga cca gta caa act act caa gag	192
Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu	
50 55 60	
gaa gat ggc tgt agc tgc cga ttt cca gaa gaa gaa gaa gga gga tgt	240
Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys	
65 70 75 80	
gaa ctg cgg gtg aag ttc agc aga agc gcc gac gcc cct gcc tac cag	288
Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln	
85 90 95	
cag ggc cag aat cag ctg tac aac gag ctg aac ctg ggc aga agg gaa	336
Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu	
100 105 110	
gag tac gac gtc ctg gat aag cgg aga ggc cgg gac cct gag atg ggc	384
Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly	
115 120 125	
ggc aag cct cgg cgg aag aac ccc cag gaa ggc ctg tat aac gaa ctg	432
Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu	
130 135 140	
cag aaa gac aag atg gcc gag gcc tac agc gag atc ggc atg aag ggc	480
Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly	
145 150 155 160	
gag cgg agg cgg ggc aag ggc cac gac ggc ctg tat cag ggc ctg tcc	528
Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser	
165 170 175	
acc gcc acc aag gat acc tac gac gcc ctg cac atg cag gcc ctg ccc	576
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro	
180 185 190	
cca agg	582
Pro Arg	

ES 2 774 160 T3

<210> 6
<211> 194
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 6

ES 2 774 160 T3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val
1 5 10 15

Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
20 25 30

Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu
35 40 45

Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu
50 55 60

Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys
65 70 75 80

Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
85 90 95

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
100 105 110

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
115 120 125

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
130 135 140

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
145 150 155 160

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
165 170 175

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
180 185 190

Pro Arg

<210> 7

<211> 2910

ES 2 774 160 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> GMCSFRss-CD19scFv-Gly4serconector-CD20scFv-huIgG4bisagra/CH2/CH3-CD28 tm/CD28cito-41BB-CD3Zeta

<400> 7

ES 2 774 160 T3

atgctgctgc tgggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccg	ctttctgctg	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct	gggcgaccgg	120
gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg	gtatcagcag	180
aagcccgaag gcaccgtcaa gctgctgac taccacacca gccggctgca	cagcggcgtg	240
cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat	ctccaacctg	300
gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc	ctacaccttt	360
ggcggcgga caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcgga	gcctggcagc	420
ggcgagggca gcaccaagg cagaggtgaag ctgcaggaaa gcggccctgg	cctggtggcc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc	cgactacggc	540
gtgagctgga tccggcagcc cccaggaag gccctggaat ggctgggctg	gatctggggc	600
agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat	caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac	cgccatctac	720
tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg	gggccagggc	780
accagcgtga ccgtgagcag cggaggtggt ggatccgagg tgcagctgca	gcagtctggg	840
gctgagctgg tgaagcctgg gccctcagtg aagatgtcct gcaaggcttc	tggctacaca	900
tttaccagtt acaatatgca ctgggttaaag cagacacctg gacaggccct	ggaatggatt	960
ggagctattt atccaggaaa tgggtgatact tcctacaatc agaagttcaa	aggcaaggcc	1020
acattgactg cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc agctcagcag	cctgacatct	1080
gaggactctg cggactatta ctgtgcaaga tctaattatt acggtagtag	ctactggttc	1140
ttcgatgtct ggggcgcagg gaccacggtc accgtctcct caggcagtac	tagcgggtgt	1200
ggctccgggg gcggttccgg tgggggcggc agcagcgaca ttgtgctgac	ccaatctcca	1260
gctatcctgt ctgcatctcc aggggagaag gtcacaaatga cttgcagggc	cagctcaagt	1320
gtaaattaca tggactggta ccagaagaag ccaggatcct ccccaaacc	ctggatttat	1380
gccacatcca acctggcttc tggagtcctt gctcgcttca gtggcagtg	gtctgggacc	1440
tcttactctc tcacaatcag cagagtggag gctgaagatg ctgccactta	ttactgccag	1500
cagtggagtt ttaatccacc cacgttcgga ggggggacca agctggaaat	aaaagagagc	1560
aagtacggac cgccctgccc cccttgccct gcccccgagt tcctgggcgg	accagcgtg	1620
ttcctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc	cgaggtgacc	1680
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagat cccgaggtcc agttcaattg	gtacgtggac	1740
ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagttcaa	cagcacctac	1800

ES 2 774 160 T3

```

cgggtggtgt ctgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag 1860
tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgcccagc agcatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1920
ggccagcctc gcgagcccca ggtgtacacc ctgcctccct cccaggaaga gatgaccaag 1980
aaccaggtgt ccctgacctg cctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 2040
tgggagagca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggacagc 2100
gacggcagct tcttcctgta cagccggctg accgtggaca agagccggtg gcaggaaggc 2160
aacgtcttta gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 2220
ctgagcctgt ccctgggcaa gatgttctgg gtgctggtgg tgggggcg ggtgctggcc 2280
tgctacagcc tgctggtgac agtggccttc atcatctttt gggcgaggag caagcggagc 2340
agaggcggcc acagcgacta catgaacatg acccccagac ggcctggccc caccggaag 2400
cactaccagc cctacgcccc acccaggac tttgcgcct acagaagcaa acggggcaga 2460
aagaaactcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaaac tactcaagag 2520
gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgcgggtg 2580
aagttcagca gaagcgccga cggccctgcc taccagcagg gccagaatca gctgtacaac 2640
gagctgaacc tgggcagaag ggaagagtac gacgtcctgg ataagcggag aggccgggac 2700
cctgagatgg gcggaagcc tggcggaag aacccccagg aaggcctgta taacgaactg 2760
cagaaagaca agatggccga ggcctacagc gagatcggca tgaaggcgga gcggaggcgg 2820
ggcaagggcc acgacggcct gtatcagggc ctgtccaccg ccaccaagga tacctacgac 2880
gccctgcaca tgcaggccct gcccccaagg 2910

```

<210> 8

<211> 2910

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> GMCSFR-ssCD19scFv-Gly4serconector-CD20scFv-huIgG4bisagra/CH2/CH3-CD28 tm/CD28cito-41BB-CD3Zeta

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(2910)

<400> 8

ES 2 774 160 T3

atg	ctg	ctg	ctg	gtg	acc	agc	ctg	ctg	ctg	tgc	gag	ctg	ccc	cac	ccc	48
Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro	
1				5					10					15		
gcc	ttt	ctg	ctg	atc	ccc	gac	atc	cag	atg	acc	cag	acc	acc	tcc	agc	96
Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	
			20					25					30			

ES 2 774 160 T3

ctg agc gcc agc ctg ggc gac cgg gtg acc atc agc tgc cgg gcc agc Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser 35 40 45	144
cag gac atc agc aag tac ctg aac tgg tat cag cag aag ccc gac ggc Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly 50 55 60	192
acc gtc aag ctg ctg atc tac cac acc agc cgg ctg cac agc ggc gtg Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val 65 70 75 80	240
ccc agc cgg ttt agc ggc agc ggc tcc ggc acc gac tac agc ctg acc Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Leu Thr 85 90 95	288
atc tcc aac ctg gaa cag gaa gat atc gcc acc tac ttt tgc cag cag Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln 100 105 110	336
ggc aac aca ctg ccc tac acc ttt ggc ggc gga aca aag ctg gaa atc Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile 115 120 125	384
acc ggc agc acc tcc ggc agc ggc aag cct ggc agc ggc gag ggc agc Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser 130 135 140	432
acc aag ggc gag gtg aag ctg cag gaa agc ggc cct ggc ctg gtg gcc Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala 145 150 155 160	480
ccc agc cag agc ctg agc gtg acc tgc acc gtg agc ggc gtg agc ctg Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu 165 170 175	528
ccc gac tac ggc gtg agc tgg atc cgg cag ccc ccc agg aag ggc ctg Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu 180 185 190	576
gaa tgg ctg ggc gtg atc tgg ggc agc gag acc acc tac tac aac agc Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser 195 200 205	624
gcc ctg aag agc cgg ctg acc atc atc aag gac aac agc aag agc cag Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln 210 215 220	672
gtg ttc ctg aag atg aac agc ctg cag acc gac gac acc gcc atc tac Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr 225 230 235 240	720
tac tgc gcc aag cac tac tac tac ggc ggc agc tac gcc atg gac tac Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr 245 250 255	768
tgg ggc cag ggc acc agc gtg acc gtg agc agc gga ggt ggt gga tcc Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser 260 265 270	816
gag gtg cag ctg cag cag tct ggg gct gag ctg gtg aag cct ggg gcc Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 275 280 285	864

ES 2 774 160 T3

tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac	912
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
290 295 300	
aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att	960
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
305 310 315 320	
gga gct att tat cca gga aat ggt gat act tcc tac aat cag aag ttc	1008
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	
325 330 335	
aaa ggc aag gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac	1056
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
340 345 350	
atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gac tat tac tgt	1104
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys	
355 360 365	
gca aga tct aat tat tac ggt agt agc tac tgg ttc ttc gat gtc tgg	1152
Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp	
370 375 380	
ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggc agt act agc ggt ggt	1200
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly	
385 390 395 400	
ggc tcc ggg ggc ggt tcc ggt ggg ggc ggc agc agc gac att gtg ctg	1248
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Val Leu	
405 410 415	
acc caa tct cca gct atc ctg tct gca tct cca ggg gag aag gtc aca	1296
Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr	
420 425 430	
atg act tgc agg gcc agc tca agt gta aat tac atg gac tgg tac cag	1344
Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln	
435 440 445	
aag aag cca gga tcc tcc ccc aaa ccc tgg att tat gcc aca tcc aac	1392
Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn	
450 455 460	
ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc	1440
Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr	
465 470 475 480	
tct tac tct ctc aca atc agc aga gtg gag gct gaa gat gct gcc act	1488
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr	
485 490 495	
tat tac tgc cag cag tgg agt ttt aat cca ccc acg ttc gga ggg ggg	1536
Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly	
500 505 510	
acc aag ctg gaa ata aaa gag agc aag tac gga ccg ccc tgc ccc cct	1584
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro	
515 520 525	
tgc cct gcc ccc gag ttc ctg ggc gga ccc agc gtg ttc ctg ttc ccc	1632
Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	

ES 2 774 160 T3

530	535	540	
ccc aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gag gtg acc Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr 545 550 555 560	1680		
tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gat ccc gag gtc cag ttc aat Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn 565 570 575	1728		
tgg tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag ccc aga Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 580 585 590	1776		
gag gaa cag ttc aac agc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg acc gtg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val 595 600 605	1824		
ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aaa gaa tac aag tgc aag gtg tcc Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser 610 615 620	1872		
aac aag ggc ctg ccc agc agc atc gaa aag acc atc agc aag gcc aag Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 625 630 635 640	1920		
ggc cag cct cgc gag ccc cag gtg tac acc ctg cct ccc tcc cag gaa Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu 645 650 655	1968		
gag atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgc ctg gtg aag ggc ttc Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe 660 665 670	2016		
tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aac ggc cag cct gag Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu 675 680 685	2064		
aac aac tac aag acc acc cct ccc gtg ctg gac agc gac ggc agc ttc Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe 690 695 700	2112		
ttc ctg tac agc cgg ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag gaa ggc Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly 705 710 715 720	2160		
aac gtc ttt agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr 725 730 735	2208		
acc cag aag agc ctg agc ctg tcc ctg ggc aag atg ttc tgg gtg ctg Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu 740 745 750	2256		
gtg gtg gtg ggc ggg gtg ctg gcc tgc tac agc ctg ctg gtg aca gtg Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val 755 760 765	2304		
gcc ttc atc atc ttt tgg gtg cgg agc aag cgg agc aga ggc ggc cac Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His 770 775 780	2352		
agc gac tac atg aac atg acc ccc aga cgg cct ggc ccc acc cgg aag	2400		

ES 2 774 160 T3

Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	
785					790					795					800	
cac	tac	cag	ccc	tac	gcc	cca	ccc	agg	gac	ttt	gcc	gcc	tac	aga	agc	2448
His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	
				805					810					815		
aaa	cgg	ggc	aga	aag	aaa	ctc	ctg	tat	ata	ttc	aaa	caa	cca	ttt	atg	2496
Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	
				820				825					830			
aga	cca	gta	caa	act	act	caa	gag	gaa	gat	ggc	tgt	agc	tgc	cga	ttt	2544
Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	
				835				840					845			
cca	gaa	gaa	gaa	gaa	gga	gga	tgt	gaa	ctg	cgg	gtg	aag	ttc	agc	aga	2592
Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	
						855					860					
agc	gcc	gac	gcc	cct	gcc	tac	cag	cag	ggc	cag	aat	cag	ctg	tac	aac	2640
Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	
					870					875					880	
gag	ctg	aac	ctg	ggc	aga	agg	gaa	gag	tac	gac	gtc	ctg	gat	aag	cgg	2688
Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	
				885					890					895		
aga	ggc	cgg	gac	cct	gag	atg	ggc	ggc	aag	cct	cgg	cgg	aag	aac	ccc	2736
Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	
				900				905					910			
cag	gaa	ggc	ctg	tat	aac	gaa	ctg	cag	aaa	gac	aag	atg	gcc	gag	gcc	2784
Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	
				915				920					925			
tac	agc	gag	atc	ggc	atg	aag	ggc	gag	cgg	agg	cgg	ggc	aag	ggc	cac	2832
Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	
				930			935					940				
gac	ggc	ctg	tat	cag	ggc	ctg	tcc	acc	gcc	acc	aag	gat	acc	tac	gac	2880
Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	
					950					955					960	
gcc	ctg	cac	atg	cag	gcc	ctg	ccc	cca	agg							2910
Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg							
				965					970							

<210> 9

<211> 970

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 9

ES 2 774 160 T3

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

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser

ES 2 774 160 T3

20	25	30
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser		
35	40	45
Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly		
50	55	60
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val		
65	70	75
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr		
	85	90
Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln		
	100	105
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
	115	120
Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser		
	130	135
Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala		
145	150	155
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu		
	165	170
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu		
	180	185
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser		
	195	200
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln		
	210	215
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr		
225	230	235
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr		
	245	250
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
	260	265
		270

ES 2 774 160 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
275 280 285

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
290 295 300

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
305 310 315 320

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
325 330 335

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
340 345 350

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys
355 360 365

Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp
370 375 380

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly
385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Val Leu
405 410 415

Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
420 425 430

Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln
435 440 445

Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn
450 455 460

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
465 470 475 480

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
485 490 495

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly
500 505 510

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
515 520 525

ES 2 774 160 T3

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 530 535 540
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 545 550 555 560
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 565 570 575
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 580 585 590
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 595 600 605
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 610 615 620
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 625 630 635 640
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 645 650 655
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 660 665 670
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 675 680 685
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 690 695 700
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 705 710 715 720
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 725 730 735
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu
 740 745 750
 Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val
 755 760 765
 Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His
 770 775 780

ES 2 774 160 T3

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
785 790 795 800

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
805 810 815

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
820 825 830

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
835 840 845

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
850 855 860

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
865 870 875 880

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
885 890 895

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
900 905 910

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
915 920 925

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
930 935 940

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
945 950 955 960

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
965 970

<210> 10

<211> 3402

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> GMCSFRss-CD19scFv-Gly4serconector-CD20scFv-CD8alfaBisagra-CD8alfaTM -41BB-CD3Zeta-T2A-EGFRt

<400> 10

ES 2 774 160 T3

atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgcgagctgc	cccacccgc	ctttctgctg	60
atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcgccagcct	gggcgaccgg	120

ES 2 774 160 T3

gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
aagcccgcag gcaccgtcaa gctgctgata taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacacctt	360
ggcggcggaa caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
ggcgagggca gcaccaaggc cgaggtgaag ctgcaggaaa gcggccctgg cctggtggcc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgactacggc	540
gtgagctgga tccggcagcc ccccaggaag ggctggaat ggctggcgt gatctggggc	600
agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
accagcgtga ccgtgagcag cggaggtggg ggatccgagg tgcagctgca gcagtctggg	840
gctgagctgg tgaagcctgg ggctcagtg aagatgtcct gcaaggcttc tggctacaca	900
tttaccagtt acaatatgca ctgggtaaag cagacacctg gacagggcct ggaatggatt	960
ggagctattt atccaggaaa tgggtgatact tcctacaatc agaagttcaa aggcaaggcc	1020
acattgactg cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc agctcagcag cctgacatct	1080
gaggactctg cggactatta ctgtgcaaga tctaattatt acggtagtag ctactggttc	1140
ttcgatgtct ggggcgcagg gaccacggtc accgtctcct caggcagtag tagcgggtgg	1200
ggctccgggg gcggttccgg tgggggcggc agcagcgaca ttgtgctgac ccaatctcca	1260
gctatcctgt ctgcatctcc aggggagaag gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt	1320
gtaaattaca tggactggtg ccagaagaag ccaggatcct cccccaacc ctggatttat	1380
gccacatcca acctggcttc tggagtcctt gctcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc	1440
tcttactctc tcacaatcag cagagtggag gctgaagatg ctgccactta ttactgccag	1500
cagtggagtt ttaatccacc cacgttcgga ggggggacca agctggaaat aaaagagagc	1560
aagtacggac cgccctgcc cccttgccct aagcctacca ccaccctgc ccctagacct	1620
ccaacacccg cccaacaat cgccagccag cctctgtctc tgaggcccga ggcttgtaga	1680
ccagctgctg gcggagccgt gcacaccaga ggactggatt tcgcctgcga catctacatc	1740
tgggcccctc tggccggcac atgtggcgtg ctgctgctga gcctcgtgat caccaagcgg	1800
ggcagaaaga aactgctgta catctttaag cagcccttca tgcggcccgt gcagaccacc	1860
caggaagagg acggctgctc ctgcagattc cccgaggaag aagaaggcgg ctgcgagctg	1920
agagtgaagt tcagcagatc cgccgacgcc cctgcctacc agcagggaca gaaccagctg	1980

ES 2 774 160 T3

tacaacgagc tgaacctggg cagacgggaa gactacgacg tgctggacaa gcggagagggc 2040
 cgggaccctg agatgggagg aaagcccaga agaaagaacc cccaggaagg cctgtataac 2100
 gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggaatgaa gggcgagcgg 2160
 agaagaggca agggccacga tggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggacacc 2220
 tatgacgccc tgcacatgca ggccctgcct ccaagactcg agggcggcgg agagggcaga 2280
 ggaagtcttc taacatgcgg tgacgtggag gagaatcccg gccctaggat gcttctcctg 2340
 gtgacaagcc ttctgctctg tgagttacca cccccagcat tcctcctgat cccacgcaaa 2400
 gtgtgtaacg gaataggat tggtgaattt aaagactcac tctccataaa tgctacgaat 2460
 attaaacact tcaaaaactg cacctccatc agtggcgatc tccacatcct gccggtggca 2520
 tttaggggtg actccttcac acatactcct cctctggatc cacaggaact ggatattctg 2580
 aaaaccgtaa aggaaatcac agggtttttg ctgattcagg cttggcctga aaacaggacg 2640
 gacctccatg cctttgagaa cctagaaatc atacgcgga ggaccaagca acatggtcag 2700
 ttttctcttg cagtcgtcag cctgaacata acatccttg gattacgctc cctcaaggag 2760
 ataagtgatg gagatgtgat aatttcagga aacaaaaatt tgtgctatgc aaatacaata 2820
 aactggaaaa aactgttttg gacctccgt cagaaaacca aaattataag caacagaggt 2880
 gaaaacagct gcaaggccac aggccaggtc tgccatgcct tgtgctccc cgagggctgc 2940
 tggggcccg agcccaggga ctgcgtctct tgccggaatg tcagccgagg cagggaatgc 3000
 gtggacaagt gcaaccttct ggagggtgag ccaagggagt ttgtggagaa ctctgagtgc 3060
 atacagtgc acccagagtg cctgcctcag gccatgaaca tcacctgcac aggacgggga 3120
 ccagacaact gtatccagtg tgcccactac attgacggcc cccactgcgt caagacctgc 3180
 ccggcaggag tcatgggaga aaacaacacc ctggtctgga agtacgcaga cgccggccat 3240
 gtgtgccacc tgtgccatcc aaactgcacc tacggatgca ctgggccagg tcttgaaggc 3300
 tgtccaacga atgggcctaa gatccgtcc atcgccactg ggatgggtgg ggcctcctc 3360
 ttgctgctgg tggtagccct ggggatcggc ctcttcatgt ga 3402

<210> 11

<211> 3402

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> GMCSFRss-CD19scFv-Gly4serconector-CD20scFv-CD8alfaBisagra-CD8alfaTM -41BB-CD3Zeta-T2A-EGFRt

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(3402)

<400> 11

ES 2 774 160 T3

atg ctg ctg ctg gtg acc agc ctg ctg ctg tgc gag ctg ccc cac ccc Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro 1 5 10 15	48
gcc ttt ctg ctg atc ccc gac atc cag atg acc cag acc acc tcc agc Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser 20 25 30	96
ctg agc gcc agc ctg ggc gac cgg gtg acc atc agc tgc cgg gcc agc Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser 35 40 45	144
cag gac atc agc aag tac ctg aac tgg tat cag cag aag ccc gac ggc Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly 50 55 60	192
acc gtc aag ctg ctg atc tac cac acc agc cgg ctg cac agc ggc gtg Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val 65 70 75 80	240
ccc agc cgg ttt agc ggc agc ggc tcc ggc acc gac tac agc ctg acc Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr 85 90 95	288
atc tcc aac ctg gaa cag gaa gat atc gcc acc tac ttt tgc cag cag Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln 100 105 110	336
ggc aac aca ctg ccc tac acc ttt ggc ggc gga aca aag ctg gaa atc Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile 115 120 125	384
acc ggc agc acc tcc ggc agc ggc aag cct ggc agc ggc gag ggc agc Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser 130 135 140	432
acc aag ggc gag gtg aag ctg cag gaa agc ggc cct ggc ctg gtg gcc Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala 145 150 155 160	480
ccc agc cag agc ctg agc gtg acc tgc acc gtg agc ggc gtg agc ctg Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu 165 170 175	528
ccc gac tac ggc gtg agc tgg atc cgg cag ccc ccc agg aag ggc ctg Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu 180 185 190	576
gaa tgg ctg ggc gtg atc tgg ggc agc gag acc acc tac tac aac agc Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser 195 200 205	624
gcc ctg aag agc cgg ctg acc atc atc aag gac aac agc aag agc cag Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln 210 215 220	672
gtg ttc ctg aag atg aac agc ctg cag acc gac gac acc gcc atc tac Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr 225 230 235 240	720
tac tgc gcc aag cac tac tac tac ggc ggc agc tac gcc atg gac tac Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr	768

ES 2 774 160 T3

	245	250	255	
tgg ggc cag ggc acc agc gtg acc gtg agc agc gga ggt ggt gga tcc				816
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser	260	265	270	
gag gtg cag ctg cag cag tct ggg gct gag ctg gtg aag cct ggg gcc				864
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	275	280	285	
tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac				912
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	290	295	300	
aat atg cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att				960
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	305	310	315	320
gga gct att tat cca gga aat ggt gat act tcc tac aat cag aag ttc				1008
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe	325	330	335	
aaa ggc aag gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac				1056
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	340	345	350	
atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gac tat tac tgt				1104
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys	355	360	365	
gca aga tct aat tat tac ggt agt agc tac tgg ttc ttc gat gtc tgg				1152
Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp	370	375	380	
ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggc agt act agc ggt ggt				1200
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly	385	390	395	400
ggc tcc ggg ggc ggt tcc ggt ggg ggc ggc agc agc gac att gtg ctg				1248
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Val Leu	405	410	415	
acc caa tct cca gct atc ctg tct gca tct cca ggg gag aag gtc aca				1296
Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr	420	425	430	
atg act tgc agg gcc agc tca agt gta aat tac atg gac tgg tac cag				1344
Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln	435	440	445	
aag aag cca gga tcc tcc ccc aaa ccc tgg att tat gcc aca tcc aac				1392
Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn	450	455	460	
ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc				1440
Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr	465	470	475	480
tct tac tct ctc aca atc agc aga gtg gag gct gaa gat gct gcc act				1488
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr	485	490	495	
tat tac tgc cag cag tgg agt ttt aat cca ccc acg ttc gga ggg ggg				1536

ES 2 774 160 T3

Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	
			500					505					510			
acc	aag	ctg	gaa	ata	aaa	gag	agc	aag	tac	gga	ccg	ccc	tgc	ccc	cct	1584
Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	
		515					520					525				
tgc	cct	aag	cct	acc	acc	acc	cct	gcc	cct	aga	cct	cca	aca	ccc	gcc	1632
Cys	Pro	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	
	530						535				540					
cca	aca	atc	gcc	agc	cag	cct	ctg	tct	ctg	agg	ccc	gag	gct	tgt	aga	1680
Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	
545					550					555					560	
cca	gct	gct	ggc	gga	gcc	gtg	cac	acc	aga	gga	ctg	gat	ttc	gcc	tgc	1728
Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	
			565						570					575		
gac	atc	tac	atc	tgg	gcc	cct	ctg	gcc	ggc	aca	tgt	ggc	gtg	ctg	ctg	1776
Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	
			580					585					590			
ctg	agc	ctc	gtg	atc	acc	aag	cgg	ggc	aga	aag	aaa	ctg	ctg	tac	atc	1824
Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	
		595					600					605				
ttt	aag	cag	ccc	ttc	atg	cgg	ccc	gtg	cag	acc	acc	cag	gaa	gag	gac	1872
Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	
	610					615					620					
ggc	tgc	tcc	tgc	aga	ttc	ccc	gag	gaa	gaa	gaa	ggc	ggc	tgc	gag	ctg	1920
Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	
	625				630					635					640	
aga	gtg	aag	ttc	agc	aga	tcc	gcc	gac	gcc	cct	gcc	tac	cag	cag	gga	1968
Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	
				645					650					655		
cag	aac	cag	ctg	tac	aac	gag	ctg	aac	ctg	ggc	aga	cgg	gaa	gag	tac	2016
Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	
			660					665					670			
gac	gtg	ctg	gac	aag	cgg	aga	ggc	cgg	gac	cct	gag	atg	ggc	gga	aag	2064
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	
		675					680					685				
ccc	aga	aga	aag	aac	ccc	cag	gaa	ggc	ctg	tat	aac	gaa	ctg	cag	aaa	2112
Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	
	690					695					700					
gac	aag	atg	gcc	gag	gcc	tac	agc	gag	atc	gga	atg	aag	ggc	gag	cgg	2160
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	
					710				715						720	
aga	aga	ggc	aag	ggc	cac	gat	ggc	ctg	tac	cag	ggc	ctg	agc	acc	gcc	2208
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	
				725					730					735		
acc	aag	gac	acc	tat	gac	gcc	ctg	cac	atg	cag	gcc	ctg	cct	cca	aga	2256
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	
			740					745					750			

ES 2 774 160 T3

ctc gag ggc ggc gga gag ggc aga gga agt ctt cta aca tgc ggt gac Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp 755 760 765	2304
gtg gag gag aat ccc ggc cct agg atg ctt ctc ctg gtg aca agc ctt Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu 770 775 780	2352
ctg ctc tgt gag tta cca cac cca gca ttc ctc ctg atc cca cgc aaa Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys 785 790 795 800	2400
gtg tgt aac gga ata ggt att ggt gaa ttt aaa gac tca ctc tcc ata Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile 805 810 815	2448
aat gct acg aat att aaa cac ttc aaa aac tgc acc tcc atc agt ggc Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly 820 825 830	2496
gat ctc cac atc ctg ccg gtg gca ttt agg ggt gac tcc ttc aca cat Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His 835 840 845	2544
act cct cct ctg gat cca cag gaa ctg gat att ctg aaa acc gta aag Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys 850 855 860	2592
gaa atc aca ggg ttt ttg ctg att cag gct tgg cct gaa aac agg acg Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr 865 870 875 880	2640
gac ctc cat gcc ttt gag aac cta gaa atc ata cgc ggc agg acc aag Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys 885 890 895	2688
caa cat ggt cag ttt tct ctt gca gtc gtc agc ctg aac ata aca tcc Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser 900 905 910	2736
ttg gga tta cgc tcc ctc aag gag ata agt gat gga gat gtg ata att Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile 915 920 925	2784
tca gga aac aaa aat ttg tgc tat gca aat aca ata aac tgg aaa aaa Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys 930 935 940	2832
ctg ttt ggg acc tcc ggt cag aaa acc aaa att ata agc aac aga ggt Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly 945 950 955 960	2880
gaa aac agc tgc aag gcc aca ggc cag gtc tgc cat gcc ttg tgc tcc Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser 965 970 975	2928
ccc gag ggc tgc tgg ggc ccg gag ccc agg gac tgc gtc tct tgc cgg Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg 980 985 990	2976
aat gtc agc cga ggc agg gaa tgc gtg gac aag tgc aac ctt ctg gag Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu 995 1000 1005	3024

ES 2 774 160 T3

ggt gag cca agg gag ttt gtg gag aac tct gag tgc ata cag tgc	3069
Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys	
1010 1015 1020	
cac cca gag tgc ctg cct cag gcc atg aac atc acc tgc aca gga	3114
His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly	
1025 1030 1035	
cgg gga cca gac aac tgt atc cag tgt gcc cac tac att gac ggc	3159
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly	
1040 1045 1050	
ccc cac tgc gtc aag acc tgc ccg gca gga gtc atg gga gaa aac	3204
Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn	
1055 1060 1065	
aac acc ctg gtc tgg aag tac gca gac gcc ggc cat gtg tgc cac	3249
Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His	
1070 1075 1080	
ctg tgc cat cca aac tgc acc tac gga tgc act ggg cca ggt ctt	3294
Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu	
1085 1090 1095	
gaa ggc tgt cca acg aat ggg cct aag atc ccg tcc atc gcc act	3339
Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr	
1100 1105 1110	
ggg atg gtg ggg gcc ctc ctc ttg ctg ctg gtg gtg gcc ctg ggc	3384
Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly	
1115 1120 1125	
atc ggc ctc ttc atg tga	3402
Ile Gly Leu Phe Met	
1130	

<210> 12

<211> 1133

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 12

ES 2 774 160 T3

Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro
1				5					10					15	
Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser
			20					25					30		
Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser
		35					40					45			
Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly
50						55					60				

ES 2 774 160 T3

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
 100 105 110
 Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 130 135 140
 Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
 165 170 175
 Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
 180 185 190
 Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
 195 200 205
 Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 210 215 220
 Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 245 250 255
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 260 265 270
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 275 280 285
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 290 295 300
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 305 310 315 320

ES 2 774 160 T3

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 325 330 335
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 340 345 350
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys
 355 360 365
 Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp
 370 375 380
 Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Val Leu
 405 410 415
 Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
 420 425 430
 Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr Gln
 435 440 445
 Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn
 450 455 460
 Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 465 470 475 480
 Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
 485 490 495
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly
 500 505 510
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 515 520 525
 Cys Pro Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 530 535 540
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 545 550 555 560
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

ES 2 774 160 T3

[illegible]

ES 2 774 160 T3

Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly
 820 825 830
 Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His
 835 840 845
 Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys
 850 855 860
 Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr
 865 870 875 880
 Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys
 885 890 895
 Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser
 900 905 910
 Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile
 915 920 925
 Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys
 930 935 940
 Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly
 945 950 955 960
 Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser
 965 970 975
 Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg
 980 985 990
 Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu
 995 1000 1005
 Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys
 1010 1015 1020
 His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly
 1025 1030 1035
 Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly
 1040 1045 1050
 Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
 1055 1060 1065

ES 2 774 160 T3

Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His
1070 1075 1080

Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu
1085 1090 1095

Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr
1100 1105 1110

Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
1115 1120 1125

Ile Gly Leu Phe Met
1130

<210> 13

<211> 1146

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> T2A-EGFRt

<400> 13

ES 2 774 160 T3

```

ctcgagggcg gcggagaggg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat      60
cccgcccta ggatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca      120
gcattcctcc tgatccacg caaagtgtgt aacggaatag gtattggtga atttaaagac      180
tcactctcca taaatgctac gaatattaaa cacttcaaaa actgcacctc catcagtggc      240
gatctccaca tcctgccggt ggcathtagg ggtgactcct tcacacatac tcctcctctg      300
gatccacagg aactggatat tctgaaaacc gtaaaggaaa tcacagggtt tttgctgatt      360
caggcttggc ctgaaaacag gacggacctc catgcctttg agaacctaga aatcatcgc      420
ggcaggacca agcaacatgg tcagttttct cttgcagtcg tcagcctgaa cataacatcc      480
ttgggattac gctccctcaa ggagataagt gatggagatg tgataatttc aggaaacaaa      540
aatgtgtgct atgcaaatac aataaactgg aaaaaactgt ttgggacctc cggtcagaaa      600
accaaatta taagcaacag aggtgaaaac agctgcaagg ccacaggcca ggtctgccat      660
gccttgtgct ccccgaggg ctgctggggc ccggagccca gggactgcgt ctcttgccgg      720
aatgtcagcc gaggcaggga atgctggac aagtgaacc ttctggaggg tgagccaagg      780
gagtttgtgg agaactctga gtgcatacag tgccaccag agtgctgcc tcaggccatg      840
aacatcacct gcacaggacg gggaccagac aactgtatcc agtgtgcca ctacattgac      900
ggccccact gcgtcaagac ctgccggca ggagtcatgg gagaaaacaa caccctggtc      960
tggaagtacg cagacgccgg ccatgtgtgc cacctgtgcc atccaaactg cacctacgga      1020
tgcaactggc caggtcttga aggctgtcca acgaatgggc ctaagatccc gtccatcgcc      1080
actgggatgg tgggggccct cctcttgctg ctggtggtgg ccctggggat cggcctcttc      1140
atgtga                                          1146

```

5 <210> 14
 <211> 1146
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> T2A-EGFRt

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1146)

<400> 14

ES 2 774 160 T3

ctc gag ggc ggc gga gag ggc aga gga agt ctt cta aca tgc ggt gac Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp 1 5 10 15	48
gtg gag gag aat ccc ggc cct agg atg ctt ctc ctg gtg aca agc ctt Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu 20 25 30	96
ctg ctc tgt gag tta cca cac cca gca ttc ctc ctg atc cca cgc aaa Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys 35 40 45	144
gtg tgt aac gga ata ggt att ggt gaa ttt aaa gac tca ctc tcc ata Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile 50 55 60	192
aat gct acg aat att aaa cac ttc aaa aac tgc acc tcc atc agt ggc Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly 65 70 75 80	240
gat ctc cac atc ctg ccg gtg gca ttt agg ggt gac tcc ttc aca cat Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His 85 90 95	288
act cct cct ctg gat cca cag gaa ctg gat att ctg aaa acc gta aag Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys 100 105 110	336
gaa atc aca ggg ttt ttg ctg att cag gct tgg cct gaa aac agg acg Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr 115 120 125	384
gac ctc cat gcc ttt gag aac cta gaa atc ata cgc ggc agg acc aag Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys 130 135 140	432
caa cat ggt cag ttt tct ctt gca gtc gtc agc ctg aac ata aca tcc Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser 145 150 155 160	480
ttg gga tta cgc tcc ctc aag gag ata agt gat gga gat gtg ata att	528

ES 2 774 160 T3

Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile	
165 170 175	
tca gga aac aaa aat ttg tgc tat gca aat aca ata aac tgg aaa aaa	576
Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys	
180 185 190	
ctg ttt ggg acc tcc ggt cag aaa acc aaa att ata agc aac aga ggt	624
Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly	
195 200 205	
gaa aac agc tgc aag gcc aca ggc cag gtc tgc cat gcc ttg tgc tcc	672
Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser	
210 215 220	
ccc gag ggc tgc tgg ggc ccg gag ccc agg gac tgc gtc tct tgc cgg	720
Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg	
225 230 235 240	
aat gtc agc cga ggc agg gaa tgc gtg gac aag tgc aac ctt ctg gag	768
Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu	
245 250 255	
ggt gag cca agg gag ttt gtg gag aac tct gag tgc ata cag tgc cac	816
Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His	
260 265 270	
cca gag tgc ctg cct cag gcc atg aac atc acc tgc aca gga cgg gga	864
Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly	
275 280 285	
cca gac aac tgt atc cag tgt gcc cac tac att gac ggc ccc cac tgc	912
Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys	
290 295 300	
gtc aag acc tgc ccg gca gga gtc atg gga gaa aac aac acc ctg gtc	960
Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val	
305 310 315 320	
tgg aag tac gca gac gcc ggc cat gtg tgc cac ctg tgc cat cca aac	1008
Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn	
325 330 335	
tgc acc tac gga tgc act ggg cca ggt ctt gaa ggc tgt cca acg aat	1056
Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn	
340 345 350	
ggg cct aag atc ccg tcc atc gcc act ggg atg gtg ggg gcc ctc ctc	1104
Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu	
355 360 365	
ttg ctg ctg gtg gtg gcc ctg ggg atc ggc ctc ttc atg tga	1146
Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met	
370 375 380	

<210> 15

<211> 381

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 774 160 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 15

ES 2 774 160 T3

Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp	1	5	10	15
Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Arg	Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	20	25	30	
Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro	Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Arg	Lys	35	40	45	
Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	50	55	60	
Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	65	70	75	80
Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	85	90	95	
Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	100	105	110	
Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr	115	120	125	
Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys	130	135	140	
Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser	145	150	155	160
Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile	165	170	175	
Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys	180	185	190	
Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly	195	200	205	
Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser	210	215	220	
Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg	225	230	235	240

ES 2 774 160 T3

Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu
245 250 255

Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His
260 265 270

Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly
275 280 285

Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys
290 295 300

Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val
305 310 315 320

Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn
325 330 335

Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn
340 345 350

Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu
355 360 365

Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
370 375 380

REIVINDICACIONES

1. Célula T genéticamente modificada que expresa un receptor de antígenos quimérico (CAR) biespecífico enlazado al receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt), donde el producto de expresión tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 3 o 12.

5 2. Polinucleótido codificante de:

- a. un CAR biespecífico; y
- b. un receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt);

donde el polinucleótido tiene la secuencia de SEQ ID N.ºs 1 o 10.

3. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 2.

10 4. Vector según la reivindicación 3, donde el vector es un transposón plasmídico, un vector lentiviral, un vector retroviral, un vector de virus espumoso, un vector adenoviral, un vector de virus de ARN, un vector de virus de la viruela, un vector de virus de herpes o un vector de virus adenoasociado (AAV).

5. Célula T genéticamente modificada según la reivindicación 1, donde la célula es una célula T virgen, una célula T de memoria central o una célula T de memoria efectora.

15 6. Composición farmacéutica, que comprende:

- a. una célula T genéticamente modificada, según la reivindicación 1; y
- b. un soporte farmacéuticamente aceptable.

7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6 para usar en el tratamiento de un cáncer.

Figura 1

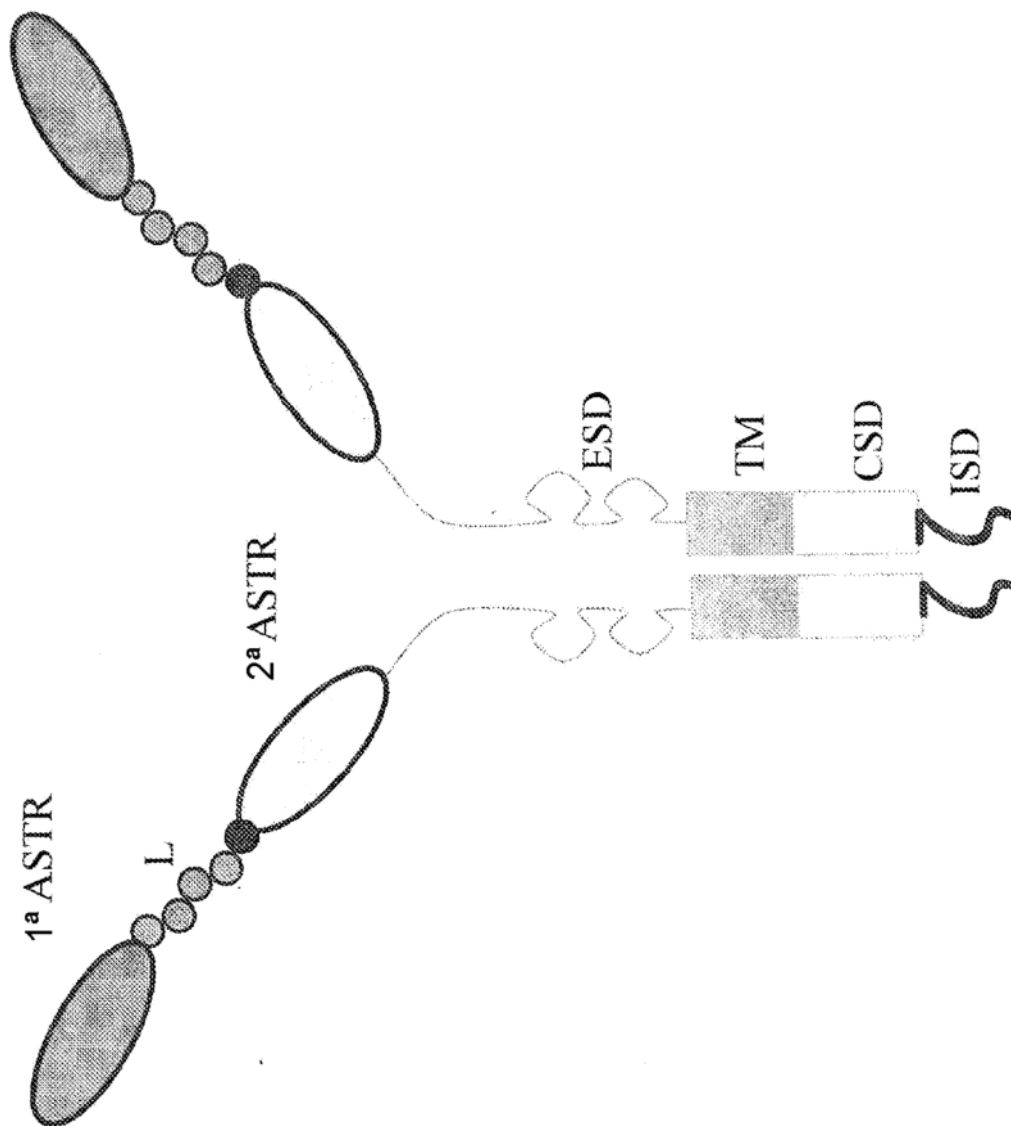


Figura 2

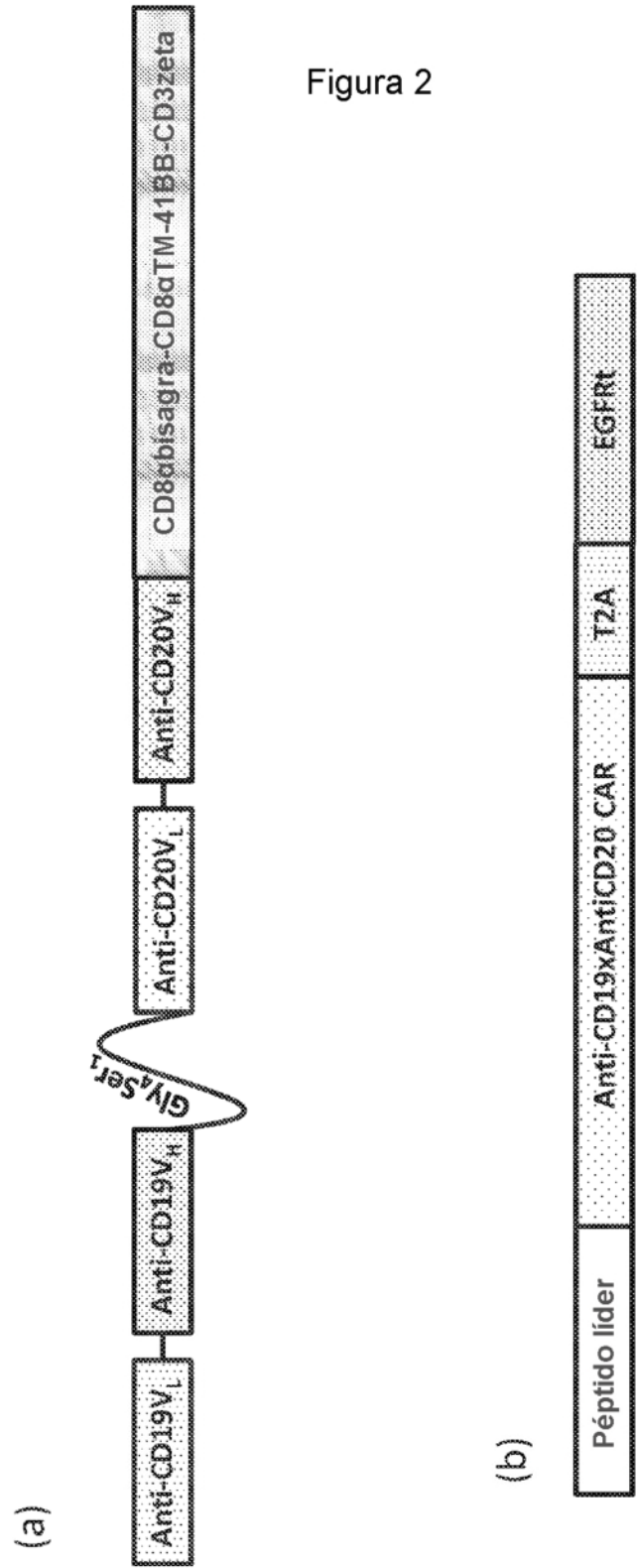


Figura 4

**GMCSFRs.s CD19scFv-Gly4Ser1conector-CD20scFv-IgG4Bisagra-CD28tm-41BB-
CD3zeta-T2A-EGFRt_epHIV7**

DNA: ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC
 AA: M L L L V T S L L L C E L P H P A
 DNA: TTTCTGCTGATCCCCATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTG
 AA: F L L I P M T Q T T S S L S A S L
 DNA: GGCAGCCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTAC
 AA: G D R V T I S C R A S Q D I S K Y
 DNA: CTGAAC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGACGGCACCCTCAAGCTGCTGATCTAC
 AA: L N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y
 DNA: CACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGC
 AA: H T S R L H S G V P S R F S G S G
 DNA: TCCGGCACCAGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATC
 AA: S G T D Y S L T I S N L E Q E D I
 DNA: GCCACCTACTTTTGGCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACCTTTGGCGGC
 AA: A T Y F C Q Q G N T L P Y T F G G
 DNA: GGAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCCTGGC
 AA: G T K L E I T G S T S G S G K P G
 DNA: AGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCCCT
 AA: S G E G S T K G E V K L Q E S G P
 DNA: GGCTTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGC
 AA: G L V A P S Q S L S V T C T V S G
 DNA: GTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGAAG
 AA: V S L P D Y G V S W I R Q P P R K
 DNA: GGCTTGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAAC
 AA: G L E W L G V I W G S E T T Y Y N
 DNA: AGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGAGCCAG
 AA: S A L K S R L T I I K D N S K S Q
 DNA: GTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACCCGCCATCTACTAC
 AA: V F L K M N S L Q T D D T A I Y Y
 DNA: TCGCCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGC
 AA: C A K H Y Y Y G G S Y A M D Y W G
 DNA: CAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGGAGGTGGTGGATCCGAGGTGCAG
 AA: Q G T S V T V S S G G G G S E V Q
 DNA: CTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATG
 AA: L Q Q S G A E L V K P G A S V K M
 DNA: TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTA
 AA: S C K A S G Y T F T S Y N M H W V
 DNA: AAGCAGACACCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCAGGA
 AA: K Q T P G Q G L E W I G A I Y P G
 DNA: AATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACT
 AA: N G D T S Y N Q K F K G K A T L T
 DNA: GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCT
 AA: A D K S S S T A Y M Q L S S L T S
 DNA: GAGGACTCTGCGGACTATTAAGTGTGCAAGATCTAATTATACGGTAGTAGC
 AA: E D S A D Y Y C A R S N Y Y G S S
 DNA: TACTGGTCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
 AA: Y F D V W G A G T T V T V S S
 DNA: GGCAGTACTACGGTGGTGGCTCCGGGGCGGTTCCGGTGGGGCGGCAGC
 AA: G S T S G G G S G G G S G G G S
 DNA: AGCGACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTATCCTGTCTGCATCTCCAGGG
 AA: S D I V L T Q S P A I L S A S P G
 DNA: GAGAAGGTACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAATTAATACATGGAC
 AA: E K V T M T C R A S S S V N Y M D

ES 2 774 160 T3

DNA: TGGTACCAGAAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCCTGGATTATGCCACA
 AA: W Y Q K K P G S S P K P W I Y A T
 DNA: TCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG
 AA: S N L A S G V P A R F S G S G S G
 DNA: ACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACT
 AA: T S Y S L T I S R V E A E D A A T
 DNA: TATTACTGCCAGCAGTGGAGTTTTAATCCACCCACGTTCCGAGGGGGGACC
 AA: Y Y C Q Q W S F N P P T F G G G T
 DNA: AAGCTGGAAATAAAAGAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT
 AA: K L E I K E S K Y G P P C P P C P
 DNA: ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGGCGTGGCCTGCTACAGCCTG
 AA: M F W V L V V V G G V L A C Y S L
 DNA: CTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAA
 AA: L V T V A F I I F W V K R G R K K
 DNA: CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAA
 AA: L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q
 DNA: GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGT
 AA: E E D G C S C R F P E E E E G G C
 DNA: GAACTGCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAG
 AA: E L R V K F S R S A D A P A Y Q Q
 DNA: GGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAAGGAAGAGTAC
 AA: G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y
 DNA: GACGTCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCT
 AA: D V L D K R R G R D P E M G G K P
 DNA: CGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAAGTGCAGAAAGACAAG
 AA: R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K
 DNA: ATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGAGGCGGGCC
 AA: M A E A Y S E I G M K G E R R R G
 DNA: AAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACC
 AA: K G H D G L Y Q G L S T A T K D T
 DNA: TACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCAAGGCTCGAGGGCGGCGGA
 AA: Y D A L H M Q A L P P R L E G G G
 DNA: GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGC
 AA: E G R G S L L T C G D V E E N P G
 DNA: CCTAGGATGCTTCTCCTGCTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACAC
 AA: P R M L L L V T S L L L C E L P H
 DNA: CCAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGT
 AA: P A F L L I P R K V C N G I G I G
 DNA: GAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAA
 AA: E F K D S L S I N A T N I K H F K
 DNA: AACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGG
 AA: N C T S I S G D L H I L P V A F R
 DNA: GGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAAGTGGATATT
 AA: G D S F T H T P P L D P Q E L D I
 DNA: CTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATTCCAGGCTTGGCCT
 AA: L K T V K E I T G F L L I Q A W P
 DNA: GAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGC
 AA: E N R T D L H A F E N L E I I R G
 DNA: AGGACCAAGCAACATGGTCAAGTTTTCTCTGCAAGTCGTCAGCCTGAACATA
 AA: R T K Q H G Q F S L A V V S L N I
 DNA: ACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGATGTGATA
 AA: T S L G L R S L K E I S D G D V I
 DNA: ATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAA
 AA: I S G N K N L C Y A N T I N W K K
 DNA: CTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAATTATAAGCAACAGAGGTGAA
 AA: L F G T S G Q K T K I I S N R G E

ES 2 774 160 T3

DNA: AACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAG
 AA: N S C K A T G Q V C H A L C S P E
 DNA: GGCTGCTGGGGCCCCGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGC
 AA: G C W G P E P R D C V S C R N V S
 DNA: CGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGG
 AA: R G R E C V D K C N L L E G E P R
 DNA: GAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGCCT
 AA: E F V E N S E C I Q C H P E C L P
 DNA: CAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATCCAG
 AA: Q A M N I T C T G R G P D N C I Q
 DNA: TGTGCCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCCGGCAGGA
 AA: C A H Y I D G P H C V K T C P A G
 DNA: GTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCAT
 AA: V M G E N N T L V W K Y A D A G H
 DNA: GTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGT
 AA: V C H L C H P N C T Y G C T G P G
 DNA: CTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCCTCCATCGCCACTGGG
 AA: L E G C P T N G P K I P S I A T G
 DNA: ATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTC
 AA: M V G A L L L L L V V A L G I G L
 DNA: TTCATGTGA
 AA: F M *

Figura 5

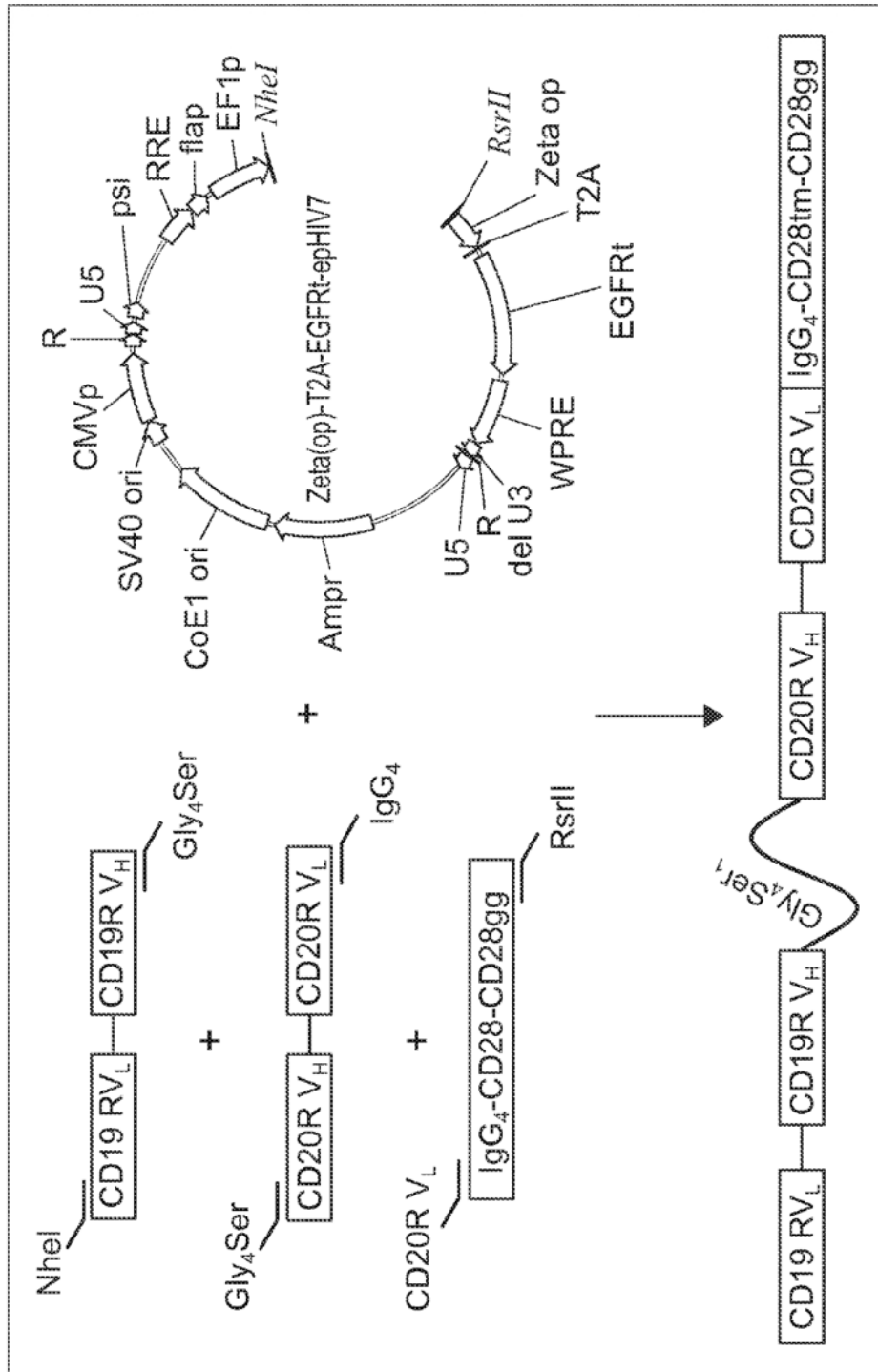


Figura 7

IgG4bisagra-CD28tm-41BB-CD3Zeta

gagagcaagtacggaccgccctgcccccttgccctatgttctgggtgctggtggtggtcgaggcgtgctggcctgctacagc
ctgctggcaccgtggccttcatcatcttttgggtgaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgaga
ccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgcgggtgaa
gttcagcagaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggga
agagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcgggaagaacccccaggaa
ggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcagatcggcatgaaggcgagcggaggcgggg
caaggggccacgagcgcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgcctgcacatgcaggccctgccc
ccaagg

DNA: GAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCTATGTTCTGGGTGCTG
AA: E S K Y G P P C P P C P M F W V L

DNA: GTGGTGGTGGGAGGCGTGTGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCC
AA: V V V G G V L A C Y S L L V T V A

DNA: TTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTC
AA: F I I F W V K R G R K K L L Y I F

DNA: AAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT
AA: K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C

DNA: AGCTGCCGATTTCAGAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCCGGTGAAG
AA: S C R F P E E E E G G C E L R V K

DNA: TTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTG
AA: F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L

DNA: TACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAG
AA: Y N E L N L G R R E E Y D V L D K

DNA: CGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCC
AA: R R G R D P E M G G K P R R K N P

DNA: CAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTAC
AA: Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y

DNA: AGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGCCACGACGGC
AA: S E I G M K G E R R R G K G H D G

DNA: CTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCAC
AA: L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H

DNA: ATGCAGGCCCTGCCCCCAAGG
AA: M Q A L P P R

Figura 8

GMCSFRss CD19scFv-Gly4Ser conector-CD20scFv-hulgG4bisagra/CH2/CH3-
CD28tm/CD28cito-41BB-CD3Zeta

atgctgctgctggtagaccagcctgctgctgctgagctgccccaccccgcccttctgctgatcccgacatccagatgaccagaga
ccacctccagcctgagcgccagcctggcgaccgggtgaccatcagctgcccggccagccagacatcagcaagtacctga
actggtatcagcagaagcccagcgccacgctcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcgggctgcccagcc
ggtttagcgccagcggtccggcaccgactacagcctgacatctccaaactggaaacaggaagatatccgacactctttgcc
agcaggggcaacacactgcccacaccttggcgccgggaacaaagctggaaatcacgggcagcacctccggcagcgccgaagc
ctggcagcgggcagggcagcaccgaagggcgagggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctgggtggccccagccagag
cctgagcgtgacctgcaccgtgagcgcgctgagcctgcccactacggcgctgagctggatccggcagccccaggaaggg
cctggaatggctggcgctgctgctggcgagcagaccactactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaag
gacaacagcaagagccaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcact
actactacggcgcgagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagcgagggtgggtgacccg
agggtcagctgcagcagctgctggcgctgagctgggtgaagcctggggcctcagtgaaatgctctgcaaggctctgctacacat
ttaccagttacaatagcactgggtaaaagcagacacctggacagggcctggaatggatggagctatttatccaggaaatgggtga
tacttcciaacaatcagaagtccaaggcaaggccacatlgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcag
cctgacatcagaggactcgcggactattactgtgcaagatctaattattacggtagtactggttctcgtatgctggggcgca
gggaccaacggtcaccgtctcctcaggcagctactagcgggtgggtgcctccggggcggttccgggtggggcgccagcagcagc
attgtgctgacccaatctccagctatccgtctgcatctccaggggagaaggtcacaatgactgcaggggcagctcaagttaa
attacatggactggtagcagaagaagccaggatctccccaaacctggatttatgccacatccaaacctggcttctggagtcct
gtcgtctcagtgaggctggttctggtgacccctctactctcacaatcagcagagtgagggtgaagatgctgcccacttattactg
ccagcagtgagggtttaaaccacacgttccggaggggggaccnaagctggaaataaaagagagcaagtacggaccgcccctgc
ccccctgcccctgcccggagttctggcggaaccagcgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatcagc
cggacccccgaggtgacctgctgggtgggtgacgtgagccaggaagatcccgaggtccagttcaattggtacgtggacggcg
tggaaagtgcacaacccaagaccaagcccagagaggaacagttcaacagcaacctaccgggtggtgtctgtgctgacctgct
gcaccaggactggctgaacggcaagaalacaagtgcaaggtgtccaaagggcctgcccagcagcatcgaagaagaccat
cagcaaggccaaggggcagccctcgcgagcccccaggtgtacacctgctcctcccaggaagagatgaccaagaaccaggt
gtccctgacctgcctgggtgaagggtcttaccacagcgacatcgccgtggagtgaggagcaacggccagcctgagaacaac
tacaagaccacccctcccgtgctggacagcgagggcagcttcttctgtacagccggctgacctgtgacaagagccgggtggc
aggaaggcaacgtcttttagctgcagcgtgatgcacgagggcctgcacaaccactacaccagaagagcctgagcctgtccctg
ggcaagatgttctgggtgctgtgtgtgtggcggggtgctgctgctacagcctgctgtgagcagtggtgaccttcatcttttg
gggtcggagcaagcgagcagagggggccacagcgactacatgaacatgacccccagacggcctggccccacccgggaag
cactaccagccctacgccccacccagggaatttgcgctacagaagcaaacggggcagaagaactcctgtatatattcaa
acaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcagaagaagaagaggaggt
gtgaactgcgggtgaagttcagcagaagcgcgacgcccctgctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaa
cctgggcagaaggggaaggtacgactcctggataagcggagagggccgggacctgagatggcgccgaagcctcggcg
aagaacccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaagacaagatggccgagcctacagcgagatcgcatgaaggg
cgagcggaggcggggcaaggccacgacggcctgtatcaggcgctgtccaccgccaccaaggatacctacgacggcctgc
acatgcaggccctgcccccaagg

Figura 9

GMCSFRss-CD19scFv-Gly4Ser conector-CD20scFv-huIgG4bisagra/CH2/CH3-
CD28tm/CD28cito-41BB-CD3Zeta

DNA: ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC
AA: M L L L V T S L L L C E L P H P A

DNA: TTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGC
AA: F L L I P D I Q M T Q T T S S L S

DNA: GCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATC
AA: A S L G D R V T I S C R A S Q D I

DNA: AGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTG
AA: S K Y L N W Y Q Q K P D G T V K L

DNA: CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTAGC
AA: L I Y H T S R L H S G V P S R F S

DNA: GGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAG
AA: G S G S G T D Y S L T I S N L E Q

DNA: GAAGATATCGCCACCTACTTTTCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACC
AA: E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T

DNA: TTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGC
AA: F G G G T K L E I T G S T S G S G

DNA: AAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAA
AA: K P G S G E G S T K G E V K L Q E

DNA: AGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACC
AA: S G P G L V A P S Q S L S V T C T

DNA: GTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCC
AA: V S G V S L P D Y G V S W I R Q P

DNA: CCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACC
AA: P R K G L E W L G V I W G S E T T

DNA: TACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGC
AA: Y Y N S A L K S R L T I I K D N S

DNA: AAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC
AA: K S Q V F L K M N S L Q T D D T A

DNA: ATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGAC
AA: I Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D

DNA: TACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGAGGTGGTGGATCC
AA: Y W G Q G T S V T V S S G G G G S

DNA: GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCA
AA: E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S

DNA: GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATG
AA: V K M S C K A S G Y T F T S Y N M

ES 2 774 160 T3

DNA: CACTGGGTAAAGCAGACACCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATT
 AA: H W V K Q T P G Q G L E W I G A I

DNA: TATCCAGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAAGTTCAAAGCCAAGGCC
 AA: Y P G N G D T S Y N Q K F K G K A

DNA: ACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGC
 AA: T L T A D K S S S T A Y M Q L S S

DNA: CTGACATCTGAGGACTCTGCGGACTATTACTGTGCAAGATCTAATTATTAC
 AA: L T S E D S A D Y Y C A R S N Y Y

DNA: GGTAGTAGCTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACC
 AA: G S S Y W F F D V W G A G T T V T

DNA: GTCTCCTCAGGCAGTACTAGCGGTGGTGGCTCCGGGGGCGGTTCCGGTGGG
 AA: V S S G S T S G G G S G G G S G G

DNA: GCGGCAGCAGCGACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTATCCTGTCTGCA
 AA: G G S S D I V L T Q S P A I L S A

DNA: TCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAT
 AA: S P G E K V T M T C R A S S S V N

DNA: TACATGGACTGGTACCAGAAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCTGGATT
 AA: Y M D W Y Q K K P G S S P K P W I

DNA: TATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGT
 AA: Y A T S N L A S G V P A R F S G S

DNA: GGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGAT
 AA: G S G T S Y S L T I S R V E A E D

DNA: GCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTTTTAATCCACCCACGTTCCGA
 AA: A A T Y Y C Q Q W S F N P P T F G

DNA: GGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAGAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGCCCC
 AA: G G T K L E I K E S K Y G P P C P

DNA: CCTTGCCCTGCCCCGAGTTCTTGGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCC
 AA: P C P A P E F L G G P S V F L F P

DNA: CCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGC
 AA: P K P K D T L M I S R T P E V T C

DNA: GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTAC
 AA: V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y

DNA: GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAG
 AA: V D G V E V H N A K T K P R E E Q

DNA: TTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGAC
 AA: F N S T Y R V V S V L T V L H Q D

DNA: TGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC
 AA: W L N G K E Y K C K V S N K G L P

ES 2 774 160 T3

DNA: AGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCC
 AA: S S I E K T I S K A K G Q P R E P

DNA: CAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
 AA: Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V

DNA: TCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
 AA: S L T C L V K G F Y P S D I A V E

DNA: TGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCCGTG
 AA: W E S N G Q P E N N Y K T T P P V

DNA: CTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAG
 AA: L D S D G S F F L Y S R L T V D K

DNA: AGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC
 AA: S R W Q E G N V F S C S V M H E A

DNA: CTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG
 AA: L H N H Y T Q K S L S L S L G K M

DNA: TTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGGGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
 AA: F W V L V V V G G V L A C Y S L L

DNA: GTGACACTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCAGAGGC
 AA: V T V A F I I F W V R S K R S R G

DNA: GGCCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGACGGCCTGGCCCCACCCGG
 AA: G H S D Y M N M T P R R P G P T R

DNA: AAGCACTACCAGCCCTACGCCCCACCCAGGGACTTTGCCGCTACAGAAGC
 AA: K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S

DNA: AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGA
 AA: K R G R K K L L Y I F K Q P F M R

DNA: CCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA
 AA: P V Q T T Q E E D G C S C R F P E

DNA: GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGAC
 AA: E E E G G C E L R V K F S R S A D

DNA: GCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTG
 AA: A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L

DNA: GGCAGAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCCT
 AA: G R R E E Y D V L D K R R G R D P

DNA: GAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAAC
 AA: E M G G K P R R K N P Q E G L Y N

DNA: GAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAG
 AA: E L Q K D K M A E A Y S E I G M K

DNA: GGCGAGCGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCC
 AA: G E R R R G K G H D G L Y Q G L S

ES 2 774 160 T3

DNA: ACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCA
AA: T A T K D T Y D A L H M Q A L P F

DNA: AGG
AA: R

Figura 10

GMCSFRss-CD19scFv-Gly4ser conector-CD20scFv-CD8alfaBisagra-CD8alfaTM-41BB-CD3Zeta-T2A-EGFRt

atgctgctgctggtagaccagcctgctgctgctgcgagctgccccaccccgctttctgctgatccccgacatecagatgaccaga
ccacctccagcctgagcgccagcctggggcaccgggtgaccatcagctgcccggccagccaggacatcagcaagtacctga
actggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgctatccacacacagccggctgcacagcggcgtgcccagcc
ggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgacctctccaaacctggaaacagggaagatafcgccacctactttgcc
agcagggaacacactgcccacacctttggcggcggaacaaagctggaatcaccggcagcaccctccggcagcggcgaagc
ctggcagcggcgagggcagcaccgaagggcgagggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctgggtggccccagccagag
cctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccactacggcgtgagctggatccggcagcccccaagggg
cctggaatggctggcgtgatctggggcagcgagaccacctactacaacagcggcctgaagagccggctgacctatcaag
gacaacagcaagagccaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacacggccatctactactgcccgaagcact
actactacggcgccagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagcggaggtggtgatccg
aggtgcagctgcagcagctggtggcgtgagctggtgaagcctggggcctcagtgaaagatgctctgcaaggctctggtctacat
ttaccagttacaatatgcactgggtaaagcagacacctggacagggcctggaaatggatggagctattatccaggaaatggtga
tacttctacaatcagaagtccaaggcaaggccacattgactgcagacaaatcctccagcagcagcctacatgcagctcagcag
cctgacatcagaggactctgcccacttactgtgcaagatcaatfatacggtagtagctactgggtctctgatgctggggcgga
gggaccacggctcaccgtctcctcaggcagctagcgggtgggtggcctcggggggcggttccgggtggggcgccagcagcgac
attgtgctgacccaafctccagctatcctgtctgcatctccaggggagaagggtcacaatgactgcagggccagctcaagtgtaa
attacatggactgtgacagaagaagccaggatcctccccaacacctggattatgccacatccaacctggtcttctggagtcct
gtcgtctcagtgccagtggtctgggacctcttactctcacaatcagcagagtgagggtgaagatgctgacctattactg
ccagcagtgaggttttaaccaccacgttcggaggggggaccgaagctggaaataaaagagagcaagtagcggaccgccctgc
cccccttgcctaagcctaccaccacccctgcccctagacctccaacacccgccccacaatcggccagccagcctctgtctctg
agggcccgaggtgtgtagaccagctgctggcggagccgtgcacaccagaggactggattctgctgctgacatctacatctgggc
ccctctgcccggcacaatgtggcgtgctgctgctgagcctcgtgatcaccgaagcggggcgagaaagaactgctgtacatctttaa
ggagccctcatgcccggcgtgcagaccaccaggaagaggacggctgctcctgcagattcccggaggaagaagggcg
ctgcgagctgagagtgaagtgcagcagatccggcagcggcctgctaccagcagggacagaaccagctgtacaacgagctg
aacctgggcagacggggaagtagtagctgctggacaagcggagagggccgggaccctgagatggcgggaaagccagaa
gaaagaacccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaagacaagatggccgaggcctacagcagatcggaatgaag
ggcgagcggagaagaggcaaggccacgatggcctgtaccaggccctgagcaccggccaccaaggacacctatgacgcct
gcacatgcaggccctgctccaaactcgaggggcggcgagaggcgaggaagtcttcaacatgcggtgacgtggagga
gaatcccgccctaggtgcttctcctggtgacaagcctctgctctgagttaccacacccagcattctctgaccccacga
aagtgtgtaacgggaatagggtattggtgaattaaagactcactctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctc
catcagtgggcagctccacatcctgcccgtggcatttaggggtgactccttcacacatactctctctggtatccacaggaactgg
atattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggttttgcgtatcaggttggcctgaaaacaggacggacctccatgctttgag
aacctagaatcatacgcggcaggaccgaacatggtcagttttctctgagctgctcagcctgaacataacatcctgggatt
acgtccctcaaggagataagtgatggagatgtgataattcagggaacaaaaattgtgctatgcaatacaataaactggaaaa
aactgtttgggacctccggtcagaaaaacaaaattataagcaacagagggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgc
catgcttctgctccccaggggtgctggggcccgaggccagggactgctcttgcgggaatgtagccgagggcaggg
aatgcgtggacaagtgcaacctctgagggtgagccaagggtgttgggagaactctgagtgatacagtgccaccagag
tgcttgcctcaggccatgaacatcactgcacaggcggggaccagacaactgtatcagtggtgccctacattgacggccc
ccactgcgtcaagacctgccggcaggagtcagggagaaaaaacacacctggtctggaagtacgcagacgccggccatgtg
tgccacctgtgcatccaaactgcacctacggatgcactgggcccaggtcttgaaggctgtccaacgaatgggctaagatcccg
tccatgccactgggatggtggggccctcctcttctgctgctggtggtggccctggggatcgccctcttcatgtga

Figura 11

GMCSFRss-CD19scFv-Gly4ser conector-CD20scFv-CD8alfaBisagra-CD8alfaTM-41BB-CD3Zeta-T2A-EGFRt

DNA: ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC
AA: M L L L V T S L L L C E L P H P A

DNA: TTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGC
AA: F L L I P D I Q M T Q T T S S L S

DNA: GCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATC
AA: A S L G D R V T I S C R A S Q D I

DNA: AGCAAGTACCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTG
AA: S K Y L N W Y Q Q K P D G T V K L

DNA: CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTTTAGC
AA: L I Y H T S R L H S G V P S R F S

DNA: GGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAG
AA: G S G S G T D Y S L T I S N L E Q

DNA: GAAGATATCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACC
AA: E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T

DNA: TTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGC
AA: F G G G T K L E I T G S T S G S G

DNA: AAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAA
AA: K P G S G E G S T K G E V K L Q E

DNA: AGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACC
AA: S G P G L V A P S Q S L S V T C T

DNA: GTGAGCGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCC
AA: V S G V S L P D Y G V S W I R Q P

DNA: CCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACC
AA: P R K G L E W L G V I W G S E T T

DNA: TACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGC
AA: Y Y N S A L K S R L T I I K D N S

DNA: AAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC
AA: K S Q V F L K M N S L Q T D D T A

DNA: ATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGAC
AA: I Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D

DNA: TACTGGGGCCAGGGCACCGCTGACCGTGAGCAGCGGAGGTGGTGGATCC
AA: Y W G Q G T S V T V S S G G G G S

DNA: GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCA
AA: E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S

DNA: GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATG
AA: V K M S C K A S G Y T F T S Y N M

ES 2 774 160 T3

DNA: CACTGGGTAAAGCAGACACCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATT
 AA: H W V K Q T P G Q G L E W I G A I
 DNA: TATCCAGGAAATGGTGATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCC
 AA: Y P G N G D T S Y N Q K F K G K A
 DNA: ACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGC
 AA: T L T A D K S S S T A Y M Q L S S
 DNA: CTGACATCTGAGGACTCTGCGGACTATTACTGTGCAAGATCTAATTATTAC
 AA: L T S E D S A D Y Y C A R S N Y Y
 DNA: GGTAGTAGCTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACC
 AA: G S S Y W F F D V W G A G T T V T
 DNA: GTCTCCTCAGGCAGTACTAGCGGTGGTGGCTCCGGGGCGGTTCCGGTGGG
 AA: V S S G S T S G G G S G G G S G G
 DNA: GCGGCGCAGCAGCGACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTATCCTGTCTGCA
 AA: G G S S D I V L T Q S P A I L S A
 DNA: TCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAT
 AA: S P G E K V T M T C R A S S S V N
 DNA: TACATGGACTGGTACCAGAAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCCTGGATT
 AA: Y M D W Y Q K K P G S S P K P W I
 DNA: TATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGT
 AA: Y A T S N L A S G V P A R F S G S
 DNA: GGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGAT
 AA: G S G T S Y S L T I S R V E A E D
 DNA: GCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTTTAAATCCACCCACGTTTCGGA
 AA: A A T Y Y C Q Q W S F N P P T F G
 DNA: GGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAGAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGCCCC
 AA: G G T K L E I K E S K Y G P P C P
 DNA: CCTTGCCCTAAGCCTACCACCACCCCTGCCCTAGACCTCCAACACCCGCC
 AA: P C P K P T T T P A P R P P T P A
 DNA: CCAACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCCGAGGCTTGTAGACCA
 AA: P T I A S Q P L S L R P E A C R P
 DNA: GCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGACATC
 AA: A A G G A V H T R G L D F A C D I
 DNA: TACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCAGCATGTGGCGTGCTGCTGCTGAGCCTC
 AA: Y I W A P L A G T C G V L L L S L
 DNA: GTGATCACCAAGCGGGGCGAGAAAGAACTGCTGTACATCTTTAAGCAGCCC
 AA: V I T K R G R K K L L Y I F K Q P
 DNA: TTCATGCGGCCCCGTGCAGACCCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCAGA
 AA: F M R P V Q T T Q E E D G C S C R

ES 2 774 160 T3

DNA: TTCCCCGAGGAAGAAGAAGGCGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAGTTTCAGCAGA
 AA: F P E E E E G G C E L R V K F S R

DNA: TCCGCCGACGCCCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAACCCAGCTGTACAACGAG
 AA: S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E

DNA: CTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGC
 AA: L N L G R R E E Y D V L D K R R G

DNA: CGGGACCCCTGAGATGGGCGGAAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCCAGGAAGGC
 AA: R D P E M G G K P R R K N P Q E G

DNA: CTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATC
 AA: L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I

DNA: GGAATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAG
 AA: G M K G E R R R G K G H D G L Y Q

DNA: GGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCC
 AA: G L S T A T K D T Y D A L H M Q A

DNA: CTGCCTCCAAGACTCGAGGGCGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACA
 AA: L P P R L E G G G E G R G S L L T

DNA: TGCGGTGACGTGGAGCAGAATCCCGGCCCTAGGATGCTTCTCCTGGTGACA
 AA: C G D V E E N P G P R M L L L V T

DNA: AGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCCTGATCCCACGC
 AA: S L L L C E L P H P A F L L I P R

DNA: AAAGTGTTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATA
 AA: K V C N G I G I G E F K D S L S I

DNA: AATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGAT
 AA: N A T N I K H F K N C T S I S G D

DNA: CTCCACATCCTGCCGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCT
 AA: L H I L P V A F R G D S F T H T P

DNA: CCTCTGGATCCACAGGAAGTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACA
 AA: P L D P Q E L D I L K T V K E I T

DNA: GGGTTTTTGTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCC
 AA: G F L L I Q A W P E N R T D L H A

DNA: TTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTT
 AA: F E N L E I I R G R T K Q H G Q F

DNA: TCTCTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTC
 AA: S L A V V S L N I T S L G L R S L

DNA: AAGGAGATAAGTGTGAGATGTGATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGC
 AA: K E I S D G D V I I S G N K N L C

DNA: TATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAA
 AA: Y A N T I N W K K L F G T S G Q K

ES 2 774 160 T3

DNA: ACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAG
 AA: T K I I S N R G E N S C K A T G Q

DNA: GTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGAGCCCAGG
 AA: V C H A L C S P E G C W G P E P R

DNA: GACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAG
 AA: D C V S C R N V S R G R E C V D K

DNA: TGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGC
 AA: C N L L E G E P R E F V E N S E C

DNA: ATACAGTGCCACCCAGAGTGCCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACA
 AA: I Q C H P E C L P Q A M N I T C T

DNA: GGACGGGGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCCTACATTGACGGCCCC
 AA: G R G P D N C I Q C A H Y I D G P

DNA: CACTGCGTCAAGACCTGCCCCGCAGGAGTCATGGGAGAAAAACAACACCCCTG
 AA: H C V K T C P A G V M G E N N T L

DNA: GTCTGGAAGTACGCAGACGCCGCCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAAC
 AA: V W K Y A D A G H V C H L C H P N

DNA: TGCACCTACGGATGCACTGGGCCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGG
 AA: C T Y G C T G P G L E G C P T N G

DNA: CCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTG
 AA: P K I P S I A T G M V G A L L L L

DNA: CTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA
 AA: L V V A L G I G L F M *

Figura 12

T2A-EGFRt

ctcgagggcggcggagagggcagaggaaagtcttctaactgcgggtgacgtggaggagaatccgggcctaggatgcttctcc
 tggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatccacgcaaagtgtgtaacggaataggattggtg
 aatttaaagactcactctccataaatgctacgaataattaacacttcaaaaactgcacctccatcagtgggcgatctccacatcctgcc
 ggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctccttgatccacaggaaactggataatttgaaaaccgtaaaggaaatca
 cagggttttctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggac
 caagcaacatggtcagtttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgatgg
 agatgtgataaattcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaatacaataaactggaaaaaactgttgggacctccggtcagaaaa
 ccaaaattataagcaacagagggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggcttgcctatgcttgtctccccgagggtctgc
 tggggcccgaggcccagggaactgcgtctcttgcgggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgaaccttctgg
 aggggtgagccaaggagtttgggagaactctgagtgcatacagtgccacceagagtgcctgctcaggccatgaacatcacc
 tgcacaggacggggaccagacaactgtatcagtggtgccactacattgacggccccactgcgtcaagacctgcccggcag
 gagtcattgggagaaaaacaacacctggtcttgggaagtacgcagacgcggccatgtgtgccacctgtgccatcacaactgcacc
 tacggatgcactggggcagggtcttgaaggctgtccaacgaatgggctaagatcccgctccatgccactgggatggtgggggc
 cctcctcttgcctgctggtgggtggccctggggatcgccctctcatgtga

Figura 13

T2A-EGFRt

DNA: CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTG
AA: L E G G G E G R G S L L T C G D V

DNA: GAGGAGAATCCCGGCCCTAGGATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTC
AA: E E N P G P R M L L L V T S L L L

DNA: TGTGAGTTACCAACCCAGCATTCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAAC
AA: C E L P H P A F L L I P R K V C N

DNA: GGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAAT
AA: G I G I G E F K D S L S I N A T N

DNA: ATTAAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTG
AA: I K H F K N C T S I S G D L H I L

DNA: CCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCA
AA: P V A F R G D S F T H T P P L D P

DNA: CAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTG
AA: Q E L D I L K T V K E I T G F L L

DNA: ATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTGAGAACCTA
AA: I Q A W P E N R T D L H A F E N L

DNA: GAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCACTC
AA: E I I R G R T K Q H G Q F S L A V

DNA: GTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGT
AA: V S L N I T S L G L R S L K E I S

DNA: GATGGAGATGTGATAATTTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAAATACA
AA: D G D V I I S G N K N L C Y A N T

DNA: ATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAAACAAAAATTATA
AA: I N W K K L F G T S G Q K T K I I

DNA: AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCC
AA: S N R G E N S C K A T G Q V C H A

DNA: TTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCCGAGCCCAGGGACTGCGTCTCT
AA: L C S P E G C W G P E P R D C V S

DNA: TGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTG
AA: C R N V S R G R E C V D K C N L L

DNA: GAGGGTGAGCCAAAGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCAC
AA: E G E P R E F V E N S E C I Q C H

DNA: CCAGAGTGCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCA
AA: P E C L P Q A M N I T C T G R G P

DNA: GACAACGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAG
AA: D N C I Q C A H Y I D G P H C V K

ES 2 774 160 T3

DNA: ACCTGCCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTAC
AA: T C P A G V M G E N N T L V W K Y

DNA: GCAGACGCCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGA
AA: A D A G H V C H L C H P N C T Y G

DNA: TGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCG
AA: C T G P G L E G C P T N G P K I P

DNA: TCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCC
AA: S I A T G M V G A L L L L L V V A

DNA: CTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA
AA: L G I G L F M *