(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 009 008**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2016 E 22162298 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024 EP 4056588**

(54) Título: **Terapias cd20, terapias cd22, y terapias de combinación con una célula que expresa un receptor de antígeno quimérico (car) cd19**

(30) Prioridad:

08.04.2015 US 201562144639 P
08.04.2015 US 201562144615 P
08.04.2015 US 201562144497 P
19.08.2015 US 201562207255 P
04.12.2015 US 201562263423 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2025

(73) Titular/es:

NOVARTIS AG (50.00%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (50.00%)

(72) Inventor/es:

BITTER, HANS;
BORDEAUX, JENNIFER MARY;
BRANNETTI, BARBARA;
BROGDON, JENNIFER;
DAKAPPAGARI, NAVEEN KUMAR;
GILL, SAAR;
HIGHFILL, STEVEN;
HUANG, LU;
JUNE, CARL H.;
KIM, JU YOUNG;
LEI, MING;
LI, NA;
LOEW, ANDREAS;
ORLANDO, ELENA;
RUELLA, MARCO;
TRAN, THAI;
ZHANG, JIMIN y
ZHOU, LI

(74) Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

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

Terapias cd20, terapias cd22, y terapias de combinación con una células que expresa un receptor de antígeno quimérico (car) cd19

Campo de la invención

Esta solicitud reivindica la prioridad sobre la solicitud con número de serie de EE. UU. 62/144.615 presentada el 8 de abril de 2015, la solicitud con número de serie de EE. UU. 62/144.497 presentada el 8 de abril de 2015, la solicitud con número de serie de EE. UU. 62/144.639 presentada el 8 de abril de 2015, la solicitud con número de serie de EE. UU. 62/207.255 presentada el 19 de agosto de 2015, la solicitud con número de serie de EE. UU. 62/263.423 presentada el 4 de diciembre de 2015.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere en general a un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a CD22.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Muchos pacientes con neoplasias malignas de linfocitos B son incurables con la terapia convencional. Además, las opciones de tratamiento tradicionales tienen con frecuencia efectos secundarios graves. Se han realizado intentos en la inmunoterapia del cáncer, sin embargo, varios obstáculos hacen que este sea un objetivo muy difícil para lograr la eficacia clínica. Aunque se han identificado cientos de los denominados antígenos tumorales, estos generalmente son endógenos y, por tanto, son poco inmunogénicos. Además, los tumores utilizan varios mecanismos para volverse hostiles al inicio y propagación del ataque inmunitario.

Desarrollos recientes que utilizan la terapia de linfocitos T autólogos (CART) modificados con receptor quimérico para antígeno (CAR), que se basa en redirigir los linfocitos T a una molécula adecuada de la superficie celular en células cancerosas, tales como neoplasias malignas de linfocitos B, muestran resultados prometedores en el aprovechamiento de la capacidad del sistema inmunitario para tratar neoplasias malignas de linfocitos B y otros cánceres (véase, p. ej., Sadelain *et al.*, Cancer Discovery 3: 388-398 (2013)). Los resultados clínicos de los CART19 de origen murino (es decir, "CTL019") se han mostrado prometedores para establecer remisiones completas en pacientes que padecen LLC, así como en la LLA infantil (véase, p. ej., Kalos *et al.*, Sci Transl Med 3:95ra73 (2011), Porter *et al.*, NEJM 365: 725-733 (2011), Grupp *et al.*, NEJM 368: 1509-1518 (2013)). Además de la capacidad del receptor quimérico para antígeno de los linfocitos T modificados genéticamente de reconocer y destruir las células diana, una terapia con linfocitos T terapéuticos exitosa necesita tener la capacidad de proliferar y persistir a lo largo del tiempo, para estudiar la recaída leucémica. La calidad variable de los linfocitos T, resultante de la anergia, la supresión o el agotamiento, tendrá efectos en el rendimiento de los linfocitos T transformados con CAR, sobre el que los médicos expertos tienen un control limitado en este momento. Para ser eficaces, los linfocitos T de pacientes transformados con CAR deben persistir y mantener la capacidad de proliferar en respuesta al antígeno afín. Se ha mostrado que los linfocitos T de pacientes con LLA que rinden pueden hacer esto con CART19 que comprende un scFv murino (véase, p. ej., Grupp *et al.*, NEJM 368:1509-1518 (2013)). Xiao et al. (2009), mAbs;1(3):297-303, se refieren a la identificación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-CD22 totalmente humanos. El documento US 2011/0020344 A1 se refiere a anticuerpos monoclonales humanos específicos para CD22. Haso et al. (2012), Blood; DOI 10.1182/blood-2012-06-438002, se refieren al tratamiento de B-ALL con los CAR anti-CD22. McLaughlin et al. (2015), Therapeutic Advances in Hematology;6(6):295-307, se refieren a terapias de células T adoptivas para leucemia y linfoma refractarios/recidivantes. El documento US 2014/0099309 A1 se refiere al uso de un enfoque de trans-señalización en receptores de antígenos quiméricos. El documento WO2016/102965 se refiere a células que coexpresan CAR CD19 y CAR CD22.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR), en la que la molécula de CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD22, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular, y en la que el dominio de unión a CD22 comprende:

(i) una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1) TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 648), una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) DVSNRPS (SEQ ID NO: 659), y una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 670); y

(ii) una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1) GDSMLSNSDTWN (SEQ ID NO: 498) o SNSDTWN (SEQ ID NO: 1345), una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 509) o

RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 1354), y una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 520) o VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 1363).

La presente invención también proporciona una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR), que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD22, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, y en la que el dominio de unión a CD22 comprende:

(i) una LC CDR1 TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 648), una LC CDR2 DVSNRPS (SEQ ID NO: 659), y una LC CDR3 SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 670); y

(ii) una HC CDR1 GDSMLSNSDTWN (SEQ ID NO: 498) o SNSDTWN (SEQ ID NO: 1345), una HC CDR2 RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 509) o RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 1354), y una HC CDR3 VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 520) o VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 1363).

La presente invención también proporciona una célula o población de células que comprende la molécula de ácido nucleico o la molécula de CAR de la invención, opcionalmente en la que la célula es una célula T.

La presente invención proporciona además dicha célula o población de células para uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la célula o población de células que expresan una molécula de CAR.

Éstas y realizaciones adicionales se recogen en las reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La información técnica expuesta a continuación puede en algunos aspectos ir más allá del alcance de la invención, que está definido exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para ubicar la invención en sí en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Además, no se debe interpretar que referencias secundarias a métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y los métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal constituyen una reivindicación de protección para ese método tal cual, sino que deben ser consideradas como una referencia a productos, en particular sustancias o composiciones, para su uso en cualquiera de estos métodos.

La invención proporciona una célula o población de células que comprende una molécula de ácido nucleico o molécula de CAR de la invención, para uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico.

La descripción también presenta, al menos en parte, productos para uso en un método de tratamiento de un trastorno asociado con la expresión de la proteína del grupo de diferenciación 19 (CD 19) (por ejemplo, OMIM Acc. No. 107265, Swiss Prot. Acc No. P15391). El trastorno puede ser un cáncer, por ejemplo un cáncer hematológico. El método puede comprender la administración de una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a CD19 en combinación con un inhibidor de células B, por ejemplo uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres o más) inhibidores de células B, tal como un inhibidor de células B escogido de un inhibidor de CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, o ROR1, o una combinación de los mismos. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la combinación mantiene o tiene una mejor eficacia clínica en comparación con cualquiera de las terapias por separado. Algunos métodos descritos aquí implican el uso de células diseñadas, por ejemplo células T, para expresar una molécula de CAR que se une a CD19, en combinación con un inhibidor de células B (por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo mono- o biespecífico) para una segunda diana de células B (por ejemplo, CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1) o una célula que expresa CAR, por ejemplo una célula efectora inmunitaria que expresa CAR, que se une a la segunda diana de células B, o una combinación de los mismos) para tratar el trastorno asociado con la expresión de CD19. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

La descripción también presenta moléculas de CAR dirigidas contra CD22, y usos, por ejemplo, como monoterapias o en terapias combinadas. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un sujeto (por ejemplo, un mamífero) que tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD19 se puede tratar mediante un método que comprende administrar al sujeto un inhibidor de CD19, por ejemplo una molécula de CAR que se une a CD19 descrita aquí, en combinación con un inhibidor de células B. Por ejemplo, el método puede comprender administrar al sujeto una cantidad efectiva de una o más células que expresan una molécula de CAR que se une a CD19, por ejemplo una molécula de CAR que se une a CD19 descrita aquí (por ejemplo, un CD19 de tipo salvaje o mutante), en combinación con un inhibidor de células B. Un inhibidor de células B se puede escoger de un inhibidor de CD10, por ejemplo uno o más inhibidores de CD10 descritos aquí; un inhibidor de CD20,

por ejemplo uno o más inhibidores de CD20 descritos aquí; un inhibidor de CD22, por ejemplo uno o más inhibidores de CD22 descritos aquí; un inhibidor de CD34, por ejemplo uno o más inhibidores de CD34 descritos aquí; un inhibidor de CD123, por ejemplo uno o más inhibidores de CD123 descritos aquí; un inhibidor de FLT-3, por ejemplo uno o más inhibidores de FLT-3 aquí; un inhibidor de ROR1, por ejemplo uno o más inhibidores de ROR1 descritos aquí; un inhibidor de CD79b, por ejemplo uno o más inhibidores de CD79b descritos aquí; un inhibidor de CD179b, por ejemplo uno o más inhibidores de CD179b descritos aquí; un inhibidor de CD79a, por ejemplo uno o más inhibidores de CD79a descritos aquí, o cualquier combinación de los mismos. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. En ciertos aspectos, se describen aquí productos para uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene leucemia de células B o linfoma de células B, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una o más células que expresan una molécula de CAR que se une a CD19, en combinación con uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b, o CD79a. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto relacionado, la presente descripción proporciona productos para uso en un método para reducir la proliferación de células que expresan CD19, por ejemplo administrando a un sujeto, por ejemplo un paciente que lo necesita, una terapia de combinación como se describe en este documento, por ejemplo un inhibidor de CD19 en combinación con un inhibidor de células B, por ejemplo uno o más inhibidores de células B como se describe en este documento. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. En otro aspecto, la presente descripción proporciona productos para uso en un método de eliminación selectiva de células que expresan CD19, por ejemplo administrando a un sujeto, por ejemplo un paciente que lo necesita, una terapia combinada como se describe en este documento, por ejemplo un inhibidor de CD19 en combinación con un inhibidor de células B, por ejemplo uno o más inhibidores de células B como se describe en este documento. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. En ciertos aspectos, la descripción proporciona productos para uso en un método para proporcionar inmunidad antitumoral en un sujeto, por ejemplo un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una combinación (por ejemplo, una o más células que expresan CAR) como se describe en este documento. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la descripción proporciona productos para uso en un método para prevenir una recaída de CD19 negativo en un mamífero, que comprende administrar al mamífero uno o más inhibidores de células B, en el que el inhibidor de células B comprende un inhibidor de uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b, o CD79a. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la descripción proporciona uno o más inhibidores de células B, en la que el inhibidor de células B comprende un inhibidor de uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD 179b, o CD79a, para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD19, y en la que dicho sujeto ha recibido, está recibiendo o está a punto de recibir una célula que expresa una molécula de CAR que se une a CD19, por ejemplo un CAR CD19. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

MOMENTO Y DOSIS DE LA ADMINISTRACIÓN COMBINADA

Se pueden administrar una o más terapias al sujeto sustancialmente al mismo tiempo o en cualquier orden. Por ejemplo, un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19 descrita en el presente documento, el o los inhibidores de linfocitos B y/u opcionalmente el al menos un agente terapéutico adicional se pueden administrar simultáneamente, en la misma composición o en composiciones separadas, o secuencialmente. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

Para la administración secuencial, se puede administrar primero una célula que expresa CAR descrita aquí (por ejemplo, una célula que expresa CAR CD19, una célula que expresa CAR CD20 o una célula que expresa CAR CD22), y en segundo lugar se puede administrar un agente adicional, o se puede invertir el orden de administración. En algunas realizaciones, la primera terapia (por ejemplo, una célula que expresa CAR, tal como una célula CART CD19, una célula CART CD20 o una célula CART CD22) se continúa cuando se introduce la segunda terapia, y en otras realizaciones la primera terapia se retira antes, después o al mismo tiempo que se introduce la segunda terapia. En los casos de administración secuencial, en algunas realizaciones, la segunda terapia se inicia después de una cantidad de tiempo predeterminada, o después de que el sujeto muestre una o más indicaciones de que se ha producido o es probable que se produzca una recaída. La indicación puede ser, por ejemplo, la presencia de

células cancerosas que tienen una alteración en la diana de la primera terapia, por ejemplo CD 19, CD20 o CD22. La alteración puede ser, p. ej., una mutación de cambio de marco y/o un codón de terminación prematuro. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En otras realizaciones, las dos o más terapias (por ejemplo, una célula que expresa CAR CD19 y un inhibidor de células B) se administran simultáneamente. Sin estar limitados por la teoría, en algunas realizaciones, la administración simultánea de las terapias puede reducir la probabilidad de recaída y/o retrasar la recaída. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

Cuando se administra en combinación, la primera terapia (p. ej., terapia con CAR, p. ej., célula que expresa CAR dirigida contra CD19, CD20 o CD22) y el agente adicional (p. ej., segundo o tercer agente, p. ej., un inhibidor de linfocitos B), o todos, pueden administrarse en una cantidad o dosis mayor, menor o igual que la cantidad o dosis de cada agente usado individualmente, p. ej., como monoterapia. En ciertas realizaciones, la cantidad o dosis administrada de la primera terapia, la segunda terapia, opcionalmente una tercera terapia, o todas, es menor (por ejemplo, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%) que la cantidad o dosis de cada agente usado individualmente, por ejemplo como monoterapia. En otras realizaciones, la cantidad o dosis de la primera terapia, la segunda terapia, opcionalmente una tercera terapia, o todas, que da como resultado un efecto deseado (por ejemplo, el tratamiento del cáncer) es menor (por ejemplo, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50% menor) que la cantidad o dosis de cada agente usado individualmente, por ejemplo como monoterapia, requerida para lograr el mismo efecto terapéutico. En ciertas realizaciones, la dosis más baja produce efectos secundarios reducidos en comparación con los que se observan cuando se administra la dosis normal (monoterapia). Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En una realización, la terapia comprende una población de células. En algunas realizaciones, las células son células efectoras inmunes, por ejemplo células que expresan CAR.

En combinación con los métodos descritos aquí, se describen métodos que comprenden una etapa de diagnóstico o una etapa de selección de pacientes, por ejemplo como se describe a continuación.

Un método para evaluar a un sujeto, por ejemplo un paciente, para determinar su estado de recidivante (por ejemplo, un paciente recidivante o un paciente no recidivante después de una terapia con CAR) puede identificar a un sujeto, por ejemplo un paciente, que ha recaído ("paciente recidivante") o que es probable que recaiga, o que no ha recaído ("paciente no recidivante") o que es probable que no recaiga, después del tratamiento con una terapia con CAR (por ejemplo, una terapia con CART CD19, por ejemplo, descrita aquí, por ejemplo una terapia con CTL019). El estado de recaída (por ejemplo, recaída o no después de una terapia CART) se puede determinar analizando una o más características de CD19.

Una o más características de CD19 pueden incluir una alteración en una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una mutación tal como una inserción, una deleción o una sustitución, o una combinación de las mismas), una alteración en un nivel de ácido nucleico, una alteración en una secuencia de proteína, o una alteración en un nivel de proteína, o una combinación de las mismas. Un paciente con recaída puede tener una o más mutaciones en CD19, por ejemplo, una o más mutaciones (por ejemplo, inserciones o deleciones) en el exón 2 de CD19. Un paciente con recaída puede tener una o más mutaciones en el exón 1, exón 2, exón 3, exón 4, exón 5, exón 6 o exón 7 de CD19. La mutación puede producir un codón de terminación prematuro, por ejemplo mediante una inserción o deleción, que conduce a un cambio de marco, por ejemplo en el exón 2 de CD19. La mutación puede ser una mutación de la Tabla 31.

La característica de CD19 puede compararse con una característica de referencia. Por ejemplo, cuando la característica es una secuencia (p. ej., secuencia de proteína o ácido nucleico de una muestra biológica), la característica de referencia puede ser una secuencia de tipo silvestre (p. ej., secuencia de proteína o ácido nucleico) de CD19. La característica puede ser el porcentaje de células en la muestra que tienen una secuencia mutante. Cuando la característica es un nivel (p. ej., nivel de proteína o ácido nucleico), la característica de referencia puede ser un nivel de tipo silvestre (p. ej., nivel de proteína o ácido nucleico) de CD19. La característica puede ser el nivel de proteína o ácido nucleico en la muestra. La característica puede ser el porcentaje de células en la muestra que tienen un nivel de proteína o ácido nucleico que está por encima de un umbral dado.

Se describen métodos para identificar a un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo un cáncer hematológico, tal como, por ejemplo, LLC o LLA, como un recidivante o no recidivante después de un tratamiento que comprende una terapia CAR, por ejemplo una terapia CART CD19. El método comprende: (1) adquirir una muestra del sujeto (por ejemplo, una muestra de aféresis obtenida de la sangre del sujeto; y/o por ejemplo, una muestra de producto manufacturado, por ejemplo células T genéticamente modificadas obtenidas de la sangre del sujeto); (2) determinar una característica de CD19, por ejemplo una secuencia o nivel como se describe en este documento; y (3) (opcionalmente) comparar la característica determinada de CD19 con una característica de referencia; en el que

la diferencia, por ejemplo diferencia estadísticamente significativa, entre la característica determinada en comparación con la característica de referencia es predictiva de recaída a la terapia CAR; y (4) identificar al sujeto como un recidivante o no recidivante a la terapia CAR, por ejemplo en base a la característica determinada de CD19. La presencia o ausencia de la característica de CD19 puede ser la presencia o ausencia de un codón de terminación prematuro, por ejemplo mediante una inserción o eliminación que conduce a un cambio de marco. La presencia de la característica de CD19 puede ser una mutación de la Tabla 31.

Los métodos pueden comprender (1) adquirir una muestra del sujeto (por ejemplo, una muestra de aféresis obtenida de la sangre del sujeto; y/o, por ejemplo, una muestra de producto manufacturado, por ejemplo células T genéticamente modificadas obtenidas de la sangre del sujeto, por ejemplo un producto CART19 manufacturado); (2) determinar una característica de CD19, por ejemplo una secuencia o nivel como se describe en este documento; y (3) (opcionalmente) comparar la característica determinada de CD19 con una característica de referencia; en el que la presencia de la característica de CD19 (por ejemplo, la diferencia, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa, entre la característica determinada en comparación con la característica de referencia) es predictiva de una recaída a la terapia CAR. La presencia de la característica de CD19 puede ser la presencia de un codón de terminación prematuro, por ejemplo mediante una inserción o deleción que conduce a un cambio de marco. La presencia de la característica de CD19 puede ser una mutación de la Tabla 31.

Se describen métodos para determinar la recaída de un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo un cáncer hematológico tal como LLC o LLA, después de un tratamiento que comprende una terapia CAR, por ejemplo una terapia CAR CD19 como se describe en este documento. El método comprende determinar una característica del CD 19 en una muestra obtenida antes de la recaída. La presencia de la característica de CD19 (por ejemplo, la diferencia, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa, entre la característica determinada en comparación con la característica de referencia) puede ser indicativa de recaída después de la terapia con CAR. La presencia de la característica de CD 19 puede ser la presencia de un codón de terminación prematuro, por ejemplo mediante una inserción o eliminación que conduce a un cambio de marco. La presencia de la característica de CD19 puede ser una mutación de la Tabla 31.

Se describen métodos para evaluar a un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo un cáncer hematológico tal como LLC o LLA. El método comprende adquirir un valor del estado recidivante para el sujeto que comprende una medida de una o más características de CD19, p. ej., una o más de las características de CD19 como se describe en el presente documento, evaluando de este modo al sujeto.

Se describen métodos para evaluar o monitorizar la efectividad de una terapia CAR en un sujeto que tiene cáncer, que comprende adquirir un valor del estado de recaída para el sujeto que comprende una medida de una o más características de CD19, por ejemplo una o más de las características de CD19 como se describe en este documento, evaluando o monitorizando de ese modo la efectividad de la terapia CAR en el sujeto.

Se describen métodos para proporcionar una predicción de la tasa de éxito de una terapia CAR, por ejemplo descrita en este documento, en un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de proporcionar una muestra biológica del sujeto; determinar una o más características de CD19, por ejemplo una o más de las características de CD 19 como se describe en este documento; y en base a la característica determinada, proporcionar un pronóstico al sujeto.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona, p. ej., un método o ensayo para identificar a un sujeto que tiene cáncer que tiene una mayor o menor probabilidad de responder a un tratamiento que comprende una terapia con receptor quimérico para antígeno (CAR), comprendiendo el método:

(1) adquirir una muestra del sujeto;

(2) determinar un valor para uno o más de:

(i) un nivel de uno o más marcadores enumerados en la **tabla 29** en la muestra;

(ii) una característica de CD19, p. ej., una mutación, p. ej., una mutación que causa un cambio de marco o un codón de parada prematuro o ambos, o

(iii) un nivel o actividad de linfocitos T_{REG}; y

(3) (opcionalmente) comparar el valor determinado, p. ej., el nivel, actividad o característica de (i), (ii) o (iii) o una combinación de los mismos, con un valor de referencia, en donde la diferencia, p. ej., una diferencia estadísticamente significativa, entre el valor determinado en comparación con el valor de referencia, predice la capacidad de respuesta del sujeto a la terapia con CAR; y

(4) identificar que el sujeto responde de forma completa, responde de forma parcial o no responde, o es recidivante o no recidivante frente a la terapia con CAR en función del valor determinado.

Cualquiera de los métodos mencionados anteriormente puede incluir además lo siguiente:

(i) administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia CAR, por ejemplo una terapia que comprende una célula que expresa CD19, si no se detecta ninguna diferencia, por ejemplo ninguna diferencia estadísticamente significativa, en el valor de uno, dos o más (todos) de (i) el nivel o la actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) la característica de CD19, por ejemplo una mutación, por ejemplo una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro, o ambos, o (iii) el nivel de células T_{REG} en una muestra biológica;

(ii) administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia CAR, por ejemplo una terapia que comprende una célula que expresa CD19 y uno o más inhibidores de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1 como se describe en este documento), si se detecta una diferencia, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa, en el valor de uno, dos o más (todos) de (i) el nivel o la actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) la característica de CD19, por ejemplo una mutación, por ejemplo una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro, o ambos, o (iii) el nivel de células T_{REG} en una muestra biológica; o

(iii) interrumpir una primera terapia, por ejemplo una terapia que comprende una célula que expresa CD19, y administrar una segunda terapia, por ejemplo uno o más inhibidores de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1 como se describe en este documento), si se detecta una diferencia, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa, en el valor de uno, dos o más (o todos) de (i) el nivel o la actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) la característica de CD19, por ejemplo una mutación, por ejemplo una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro, o ambos, o (iii) el nivel de células T_{REG} en una muestra biológica. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

Las etapas de administración (i) a (iii) se pueden realizar antes o después de las etapas de evaluación del paciente, como se describe en los métodos ejemplares a continuación.

En ciertos aspectos, se describen productos para uso en un método para tratar a un sujeto que padece cáncer. El método comprende:

(a) adquirir, p. ej., determinar, si el sujeto tiene un valor de uno, dos o más (todos) de:

(i) un nivel de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29;

(ii) una característica de CD19, p. ej., una mutación que causa un cambio de marco o un codón de parada prematuro o ambos, o

(iii) un nivel o actividad de linfocitos T_{REG} en una muestra biológica, y

(b) en respuesta a dicho valor, además incluir lo siguiente:

(i) administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia CAR, por ejemplo una terapia que comprende una célula que expresa CD19, si no se detecta ninguna diferencia, por ejemplo ninguna diferencia estadísticamente significativa, en uno, dos o más (o todos) de (i) el nivel o la actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) la característica de CD19, por ejemplo una mutación, por ejemplo una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro, o ambos, o (iii) el nivel de células T_{REG} en una muestra biológica;

(ii) administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia CAR, por ejemplo una terapia que comprende una célula que expresa CD19 y uno o más inhibidores de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1 como se describe en este documento), si se detecta una diferencia, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa, en uno, dos o más (o todos) de (i) el nivel o la actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) la característica de CD19, por ejemplo una mutación, por ejemplo una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro, o ambos, o (iii) el nivel de células T_{REG} en una muestra biológica; o

(iii) interrumpir una primera terapia, por ejemplo una terapia que comprende una célula que expresa CD19, y administrar una segunda terapia, por ejemplo uno o más inhibidores de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1 como se

describe en este documento), si se detecta una diferencia, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa, en uno, dos o más (o todos) de (i) el nivel o la actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) la característica de CD19, por ejemplo una mutación, por ejemplo una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro, o ambos, o (iii) el nivel de células T_{REG} en una muestra biológica. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, se describen productos para uso en un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer. El método incluye:

(a) administrar a un sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia con CAR, p. ej., una terapia que comprende una célula que expresa CD19,

(b) adquirir un valor para (p. ej., determinar si el sujeto tiene) uno, dos o más (todos) de:

1. (i) un nivel de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29;

2. (II) una característica de CD19, p. ej., una mutación, p. ej., una mutación que causa un cambio de marco o un codón de parada prematuro o ambos, o

3. (III) un nivel o actividad de linfocitos T_{REG} en una muestra biológica, y

(c) en respuesta al valor o determinación en la etapa (b) (I-III), realizar uno o más de los siguientes:

(i) administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia CAR, por ejemplo una terapia que comprende una célula que expresa CD19, si no se detecta ninguna diferencia, por ejemplo ninguna diferencia estadísticamente significativa, en uno o más de (i) el nivel o la actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) la característica de CD19, por ejemplo una mutación, por ejemplo una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro, o ambos, o (iii) el nivel de células T_{REG} en una muestra biológica;

(ii) administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia CAR, por ejemplo una terapia que comprende una célula que expresa CD19 y uno o más inhibidores de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1 como se describe en este documento), si se detecta una diferencia, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa, en uno o más de (I) el nivel o la actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (II) la característica de CD19, por ejemplo una mutación, por ejemplo una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro, o ambos, o (III) el nivel de células T_{REG} en una muestra biológica; o

(iii) interrumpir una primera terapia, por ejemplo una terapia que comprende una célula que expresa CD19, y administrar una segunda terapia, por ejemplo uno o más inhibidores de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1 como se describe en este documento), si se detecta una diferencia, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa, en uno o más de (I) el nivel o la actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (II) la característica de CD19, por ejemplo una mutación, por ejemplo una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro, o ambos, o (III) el nivel de células T_{REG} en una muestra biológica. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En algunos ejemplos de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, la muestra es una muestra biológica seleccionada de una muestra de sangre, plasma o suero. En un ejemplo particular, una muestra biológica es una muestra de sangre. En un ejemplo, la muestra es una muestra de aféresis, por ejemplo, células T obtenidas de la sangre del sujeto. En un ejemplo, la muestra es una muestra de producto fabricado, por ejemplo, células T modificadas genéticamente obtenidas de la sangre del sujeto, por ejemplo, un producto CAR fabricado, por ejemplo, un producto CART19 fabricado.

Los métodos aquí descritos se pueden utilizar para determinar si es probable que un paciente responda a la terapia con CAR (por ejemplo, CD19 CART), por ejemplo, si es probable que un paciente que no ha recibido terapia con CAR responda a la terapia con CAR, o si es probable que un paciente que ha recibido terapia con CAR responda a la terapia con CAR continua. En general, las mismas características de CD19 que predicen la recaída predicen que es menos probable que un paciente responda a una terapia con CAR CD19. A un paciente que se ha identificado que es menos probable que responda a una terapia con CAR CD19 se le puede administrar un tipo diferente de terapia, tal como un inhibidor de linfocitos B (p. ej., uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22,

CD34, CD123, FLT- 3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a como se describe en el presente documento). Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, se describe el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico. El tratamiento puede incluir determinar si un sujeto tiene una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, en una característica de CD19 con respecto a una característica de referencia, y si hay una diferencia, por ejemplo una diferencia estadísticamente significativa entre la característica determinada y la característica de referencia, administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia de CAR, por ejemplo, CART, tratando así al sujeto. La característica puede ser la secuencia CD19, por ejemplo, una secuencia de proteína o de ácido nucleico. El tratamiento puede comprender el análisis de la presencia o ausencia de CD19 con desplazamiento de marco, por ejemplo, CD19 que comprende un codón de terminación prematuro.

En cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, el tratamiento puede comprender la administración de una célula que expresa CAR CD19 en combinación con uno o más inhibidores de células B. La terapia con CAR CD19 se puede administrar simultáneamente con uno o más inhibidores de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a como se describe en este documento). Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. La terapia con CAR CD19 puede administrarse antes de uno o más inhibidores de células B. La terapia con CAR CD19 puede administrarse después de uno o más inhibidores de células B.

En una realización, en la que existe una diferencia entre la característica determinada y la característica de referencia, el método comprende modificar el producto CAR antes de la infusión en el sujeto. En una realización, en la que existe una diferencia entre la característica determinada y la característica de referencia, el método comprende modificar la fabricación de un producto CAR antes de la infusión en el sujeto. En una realización, si existe una diferencia entre la característica determinada y la característica de referencia, el método comprende ajustar la dosis de infusión de CAR para lograr un efecto anticancerígeno.

En una realización, el tratamiento puede comprender además determinar si un sujeto tiene una mayor probabilidad de responder a una terapia CAR, comparando una característica de CD19 en una muestra del sujeto con respecto a una característica de referencia, en la que una diferencia en la característica con respecto a la característica de referencia es indicativa de una mayor probabilidad de respuesta; y administrar al sujeto una dosis terapéuticamente efectiva de una terapia CAR, tratando así al sujeto.

En una realización, el tratamiento puede comprender además obtener una muestra de un sujeto; determinar una característica de CD19 (por ejemplo, la presencia o ausencia de un cambio de marco o un codón de terminación prematuro), con respecto a una característica de referencia; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de una célula que expresa CAR, si se identifica que el sujeto tiene una diferencia estadísticamente significativa entre la característica CD19 de la muestra y una característica de referencia en la muestra.

La característica de CD19 se puede utilizar para diseñar un tratamiento para el paciente. En una realización, cuando una muestra de paciente comprende CD19 mutante, por ejemplo, CD19 con desplazamiento de marco, por ejemplo, CD19 que comprende un codón de terminación prematuro, al paciente se le administra una terapia distinta a un inhibidor de CD19, por ejemplo, al paciente se le administra otro inhibidor de células B. En una realización, cuando una muestra de paciente comprende niveles de CD19 inferiores a los normales, al paciente se le administra una terapia distinta a un inhibidor de CD19, por ejemplo, al paciente se le administra otro inhibidor de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a como se describe en este documento). Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En una realización, el tratamiento puede comprender además la adquisición de un valor del estado de recaída del sujeto que comprende una medida de una característica CD19 y, en respuesta a una determinación del estado de recaída, la realización de uno, dos, tres, cuatro o más de: (1) identificar al sujeto como un recidivante o no recidivante; (2) administrar una terapia CAR; (3) seleccionar o alterar una dosificación de una terapia CAR; (4) seleccionar o alterar el programa o la evolución temporal de una terapia CAR; (5) administrar, por ejemplo, a un recidivante, un agente adicional en combinación con la terapia CAR, por ejemplo, administrar uno o más inhibidores de células B; o un inhibidor de punto de control, por ejemplo, un inhibidor de punto de control descrito en este documento, o un inhibidor de cinasa, por ejemplo, un inhibidor de cinasa descrito en este documento; (6) administrar a un recidivante una terapia que aumenta el número de células T vírgenes en el sujeto antes del tratamiento con una terapia CAR; modificar un proceso de fabricación de una terapia CAR, por ejemplo, enriquecer para células T vírgenes antes de introducir un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo, para un sujeto identificado como un recidivante; o (7) seleccionar una terapia alternativa, por ejemplo, un estándar de atención para un cáncer particular (por ejemplo, como se describe en este documento), por ejemplo, para una recaída; tratando así el cáncer en el sujeto.

El tratamiento puede comprender la administración de uno, dos, tres o más inhibidores de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1 como se describe en este documento). Por ejemplo, en una realización, el tratamiento incluye administrar un inhibidor de CD19, por ejemplo, una célula que expresa un CAR CD19, en combinación con un inhibidor de CD22, o cualquier combinación de un inhibidor de CD22 y un inhibidor de CD10, CD20, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1 como se describe en este documento. En algunas realizaciones, el método comprende administrar uno, dos, tres o más inhibidores de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1, CD79b, CD179b o CD79a como se describe en este documento). Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, el tratamiento comprende además uno o ambos de: determinar un nivel de una molécula de punto de control inmunológico (por ejemplo, PD-L1, PD1, LAG3 o TIM3) en una muestra de paciente; y administrar un inhibidor de punto de control inmunológico (por ejemplo, un inhibidor de uno o más de PD-L1, PD1, LAG3 y TIM3) al paciente. Por ejemplo, el método puede comprender tratar a un paciente con una o más células que expresan CAR descritas en este documento (por ejemplo, CAR CD19 en combinación con un CAR CD22), y determinar el nivel de una molécula de punto de control inmunológico en el paciente antes o después del tratamiento. En algunas realizaciones, el método comprende administrar el inhibidor del punto de control inmunológico a un paciente que tiene niveles elevados de la molécula del punto de control inmunológico en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo, administrar un inhibidor de PD-L1 en respuesta a niveles elevados de PD-L1, administrar un inhibidor de PD1 en respuesta a niveles elevados de PD1, administrar un inhibidor de LAG3 en respuesta a niveles elevados de LAG3 o administrar un inhibidor de TIM3 en respuesta a niveles elevados de TIM3. En algunas realizaciones, el método comprende administrar un inhibidor de puntos de control inmunológico a un paciente que ha recibido, está recibiendo o está a punto de recibir terapia con una o más células que expresan CAR descritas en este documento (por ejemplo, CD19 CAR en combinación con un CD22 CAR), en el que el paciente tiene, o se identifica que tiene, niveles elevados de la molécula de punto de control inmunológico en comparación con un nivel de referencia.

COMPOSICIONES

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada, una molécula CAR o una célula o población de células de acuerdo con las reivindicaciones.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona, p. ej., una composición que comprende: (i) una o más células que expresan una molécula CAR que se une a CD19, p. ej., una molécula CAR que se une a CD19 descrita en el presente documento, p. ej., un CAR CD19, y (ii) un inhibidor de linfocitos B, p. ej., uno o más inhibidores de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. En la invención, una célula comprende una molécula de ácido nucleico o una molécula de CAR CD22 como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, (i) y (ii) se proporcionan por separado, y en algunas realizaciones, (i) y (ii) se mezclan.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona, p. ej., un ácido nucleico que codifica: (i) una molécula de CAR que se une a CD19, p. ej., una molécula de CAR que se une a CD19 descrita en el presente documento, p. ej., un CAR CD19, y (ii) uno o más inhibidores de linfocitos B, p. ej., inhibidores de uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona, p. ej., un ácido nucleico que codifica: (i) una molécula de CAR que se une a CD19, p. ej., una molécula de CAR que se une a CD19 descrita en el presente documento, p. ej., un CAR CD19, y (ii) una molécula de CAR que se une a un antígeno de linfocitos B, p. ej., uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. La molécula de ácido nucleico de la invención codifica un CAR CD22 como se define en las reivindicaciones. En realizaciones, el ácido nucleico comprende ARN o ADN.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona, p. ej., un ácido nucleico que codifica: (i) una molécula de CAR que se une a CD19, p. ej., una molécula de CAR que se une a CD19 descrita en el presente documento, p. ej., un CAR CD19, y (ii) una molécula de CAR que se une a un antígeno de linfocitos B, p. ej., uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a. La molécula de ácido nucleico de la invención codifica un CAR CD22 como se define en las reivindicaciones. En realizaciones, el ácido nucleico comprende ARN o ADN. En algunas realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican (i) y (ii) están situadas en la misma orientación, por ejemplo, la transcripción de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican (i) y (ii) procede en la misma dirección. En algunas realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican (i) y (ii) están situadas en diferentes orientaciones. En algunas realizaciones, un único promotor controla la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican (i) y (ii). En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un sitio de escisión de proteasa (tal como un sitio de escisión T2A, P2A, E2A o F2A) está situado entre las secuencias de ácido nucleico que codifican (i) y (ii). En algunas realizaciones, el sitio de escisión de la proteasa se coloca de manera que una célula pueda expresar una proteína de fusión que comprende (i) y (ii), proteína que posteriormente se procesa en dos péptidos mediante escisión proteolítica. En algunas realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican (i) están en dirección 5' de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican (ii), o las secuencias de ácidos nucleicos que codifican (ii) están en dirección 5' de las secuencias de

ácidos nucleicos que codifican (i). En realizaciones, un primer promotor controla la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica (i) y un segundo promotor controla la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica (ii). En realizaciones, el ácido nucleico es un plásmido. En realizaciones, el ácido nucleico comprende un elemento de empaquetamiento viral. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona una célula, p. ej., una célula efectora inmunitaria, que comprende el ácido nucleico descrito en el presente documento, p. ej., un ácido nucleico que comprende (i) y (ii) como se ha descrito anteriormente. La célula puede comprender una proteasa (p. ej., endógena o exógena) que escinde un sitio de escisión T2A, P2A, E2A o F2A.

En algunos aspectos, una composición puede comprender: (i) un primer ácido nucleico que codifica una molécula de CAR que se une a CD19, p. ej., una molécula de CAR que se une a CD19 descrita en el presente documento, p. ej., un CAR CD19, y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica uno o más inhibidores de linfocitos B, p. ej., inhibidores de uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. La molécula de ácido nucleico de la invención codifica un CAR CD22 como se define en las reivindicaciones. En algunos aspectos, una composición puede comprender: (i) un primer ácido nucleico que codifica una molécula de CAR que se une a CD19, p. ej., una molécula de CAR que se une a CD19 descrita en el presente documento, p. ej., un CAR CD19, y (ii) una molécula de CAR que se une a un antígeno de linfocitos B, p. ej., uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. La invención se refiere a un CAR CD22 como se define en las reivindicaciones. En realizaciones, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico comprenden cada uno ARN o ADN.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona, p. ej., un vector que comprende un ácido nucleico o ácidos nucleicos como se describe en el presente documento. La presente divulgación también proporciona, en determinados aspectos, una célula que comprende un vector o ácido nucleico como se describe en el presente documento.

Esta divulgación también proporciona, en determinados aspectos, una composición que comprende una o más células efectoras inmunitarias y: (i) un primer ácido nucleico que codifica, o un primer polipéptido que comprende, una molécula de CAR que se une a CD19, p. ej., una molécula de CAR que se une a CD19 descrita en el presente documento, p. ej., un CAR CD19, y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica, o un segundo polipéptido que comprende, una molécula de CAR que se une a un antígeno de linfocitos B, p. ej., uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a. La molécula de ácido nucleico y el CAR CD22 de la invención se definen en las reivindicaciones. En realizaciones, el primer ácido nucleico o primer polipéptido y el segundo ácido nucleico o segundo polipéptido están cada uno contenidos dentro, por ejemplo, expresados por, una primera célula efectora inmune. En realizaciones, la composición comprende una primera célula efectora inmune que contiene, por ejemplo, la expresión del primer ácido nucleico o el primer polipéptido y una segunda célula efectora inmune que contiene, por ejemplo, la expresión del segundo ácido nucleico o el segundo polipéptido. En realizaciones, la composición no comprende una célula que contenga, por ejemplo, que exprese, tanto el primer ácido nucleico o el primer polipéptido como el segundo ácido nucleico o el segundo polipéptido.

FABRICACIÓN

Se describe aquí un método para producir una célula, que comprende transducir una célula efectora inmune, por ejemplo, una célula T o una célula NK, con un vector como se describe en este documento, por ejemplo, un vector que codifica un CAR. También se describe en este documento un método para producir una célula, que comprende introducir un ácido nucleico como se describe en este documento (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR) en una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T o una célula NK. También se describe en este documento un método para generar una población de células modificadas mediante ARN que comprende introducir un ARN transcrito in vitro o un ARN sintético en una célula, en el que el ARN comprende un ácido nucleico como se describe en este documento, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR.

Los métodos de fabricación descritos en este documento pueden comprender además poner en contacto la población de células con un ácido nucleico que codifica una subunidad de la telomerasa, por ejemplo, hTERT. El ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa puede ser ADN.

El método de elaboración descrito en el presente documento puede comprender además cultivar la población de células en suero que comprende suero hAB al 2%.

INDICACIONES

La invención proporciona una célula o población de células para uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto de acuerdo con las reivindicaciones.

Una enfermedad asociada con la expresión de CD19 puede seleccionarse entre una enfermedad proliferativa como un cáncer o una neoplasia maligna o una condición precancerosa como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia, o es una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de CD19. En la invención, la enfermedad es un cáncer hematológico. En una realización, el cáncer hemático es una leucemia. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en una o más leucemias agudas que

incluyen, pero sin limitación, leucemia linfoide aguda de linfocitos B (LLAB), leucemia linfoide aguda de linfocitos T (LLAT), leucemia linfocítica de células pequeñas (LLP), leucemia linfoide aguda (LLA) (p. ej., LLA recidivante y refractaria); una o más leucemias crónicas incluyendo, pero sin limitación, leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC). Los cánceres o afecciones hemáticos adicionales incluyen, pero sin limitación, linfoma de células del manto (LCM), leucemia prolinfocítica de linfocitos B, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blástica, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, tricoleucemia, linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma de MALT, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasia plasmacitoide de células dendríticas, macroglobulinemia de Waldenstrom y "preleucemia". La preleucemia abarca un conjunto diverso de afecciones hemáticas unidas por una producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides. En algunas realizaciones, una enfermedad asociada con la expresión de CD19 incluye, pero sin limitación, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan CD19; y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, la enfermedad asociada con la expresión de CD19 es un linfoma, p. ej., LCM o linfoma de Hodgkin. En una realización, la enfermedad asociada con la expresión de CD19 es leucemia, p. ej., LLCP, LLC y/o LLA.

En una realización, el cáncer se elige entre LMA, LLA, LLA-B, LLA-T, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica, LMC, tricoleucemia, linfoma de Hodgkin, trastorno de mastocitos, síndrome mielodisplásico, neoplasia mieloproliferativa, mieloma de células plasmáticas, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides o una combinación de los mismos.

En una realización, el sujeto tiene, o se identifica que tiene, al menos 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de células cancerosas, por ejemplo, células DLBCL, que son CD3+/PD1+.

En una realización, el sujeto ha recaído o se identifica que ha recaído después del tratamiento con una o más células que expresan una molécula de CAR que se une a CD19, p. ej., un CAR CD19. En una realización, el sujeto ha recaído o se identifica que ha recaído en función de una o más reapariciones de blastos en la sangre, médula ósea (>5 %) o cualquier sitio extramedular, después de una respuesta completa. En una realización, el sujeto ha recaído o se identifica que ha recaído en función de la detección de blastos CD19- por encima de un umbral predeterminado, p. ej., por encima del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % o 10 %.

TERAPIAS CON CAR

La invención proporciona una célula o población de células para uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto de acuerdo con las reivindicaciones.

El tratamiento comprende una terapia CAR, por ejemplo, la administración de una o más células que expresan una o más moléculas CAR. Una célula que expresa una o más moléculas de CAR puede ser una célula efectora inmunitaria, p. ej., un linfocito T o un linfocito NK. En una realización, el sujeto es un ser humano.

En una realización, la célula que expresa la molécula de CAR comprende un vector que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de CAR. En una realización, el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector de lentivirus, un vector adenovírico o un vector de retrovirus. En una realización, el vector es un vector lentivírico. En una realización, el vector comprende, además, un promotor. En una realización, el promotor es un promotor EF-1. En una realización, el promotor EF-1 comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 100. En una realización, el vector es un vector transcrito *in vitro*, p. ej., un vector que transcribe ARN de una molécula de ácido nucleico descrita en esta memoria. En una realización, la secuencia de ácido nucleico en el vector *in vitro* comprende, además, una cola poli(A), p. ej., una cola poli A descrita en el presente documento, p. ej., que comprende aproximadamente 150 bases de adenosina. En una realización, la secuencia de ácido nucleico en el vector in vitro comprende además una 3'UTR, por ejemplo, una 3' UTR descrita en este documento, por ejemplo, que comprende al menos una repetición de una 3'UTR derivada de beta-globulina humana. En una realización, la secuencia de ácido nucleico en el vector *in vitro* comprende, además, un promotor. En una realización, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia T2A.

En una realización, la célula que expresa la molécula de CAR es una célula descrita en el presente documento, p. ej., un linfocito T humano o un linfocito NK humano, p. ej., un linfocito T humano descrito en el presente documento o un linfocito NK humano descrito en el presente documento. En una realización, el linfocito T humano es un linfocito T CD8+. En una realización, el linfocito T humano es un linfocito T CD4+. En una realización, el linfocito T humano es un linfocito T CD4+/CD8+. En una realización, el linfocito T humano es una mezcla de linfocitos T CD8+ y CD4+. En una realización, la célula es un linfocito T autólogo. En una realización, la célula es un linfocito T alogénico. En una realización, la célula es un linfocito T y el linfocito T es deficiente en diacilglicerol cinasa (DGK). En una realización, la célula es un linfocito T y el linfocito T es deficiente en Ikaros. En una realización, la célula es un linfocito T y el linfocito T es deficiente tanto en DGK como en Ikaros.

En otra realización, la célula que expresa la molécula CAR puede expresar además otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR.

En una realización, el tratamiento incluye administrar una célula que expresa la molécula CAR en combinación con un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR, en el que el agente es una citocina, por ejemplo, IL-7, IL-15, IL-21 o una combinación de las mismas. La citocina se puede administrar en combinación con, por ejemplo, simultáneamente o poco después, la administración de la célula que expresa CAR. Alternativamente, la citocina se puede administrar después de un período de tiempo prolongado después de la administración de la célula que expresa CAR, por ejemplo, después de la evaluación de la respuesta del sujeto a la célula que expresa CAR.

Por ejemplo, en una realización, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Los ejemplos de moléculas inhibidoras inmunitarias incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGF beta. En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora inmunitaria comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora inmunitaria tal como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD 160, 2B4 o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos (por ejemplo, al menos una porción del dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en este documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, CD27 o CD28, por ejemplo, como se describe en este documento) y/o un dominio de señalización primario (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en este documento). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento de este (p. ej., al menos una porción de un dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej. un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento).

La infusión de linfocitos, por ejemplo, la infusión de linfocitos alogénicos, se puede utilizar en el tratamiento del cáncer, en el que la infusión de linfocitos comprende al menos una célula que expresa CAR CD19 descrita en este documento y al menos una célula que expresa un CAR dirigido contra un antígeno de células B. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula CAR CD22 como se define en las reivindicaciones. La infusión de linfocitos autólogos se puede utilizar en el tratamiento del cáncer, en el que la infusión de linfocitos autólogos comprende al menos una célula que expresa CD19 y opcionalmente al menos una célula que expresa un CAR dirigido contra un antígeno de células B. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula CAR CD22 como se define en las reivindicaciones.

En una realización, la célula que expresa CAR, p. ej., linfocito T, se administra a un sujeto que ha recibido un trasplante previo de células madre, p. ej., un trasplante autólogo de células madre, o un sujeto que ha recibido una dosis previa de melfalán.

En una realización, la célula que expresa la molécula CAR se administra en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula CAR o con la administración del inhibidor de células B, por ejemplo, un agente descrito en este documento.

En una realización, la célula que expresa la molécula CAR y el inhibidor de células B se administran en combinación con un agente adicional que trata la enfermedad asociada con CD19, por ejemplo, un agente adicional descrito en este documento.

En una realización, las células que expresan una molécula CAR se administran a una dosis y/o programa de dosificación descrito en este documento.

En una realización, la molécula de CAR se introduce en linfocitos T, p. ej., utilizando transcripción *in vitro*, y el sujeto (p. ej., ser humano) recibe una administración inicial de células que comprenden una molécula de CAR y una o más administraciones posteriores de células que comprenden una molécula de CAR, en donde la o las administraciones posteriores se administran menos de 15 días, p. ej., 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días después de la administración anterior. En una realización, se administra al sujeto más de una administración de células que comprenden una molécula de CAR (p. ej., ser humano) por semana, p. ej., se administran 2, 3 o 4 administraciones por semana de células que comprenden una molécula de CAR. En una realización, el sujeto (p. ej., sujeto humano) recibe más de una administración de células que comprenden una molécula de CAR por semana (p. ej., 2, 3 o 4 administraciones por semana) (también denominado en esta memoria un ciclo), seguido de una semana sin administración de células que comprenden una molécula de CAR y después se administran al sujeto una o más administraciones adicionales de células que comprenden una molécula de CAR (p. ej., más de una administración de las células que comprenden una molécula de CAR por semana). En otra realización, el

sujeto (p. ej., sujeto humano) recibe más de un ciclo de células que comprenden una molécula de CAR y el tiempo entre cada ciclo es inferior a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días. En una realización, las células que comprenden una molécula de CAR se administran cada dos días para 3 administraciones por semana. En una realización, las células que comprenden una molécula de CAR se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

En una realización, la terapia se administra como tratamiento de primera línea para el cáncer. En otra realización, la terapia se administra como un tratamiento de segunda, tercera o cuarta línea para el cáncer.

En una realización, se administra una población de células de acuerdo con las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la población de células se aísla o purifica.

En una realización, el método incluye administrar una población de células, una pluralidad de las cuales comprenden una molécula CAR de acuerdo con las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la población de células que expresan CAR comprende una mezcla de células que expresan diferentes CAR. Por ejemplo, una población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión anti-CD19 descrito en este documento, y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno de células B diferente. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la primera y la segunda población de células son células T. En algunas realizaciones, la primera y la segunda población de células T son del mismo isotipo, por ejemplo, ambas son células T CD4+ o ambas son células T CD8+. En otras realizaciones, la primera y la segunda población de células T son isotipos diferentes, por ejemplo, la primera población comprende células T CD4+ y la segunda población comprende células T CD8+. En algunas realizaciones, la primera y la segunda población de células T son tipos de células descritos en el documento WO2012/129514. Como otro ejemplo, una población de células puede comprender un solo tipo celular que expresa un CAR que tiene un dominio de unión anti-CD19 descrito en el presente documento y un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno de linfocitos B diferente. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. Como otro ejemplo, una población de células puede comprender un único tipo de célula que expresa un CAR que tiene dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) dominios de unión a antígeno de células B, por ejemplo, es un CAR biespecífico. Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, como se describe en este documento, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión a antígeno a CD22. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. En una realización, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización intracelular primario y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario. En una realización, la población de células que expresan CAR incluye, por ejemplo, una primera célula que expresa un CAR que incluye un primer dominio de señalización secundario, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario diferente del primer dominio de señalización secundario.

Cuando el primer inhibidor de células B es una célula que expresa CAR CD19 y el segundo inhibidor de células B es una célula que expresa CAR CD22, el primer CAR y el segundo CAR pueden ser expresados por el mismo tipo de célula o por tipos diferentes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula que expresa un CAR CD19 es un linfocito T CD4+ y la célula que expresa un CAR CD22 es un linfocito T CD8+, o la célula que expresa un CAR CD19 es un linfocito T CD8+ y la célula que expresa un CAR CD22 es un linfocito T CD4+. En otras realizaciones, la célula que expresa un CAR CD19 es un linfocito T y la célula que expresa un CAR CD22 es un linfocito NK, o la célula que expresa un CAR CD19 es un linfocito NK y la célula que expresa un CAR CD22 es un linfocito T. En otras realizaciones, la célula que expresa un CAR CD19 y la célula que expresa un CAR CD22 son ambas linfocitos NK o son ambas linfocitos T, p. ej., son ambas linfocitos T CD4+ o son ambas linfocitos T CD8+. En otras realizaciones más, una única célula expresa el CAR CD19 y CAR CD22 y esta célula es, por ejemplo, un linfocito NK o un linfocito T tal como un linfocito T CD4+ o linfocito T CD8+. El primer CAR y el segundo CAR pueden comprender el mismo o diferentes dominios de señalización intracelulares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el CAR CD19 comprende un dominio de señalización de CD3 zeta y el CAR CD22 comprende un dominio coestimulante, p. ej., un dominio coestimulante de 41BB, CD27 o CD28, mientras que, en algunas realizaciones, el CAR CD19 comprende un dominio coestimulante, p. ej., un dominio coestimulante de 41BB, CD27 o CD28 y el CAR CD22 comprende un dominio de señalización de CD3 zeta. En otras realizaciones, cada uno del CAR CD19 y el CAR CD22 comprende el mismo tipo de dominio de señalización primaria, p. ej., un dominio de señalización de CD3 zeta, pero el CAR CD19 y el CAR CD22 comprenden dominios coestimulantes diferentes, p. ej., (1) el CAR CD19 comprende un dominio coestimulante de 41BB y el CAR CD22 comprende un dominio coestimulante diferente, p. ej., un dominio coestimulante de CD27, (2) el CAR CD19 comprende un dominio coestimulante de CD27 y el CAR CD22 comprende un dominio coestimulante diferente, p. ej., un dominio coestimulante de 41BB, (3) el CAR CD19 comprende un dominio coestimulante de 41BB y el CAR CD22 comprende un dominio coestimulante de CD28, (4) el CAR CD19 comprende un dominio coestimulante de CD28 y el CAR CD22 comprende un dominio coestimulante diferente, p. ej., un dominio coestimulante de 41BB, (5) el CAR CD19

comprende un dominio coestimulante de CD27 y el CAR CD22 comprende un dominio coestimulante de CD28 o (6) el CAR CD19 comprende un dominio coestimulante de CD28 y el CAR CD22 comprende un dominio coestimulante de CD27. En otra realización, una célula comprende un CAR que comprende tanto un dominio de unión al antígeno CD19 como un dominio de unión al antígeno CD22, p. ej., un anticuerpo biespecífico.

En una realización, el dominio coestimulante 4-1BB comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio coestimulante 4-1BB comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio coestimulador 4-1BB está codificado por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 60, o una secuencia con una identidad del 95-99 % de la misma.

En una realización, el dominio coestimulante CD27 comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio coestimulante CD27 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio coestimulador CD27 está codificado por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17, o una secuencia con una identidad del 95-99 % de la misma.

En una realización, el dominio coestimulante CD28 comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 1317. En una realización, el dominio coestimulante CD28 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1317, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1317. En una realización, el dominio coestimulador CD28 está codificado por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1318, o una secuencia con una identidad del 95-99 % de la misma.

En una realización, el dominio coestimulante ICOS de tipo silvestre comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 1319. En una realización, el dominio coestimulante ICOS de tipo silvestre comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1319, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1319. En una realización, el dominio coestimulante ICOS de tipo silvestre está codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1320, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con la misma.

En una realización, el dominio coestimulante ICOS mutante de Y a F comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 1321. En una realización, el dominio coestimulante ICOS mutante de Y a F comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1321, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1321. En una realización, el dominio coestimulante ICOS mutante de Y a F está codificado por una secuencia de ácido nucleico con una identidad del 95-99 % con una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1320 (en donde la SEQ ID NO: 1320 codifica ICOS de tipo silvestre).

En algunas realizaciones, el dominio de señalización primaria comprende un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En algunas realizaciones, el dominio de señalización funcional de CD3 zeta comprende la SEQ ID NO: 17 (CD3 zeta mutante) o la SEQ ID NO: 43 (CD3 zeta humana de tipo silvestre).

En una realización, el tratamiento incluye administrar una población de células en la que al menos una célula en la población expresa un CAR y un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR, por ejemplo, una segunda célula que expresa el agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inmunoinhibidora. Los ejemplos de moléculas inhibidoras inmunitarias incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGF beta. En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora inmunitaria comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, p. ej., de una molécula inhibidora tal como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (e.g., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos (p. ej., al menos una parte de un dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., que comprende un dominio coestimulador (p. ej., 41BB, CD27 o CD28, p. ej., como se describe en esta memoria) y/o un dominio de señalización primario (p. ej., un dominio de señalización CD3 zeta descrito en esta memoria). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento de este (p. ej., al menos una porción de un dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el

presente documento (p. ej. un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento).

En una realización, el tratamiento comprende además trasplantar una célula, por ejemplo, una célula madre hematopoyética o una médula ósea, al mamífero.

En otro aspecto, se describe aquí una célula que expresa una molécula CAR descrita aquí, por ejemplo, una molécula CAR CD19, para su uso como medicamento en combinación con un inhibidor de células B. En otro aspecto, se describe en este documento un inhibidor de células B para uso como medicamento en combinación con una célula que expresa una molécula CAR, por ejemplo, una molécula CAR CD19, descrita en este documento. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, se describe aquí una célula que expresa una molécula CAR descrita aquí, por ejemplo, una molécula CAR CD19, para su uso en combinación con un inhibidor de células B, en el tratamiento de una enfermedad que expresa CD19. En otro aspecto, se describe aquí un inhibidor de células B para su uso en combinación con una célula que expresa una molécula CAR descrita aquí, por ejemplo, una molécula CAR CD 19, en el tratamiento de una enfermedad que expresa CD19. En otro aspecto, se describe en este documento una célula que expresa una molécula CAR descrita en este documento, por ejemplo, una molécula CAR CD19, para uso en combinación con un inhibidor de células B, en el tratamiento de un cáncer. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones, y la invención proporciona una célula o población de células que comprende la molécula de ácido nucleico o la molécula CAR de la invención, para uso en un método de tratamiento del cáncer hematológico.

En una realización, el tratamiento incluye administrar una población de células en la que al menos una célula en la población expresa un CAR CD22 de acuerdo con las reivindicaciones y un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR, en el que el agente es una citocina, por ejemplo, IL-7, IL-15, IL-21 o una combinación de las mismas. La citocina se puede suministrar en combinación con, p. ej., simultáneamente o poco después de, la administración de la o las células que expresan CAR. Como alternativa, la citocina se puede suministrar después de un periodo prolongado de tiempo después de la administración de la o las células que expresan CAR, p. ej., después de la evaluación de la respuesta del sujeto a la o las células que expresan CAR. También se proporcionan composiciones relacionadas para su uso y métodos para preparar un medicamento.

En una realización, las células que expresan una molécula CAR CD22 se administran en combinación con un agente que aumenta la eficacia de una célula que expresa una molécula CAR o uno de los inhibidores, por ejemplo, un agente descrito en este documento.

En una realización, las células que expresan una molécula CAR CD22 se administran en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula CAR o uno de los inhibidores, por ejemplo, un agente descrito en este documento.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula o población de células para uso en un método de tratamiento de un paciente que no responde, responde parcialmente o recae a un inhibidor de CD19, por ejemplo, una terapia con CAR CD19, que comprende administrar al paciente un inhibidor de células B, por ejemplo, un inhibidor de uno o más de (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todos) CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. En consecuencia, en realizaciones, el inhibidor de células B es una célula que expresa CAR (por ejemplo, una célula T o una célula NK) que es un inhibidor de CD22, de acuerdo con las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el paciente tiene, o se identifica que tiene, una célula cancerosa CD19-negativa y una célula cancerosa que es positiva para uno o más de (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o todos) CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a. En realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de células B para el cual la célula cancerosa es positiva, por ejemplo, un inhibidor de uno o más de (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o todos) los CD10, CD20, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a para los cuales la célula cancerosa es positiva. En algunas realizaciones, el método comprende además una o ambas etapas: una etapa para determinar si el paciente comprende una célula cancerosa CD19-negativa y una etapa para determinar si el paciente comprende una célula cancerosa que es positiva para CD22. En algunas realizaciones, el sujeto tiene o se identifica que tiene una población de células tumorales o cancerosas que dan negativo en la prueba de expresión de CD19, medida mediante la unión a un anticuerpo anti-CD19, por ejemplo, un anticuerpo con la misma especificidad que cualquiera de las moléculas CAR en la Tabla 2 o la Tabla 3.

En otro aspecto, la invención presenta una composición que comprende una célula que expresa una molécula de Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) que se une a CD19, en combinación con un inhibidor de células B que es un inhibidor de CD22 de acuerdo con las reivindicaciones. La célula que expresa CAR y el inhibidor de linfocitos B pueden estar presentes en una forma de dosis individual o en dos o más formas de dosis.

En una realización, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable.

INHIBIDORES DE CD19

La invención se refiere a los CAR CD22 como se definen en las reivindicaciones.

También se describe en este documento un inhibidor de CD19 que puede ser una molécula pequeña, un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo o una terapia celular.

El inhibidor de CD19 (por ejemplo, una terapia celular o un anticuerpo) se puede administrar en combinación con, o está presente en una composición junto con, un inhibidor de células B, por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a. En la invención, el inhibidor de células B es un CAR CD22 como se define en las reivindicaciones.

Una célula puede expresar una molécula CAR que comprende un dominio de unión anti-CD19 (por ejemplo, un anticuerpo murino o humanizado o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD19), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización primario). El CAR puede comprender un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-CD19 descrito en este documento (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo murino o humanizado que se une específicamente a CD19 como se describe en este documento), un dominio transmembrana descrito en este documento y un dominio de señalización intracelular descrito en este documento (por ejemplo, un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización primario descrito en este documento).

La molécula CAR puede comprender un dominio de unión anti-CD19 que comprende una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en este documento, y una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en este documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 que comprende una o más, por ejemplo, las tres, CDR LC y una o más, por ejemplo, las tres, CDR HC. El dominio de unión anti-CD19 puede comprender una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en este documento, por ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 tiene dos regiones de cadena pesada variables, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en este documento. El dominio de unión anti-CD19 puede comprender una región variable de cadena ligera murina descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 3) y/o una región variable de cadena pesada murina descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 3). El dominio de unión anti-CD19 puede ser un scFv que comprende una cadena ligera murina y una cadena pesada murina de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. El dominio de unión anti-CD19 (por ejemplo, un scFv) puede comprender: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. El dominio de unión anti-CD19 puede comprender una secuencia de SEQ ID NO: 59, o una secuencia con una identidad del 95-99% de la misma. El dominio de unión anti-CD19 puede ser un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 3, está unida a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 3, a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador descrito en este documento. El dominio de unión anti-CD19 puede incluir un enlazador (Gly4-Ser)n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, por ejemplo, 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador-región variable de cadena ligera.

La molécula CAR puede comprender un dominio de unión anti-CD19 humanizado que incluye una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1), e región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en este documento, y una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1),

región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en este documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. El dominio de unión anti-CD 19 humanizado puede comprender al menos HC CDR2. El dominio de unión anti-CD19 humanizado puede comprender una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en este documento, por ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado tiene dos regiones de cadena pesada variables, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en este documento. El dominio de unión anti-CD19 humanizado puede comprender al menos HC CDR2. La región variable de la cadena ligera puede comprender una, dos, tres o las cuatro regiones marco de la secuencia de la línea germinal VK3_L25. La región variable de la cadena ligera puede tener una modificación (por ejemplo, sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de la cadena ligera murina de SEQ ID NO: 58, p. ej., una sustitución en una o más de las posiciones 71 y 87). La región variable de la cadena pesada puede comprender una, dos, tres o las cuatro regiones marco de la secuencia de la línea germinal VH4_4-59. La región variable de la cadena pesada puede tener una modificación (por ejemplo, sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de la cadena pesada murina de SEQ ID NO: 58, p. ej., una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73 y 78). El dominio de unión anti-CD19 humanizado puede comprender una región variable de cadena ligera descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 2) y/o una región variable de cadena pesada descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 2). El dominio de unión anti-CD19 humanizado puede ser un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2. El dominio de unión anti-CD 19 humanizado (por ejemplo, un scFv) puede comprender: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 2, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 2, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2. El dominio de unión anti-CD19 humanizado puede comprender una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con la misma. El dominio de unión anti-CD19 humanizado puede ser un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 2, está unida a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 2, a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador descrito en este documento. El dominio de unión anti-CD19 humanizado puede incluir un enlazador (Gly4-Ser)n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, por ejemplo, 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador-región variable de cadena ligera.

La molécula CAR puede comprender un dominio de unión anti-CD19 que incluye uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6) LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 de un constructo de la Tabla 4 y 5, por ejemplo, CART19 murino, CART19 a humanizado, CART19 b humanizado o CART19 c humanizado.

La molécula CAR puede comprender una secuencia líder, por ejemplo, una secuencia líder descrita en este documento, por ejemplo, una secuencia líder de SEQ ID NO: 13, o que tiene una identidad del 95-99% con el mismo; un dominio de unión anti-CD19 descrito en este documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 que comprende una LC CDR1, una LC CDR2, una LC CDR3, una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en este documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 murino descrito en la Tabla 3, un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en la Tabla 2, o una secuencia con una identidad del 95-99% con el mismo; una región bisagra, por ejemplo, una región bisagra descrita en este documento, por ejemplo, una región bisagra de SEQ ID NO: 14 o que tiene una identidad del 95-99% con el mismo; un dominio transmembrana, por ejemplo, un dominio transmembrana descrito en este documento, por ejemplo, un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15 o una secuencia que tiene una identidad del 95-99% con la misma; un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en este documento (por ejemplo, un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización primario). El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio coestimulador descrito en este documento, por ejemplo, un dominio coestimulador 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51, o que tiene una identidad del 95-99 % de la misma, y/o un dominio de señalización primario, por ejemplo, un dominio de señalización primario

descrito en este documento, por ejemplo, un dominio estimulador CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO:43, o que tiene una identidad del 95-99% con las mismas.

La molécula de CAR puede comprender (por ejemplo, consistir en) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, 10, 15, 20 o 30 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 60, 50 o 40 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42. NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 o SEQ ID NO:42, o una secuencia de aminoácidos que tiene 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 o SEQ ID NO:42.

La presente descripción se refiere en general, en algunos aspectos, al uso de células, por ejemplo, células T o células asesinas naturales (NK), diseñadas para expresar un CAR en combinación con uno o más inhibidores de células B para tratar una enfermedad asociada con la expresión de la proteína del grupo de diferenciación 19 (CD19). El inhibidor de células B puede ser un inhibidor de uno o más de CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a. En la invención, el inhibidor de células B es un CAR CD22 como se define en las reivindicaciones.

El inhibidor de CD19 puede comprender una molécula de anticuerpo que tiene, por ejemplo, una molécula de anticuerpo que tiene una secuencia de unión a CD19 como se describe en este documento. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede comprender las CDR o un VH y VL como se describe en cualquiera de las Tablas 2, 3, 4 y 5, o una secuencia con homología con las mismas, por ejemplo, que tenga una identidad del 95-99% con las mismas. La molécula de anticuerpo puede comprender una región de unión a CD19 que tiene una secuencia descrita en esta sección, p. ej., en el contexto de un CAR.

El inhibidor de células B se puede escoger de un ácido nucleico inhibidor, un ligando soluble, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un CAR o una célula que expresa CAR que se une a uno o más antígenos de células B, por ejemplo, uno o más de CD 10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a. En la invención, el inhibidor de células B es un CAR CD22 como se define en las reivindicaciones.

DOMINIOS DE UNIÓN A CD20 E INHIBIDORES

También se describe en este documento un inhibidor de CD20 o un dominio de unión, por ejemplo, un inhibidor de CD20 o un dominio de unión como se describe en este documento. También se describe un ácido nucleico que codifica el dominio de unión de CD20, por ejemplo, que codifica un CAR que comprende el dominio de unión de CD20. La composición también puede comprender un segundo agente, p. ej., una célula que expresa CAR anti-CD19 o un dominio de unión a CD19. Los agentes pueden estar, p. ej., codificados por un solo ácido nucleico o diferentes ácidos nucleicos.

Se puede administrar un inhibidor de CD20 o un dominio de unión como monoterapia. El inhibidor de CD20 o el dominio de unión se pueden administrar en combinación con un segundo agente, como una célula que exprese CAR anti-CD19. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula CD22 CAR o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

El inhibidor de CD20 puede ser, p. ej., una molécula pequeña, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un CAR o una célula que expresa CAR. El inhibidor de CD20 puede ser un anticuerpo anti-CD20 o un fragmento del mismo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoespecífico o un anticuerpo biespecífico. El inhibidor de CD20 puede ser un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón/humano, por ejemplo, rituximab. El inhibidor de CD20 puede ser un anticuerpo monoclonal humano como ofatumumab. El inhibidor de CD20 puede ser un anticuerpo humanizado como ocrelizumab, veltuzumab, obinutuzumab, ocaratuzumab o PRO131921 (Genentech). El inhibidor de CD20 puede ser una proteína de fusión que comprende una porción de un anticuerpo anti-CD20, como TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals).

El inhibidor de CD20 puede ser una célula que exprese anti-CD20, por ejemplo, una CART CD20 o una célula NK que exprese CD20.

El CD20-CAR puede comprender una secuencia líder opcional (por ejemplo, una secuencia líder opcional descrita en este documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra (por ejemplo, bisagra descrita en este documento), un dominio transmembrana (por ejemplo, dominio transmembrana descrito en este documento) y un dominio estimulador intracelular (por ejemplo, dominio estimulador intracelular descrito en este documento). Un constructo CD20 CAR ejemplar comprende una secuencia líder opcional (por ejemplo, una secuencia líder

descrita en este documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador intracelular (por ejemplo, un dominio coestimulador intracelular descrito en este documento) y un dominio estimulador intracelular.

El dominio de unión de CD20 puede comprender una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión de CD20 descrito en este documento, y/o una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión de CD20 descrito en este documento, por ejemplo, un dominio de unión de CD20 que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. Estos CDR pueden ser, por ejemplo, los de la Tabla 12A, 12B y/o la Tabla 13. El dominio de unión de CD20 puede comprender una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión de CD20 descrito en este documento, por ejemplo, el dominio de unión de CD20 tiene dos regiones de cadena pesada variables, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en este documento. El dominio de unión de CD20 puede comprender una región variable de cadena ligera descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 15A o 15B) y/o una región variable de cadena pesada descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 14A o 14B). El dominio de unión de CD20 puede comprender una región variable de cadena pesada descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 14A o 14B), por ejemplo, al menos dos regiones variables de cadena pesada descritas en este documento (por ejemplo, en la Tabla 14A o 14B). El dominio de unión de CD20 puede ser un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 14A o 14B o 15A o 15B. El dominio de unión a CD20 (por ejemplo, un scFv) puede comprender: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 15A o 15B, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 15A o 15B; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 14A o 14B, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 14A o 14B. El dominio de unión a CD20 puede ser parte de, p. ej., una molécula de anticuerpo o una molécula de CAR.

La molécula CAR puede comprender un dominio de unión anti-CD20 que incluye uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6) LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 de una construcción de la Tabla 12A, 12B y/o 13, por ejemplo, CAR20-1, CAR20-2, CAR20-3, CAR20-4, CAR20-5, CAR20-6, CAR20-7, CAR20-8, CAR20-9, CAR20-10, CAR20-11, CAR20-12, CAR20-13, CAR20-14, CAR20-15, o CAR20-16.

La molécula CAR puede comprender un dominio de unión anti-CD22 que incluye una VL y/o VH de una construcción de la Tabla 14A o 14B y 15A o 15B, por ejemplo, CAR20-1, CAR20-2, CAR20-3, CAR20-4, CAR20-5, CAR20-6, CAR20-7, CAR20-8, CAR20-9, CAR20-10, CAR20-11, CAR20-12, CAR20-13, CAR20-14, CAR20-15, o CAR20-16.

El scFv de CD20 puede estar precedido por una secuencia líder opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 13, y seguido de una secuencia bisagra opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49, una región transmembrana tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:51 y una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO:43, por ejemplo, en el que los dominios son contiguos y están en el mismo marco de lectura para formar una única proteína de fusión.

También se describe una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de cualquiera de las Tablas 11A-15B. También se describe una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido cualquiera de las Tablas 11A-15B, y cada uno de los dominios de SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17 y, opcionalmente, 51.

El dominio de unión de CD20 puede caracterizarse por características o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, la porción de una composición de CAR que comprende un dominio de unión a antígeno puede unirse específicamente a CD20 humano o un fragmento del mismo.

El dominio de unión de CD20 puede ser un fragmento, por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv). El dominio de unión de CD20 puede ser un Fv, un Fab, un (Fab')2 o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico) (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden unirse a una proteína CD20 o un fragmento de la misma con afinidad de tipo salvaje o mejorada. En algunos casos, un scFv humano puede obtenerse de una biblioteca de presentación.

El dominio de unión de CD20, por ejemplo, scFv, puede comprender al menos una mutación tal que el scFv mutado confiera una estabilidad mejorada a la construcción CART20. El dominio de unión de CD20, por ejemplo, scFv, puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones que surgen, por ejemplo, del proceso de humanización, de modo que el scFv mutado confiere una estabilidad mejorada al constructo CART20.

El inhibidor de CD20 puede comprender una molécula de anticuerpo que tiene, por ejemplo, una molécula de anticuerpo que tiene una secuencia de unión a CD20 como se describe en este documento. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede comprender CDR o un VH y VL como se describe en cualquiera de las Tablas 11A-15B, o una secuencia con homología con las mismas, por ejemplo, que tenga una identidad del 95-99% con las mismas. La molécula de anticuerpo puede comprender una región de unión a CD20 que tiene una secuencia descrita en esta sección, p. ej., en el contexto de un CAR.

En algunos aspectos, un dominio de unión o una molécula de anticuerpo descritos en este documento unen el mismo (o sustancialmente el mismo) o un epítopo superpuesto (o sustancialmente superpuesto) con una segunda molécula de anticuerpo a CD20, en el que la segunda molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo descrita en este documento, por ejemplo, una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 11A-15B. Un dominio de unión o molécula de anticuerpo descrito en este documento puede competir por la unión, y/o se une al mismo (o sustancialmente el mismo) o superpuesto (o sustancialmente superpuesto) epítopo, con una segunda molécula de anticuerpo a CD20, en el que la segunda molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo descrita en este documento, por ejemplo, una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 11A-15B, por ejemplo, como se determina mediante los métodos descritos en el Ejemplo 25. Un dominio de unión de CD20 biparatópico puede unirse a un primer epítopo, por ejemplo, un epítopo unido por una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 11A-15B, y el dominio de unión biparatópico también se une a un segundo epítopo, por ejemplo, un segundo epítopo unido por una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 11A-15B. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento que comprende administrar un primer dominio de unión a CD20 que se une a un primer epítopo, por ejemplo, un epítopo unido por una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 11A-15B y un segundo dominio de unión a CD20 que se une a un segundo epítopo, por ejemplo, un segundo epítopo unido por una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 11A-15B. Los dominios de unión de CD20 pueden ser parte de moléculas CAR, por ejemplo, expresadas por una célula que expresa CAR.

DOMINIOS DE UNIÓN A CD22 E INHIBIDORES

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un dominio de unión o inhibidor de CD22, p. ej., un dominio de unión o inhibidor de CD22 como se describe en el presente documento. La divulgación también proporciona un ácido nucleico que codifica el dominio de unión a CD22, p. ej., que codifica un CAR que comprende el dominio de unión a CD22. La composición también puede comprender un segundo agente, p. ej., una célula que expresa CAR anti-CD19 o un dominio de unión a CD19. Los agentes pueden estar, p. ej., codificados por un solo ácido nucleico o diferentes ácidos nucleicos.

En algunos aspectos, un inhibidor de CD22 o un dominio de unión se administra como monoterapia. En algunos aspectos, el inhibidor de CD22 o dominio de unión se administra en combinación con un segundo agente tal como una célula que expresa CAR anti-CD19.

En la invención, el inhibidor de CD22 es un CAR o una célula que expresa CAR como se define en las reivindicaciones.

En una realización, el inhibidor de CD22 es un CART CD22 o una célula NK que expresa CD22.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células que expresan CAR, por ejemplo, linfocitos CART, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD22 según las reivindicaciones. Por ejemplo, en una realización, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR CD22. Como otro ejemplo, la población de linfocitos CAR T puede incluir una única población que exprese más de uno, p. ej., 2, 3, 4, 5 o 6 o más, CAR, p. ej., un CAR CD19 y un CAR CD22.

En algunas realizaciones, el CAR-CD22 comprende una secuencia líder opcional (p. ej., una secuencia líder opcional descrita en el presente documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra (p. ej., bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (p. ej., dominio transmembrana descrito en el presente documento) y un dominio estimulante intracelular (p. ej., dominio estimulante intracelular descrito en el presente documento). En una realización, una construcción de CAR CD22 ilustrativa comprende una secuencia líder opcional (p. ej., una secuencia líder descrita en el presente documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembrana, un dominio coestimulante intracelular (p. ej., un dominio coestimulante intracelular descrito en el presente documento) y un dominio estimulante intracelular.

Un dominio de unión a CD22 puede comprender una o más (por ejemplo, las tres) regiones determinantes complementarias de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante complementaria de cadena ligera 2 (LC

CDR2) y región determinante complementaria de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión a CD22, y/o una o más (por ejemplo, las tres) regiones determinantes complementarias de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante complementaria de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante complementaria de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión a CD22, por ejemplo, un dominio de unión a CD22 que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. En la invención, el dominio de unión a CD22 comprende: (i) una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1) TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 648), una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) DVSNRPS (SEQ ID NO: 659), y una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 670); y (ii) una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1) GDSMLSNSDTWN (SEQ ID NO: 498) o SNSDTWN (SEQ ID NO: 1345), una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 509) o RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 1354), y una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 520) o VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 1363). En algunas realizaciones, el dominio de unión de CD22 comprende una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 690 o una secuencia con una identidad de secuencia del 95-99% con la misma y una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 680 o una secuencia con una identidad de secuencia del 95-99% con la misma. El dominio de unión a CD22 puede ser parte de, p. ej., una molécula de anticuerpo o una molécula de CAR.

El scFv puede estar precedido por una secuencia líder opcional como se proporciona en SEQ ID NO: 13, y seguido de una secuencia bisagra opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49, una región transmembrana tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:51 y una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO:43, por ejemplo, en el que los dominios son contiguos y están en el mismo marco de lectura para formar una única proteína de fusión.

En una realización, el dominio de unión a CD22 se caracteriza por características o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, en una realización, la porción de una composición de CAR de la invención que comprende un dominio de unión a antígeno se une específicamente a CD22 humano o un fragmento del mismo.

En una realización, el dominio de unión a CD22 es un fragmento, p. ej., un fragmento variable monocatenario (scFv). En una realización, el dominio de unión de CD22 es un Fv, un Fab, un (Fab')2 o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico) (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la divulgación se unen a la proteína CD22 o un fragmento de la misma con una afinidad de tipo silvestre o potenciada. En algunos casos, un scFv humano puede obtenerse de una biblioteca de presentación.

En una realización, el dominio de unión a CD22, por ejemplo, scFv, comprende al menos una mutación de modo que el scFv mutado confiere una mejora de la estabilidad a la construcción de CART22. En otra realización, el dominio de unión a CD22, p. ej., scFv, comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones que surgen, p. ej., del proceso de humanización, de modo que el scFv mutado confiere una mejora de la estabilidad a la construcción de CART22.

En una realización, la presente divulgación proporciona una población de células que expresan CAR, p. ej., linfocitos CART, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD22. Por ejemplo, en una realización, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD 19 y una segunda célula que expresa un CAR CD22.

En algunos aspectos, un dominio de unión o una molécula de anticuerpo descritos en este documento unen el mismo (o sustancialmente el mismo) o un epítopo superpuesto (o sustancialmente superpuesto) con una segunda molécula de anticuerpo a CD22, en el que la segunda molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo descrita en este documento, por ejemplo, una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 6A-10B. Un dominio de unión o molécula de anticuerpo descrito en este documento puede competir por la unión, y/o se une al mismo (o sustancialmente el mismo) o superpuesto (o sustancialmente superpuesto) epítopo, con una segunda molécula de anticuerpo a CD22, en el que la segunda molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo descrita en este documento, por ejemplo, una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 6A-10B, por ejemplo, como se determina mediante los métodos descritos en el Ejemplo 25. Un dominio de unión de CD22 biparatópico puede unirse a un primer epítopo, por ejemplo, un epítopo unido por una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 6A-10B, y el dominio de unión biparatópico también se une a un segundo epítopo, por ejemplo, un segundo epítopo unido por una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 6A-10B. Un tratamiento puede comprender la administración de un primer dominio de unión a CD22 que se une a un primer epítopo, por ejemplo, un epítopo unido por una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 6A-10B y un segundo dominio de unión a CD22 que se une a un segundo epítopo, por ejemplo, un segundo epítopo unido por una molécula de anticuerpo elegida de las Tablas 6A-10B. Los dominios de unión de CD22 pueden ser parte de moléculas CAR, por ejemplo, expresadas

por una célula que expresa CAR. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de ácido nucleico o una molécula CAR como se define en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, un dominio de unión de CD22 se une a uno o más de los dominios similares a Ig 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de CD22. En algunas realizaciones, el dominio de unión de CD22 se une a los dominios 1 y 2; a los dominios 3 y 4; o a los dominios 5, 6 y 7.

Se describe un método para tratar un cáncer CD19-negativo, por ejemplo, una leucemia, por ejemplo, una LLA, por ejemplo, LLA-B, que comprende administrar una célula que expresa CAR CD22 de acuerdo con las reivindicaciones. La invención proporciona una célula o población de células de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto. En algunas realizaciones, el método incluye una etapa para determinar si el cáncer es CD19-negativo. En algunas realizaciones, el sujeto ha recibido un inhibidor de CD19, por ejemplo, una célula que expresa CAR CD19, y es resistente, recidivante o refractario al inhibidor de CD19.

INHIBIDORES DE ROR1

La invención se refiere a los CAR CD22 como se definen en las reivindicaciones.

También se describen en este documento inhibidores de ROR1 que pueden ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un anticuerpo o un fragmento del mismo. El inhibidor de ROR1 puede ser un anticuerpo anti-ROR1 o un fragmento del mismo. El anticuerpo anti-ROR1 o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, cirmtuzumab.

El inhibidor de ROR1 puede ser una célula que exprese anti-ROR1, por ejemplo, una célula CART ROR1 o una célula NK que exprese ROR1.

El ROR1-CAR puede comprender una secuencia líder opcional (por ejemplo, una secuencia líder opcional descrita en este documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra (por ejemplo, bisagra descrita en este documento), un dominio transmembrana (por ejemplo, dominio transmembrana descrito en este documento) y un dominio estimulador intracelular (por ejemplo, dominio estimulador intracelular descrito en este documento). Un constructo ROR1 CAR ejemplar comprende una secuencia líder opcional (por ejemplo, una secuencia líder descrita en este documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador intracelular (por ejemplo, un dominio coestimulador intracelular descrito en este documento) y un dominio estimulador intracelular.

El dominio de unión de ROR1 puede comprender una porción scFv, por ejemplo, una porción scFv humana. El scFv puede estar precedido por una secuencia líder opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 13, y seguido de una secuencia bisagra opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49, una región transmembrana tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:51 y una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO:43, por ejemplo, en el que los dominios son contiguos y están en el mismo marco de lectura para formar una única proteína de fusión.

La presente divulgación abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR ROR1, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión ROR1, por ejemplo, descrito en este documento, por ejemplo, que es contiguo y está en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular ilustrativo que puede utilizarse en el CAR incluye, pero sin limitación, uno o más dominios de señalización intracelular de, p. ej., CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares.

El dominio de unión de ROR1 puede caracterizarse por características o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, la porción de una composición de CAR que comprende un dominio de unión a antígeno se une específicamente a ROR1 humano o un fragmento del mismo. El scFv puede ser contiguo y estar en el mismo marco de lectura que una secuencia líder. En un aspecto, la secuencia líder es la secuencia polipeptídica proporcionada como SEQ ID NO: 13.

El dominio de unión de ROR1 puede ser un fragmento, por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv). El dominio de unión de ROR1 puede ser un Fv, un Fab, un (Fab')2 o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico) (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). Los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la divulgación pueden unirse a una proteína ROR1 o un fragmento de la misma con afinidad de tipo salvaje o mejorada. En algunos casos, un scFv humano puede obtenerse de una biblioteca de presentación.

El dominio de unión de ROR1, por ejemplo, scFv, puede comprender al menos una mutación tal que el scFv mutado confiera estabilidad mejorada a la construcción ROR1 CART. El dominio de unión de ROR1, por ejemplo, scFv,

puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones que surgen del proceso de humanización de modo que el scFv mutado confiere una estabilidad mejorada a la construcción ROR1 CART.

INHIBIDORES DE CD123

También se describe en este documento un inhibidor de CD123 que puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un anticuerpo o un fragmento del mismo (por ejemplo, un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o un fragmento del mismo); una proteína recombinante, por ejemplo, una proteína de fusión, que se une a CD123; un ácido nucleico inhibidor; o una célula que expresa un CAR CD123, por ejemplo, un CART CD123.

El inhibidor de CD123 puede ser una proteína recombinante, por ejemplo, que comprende el ligando natural (o un fragmento) del receptor CD123, por ejemplo, SL-401 (también llamado DT388IL3; Centro Médico de la Universidad de Texas Southwestern).

El inhibidor de CD123 puede ser un anticuerpo anti-CD123 o un fragmento del mismo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o un fragmento del mismo), tal como CSL360 (CSL Limited), CSL362 (CSL Limited) o MGD006 (MacroGenics).

El inhibidor de CD123 puede ser una célula que exprese CAR anti-CD123, por ejemplo, CART CD123 o una célula NK que exprese CAR CD123.

El CD123-CAR puede comprender una secuencia líder opcional (por ejemplo, una secuencia líder opcional descrita en este documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra (por ejemplo, bisagra descrita en este documento), un dominio transmembrana (por ejemplo, dominio transmembrana descrito en este documento) y un dominio estimulador intracelular (por ejemplo, dominio estimulador intracelular descrito en este documento). Un constructo CD123 CAR ejemplar comprende una secuencia líder opcional (por ejemplo, una secuencia líder descrita en este documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador intracelular (por ejemplo, un dominio coestimulador intracelular descrito en este documento) y un dominio estimulador intracelular.

El dominio de unión de CD123 puede comprender una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión de CD20 descrito en este documento, y/o una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión de CD123 descrito en este documento, por ejemplo, un dominio de unión de CD123 que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. Estos CDR pueden ser, por ejemplo, los de cualquiera de las Tablas 17, 18, 26 o 27. El dominio de unión de CD123 puede comprender una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión de CD123 descrito en este documento, por ejemplo, el dominio de unión de CD123 tiene dos regiones de cadena pesada variables, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en este documento. El dominio de unión de CD123 puede comprender una región variable de cadena ligera descrita en este documento y/o una región variable de cadena pesada descrita en este documento. El dominio de unión de CD123 puede comprender una región variable de cadena pesada descrita en este documento, por ejemplo, al menos dos regiones variables de cadena pesada descritas en este documento. El dominio de unión de CD123 puede ser un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 16 o 25. El dominio de unión de CD123 (por ejemplo, un scFv) puede comprender: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera en la Tabla 16 o 25, o una secuencia con 95-99% de identidad con una región variable de cadena ligera en la Tabla 16 o 25; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada en la Tabla 16 o 25, o una secuencia con 95-99% de identidad con una región variable de cadena pesada en la Tabla 16 o 25.

La molécula CAR puede comprender un dominio de unión anti-CD123 que incluye uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6) LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 de una construcción de la Tabla 17 y 18, por ejemplo, CAR123-1, CAR123-2, CAR123-3 o CAR123-4. La molécula CAR puede comprender un dominio de unión anti-CD123 que incluye uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6) LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 de una construcción de la Tabla 26 y 27, por ejemplo, hzCAR123.

El scFv de CD123 puede estar precedido por una secuencia líder opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 13, y seguido de una secuencia bisagra opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49, una región transmembrana tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:51 y una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO:43, por ejemplo, en el que los dominios son contiguos y están en el mismo marco de lectura para formar una única proteína de fusión.

También se describe en este documento una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de cualquiera de las Tablas 16 a 27. También se describe en este documento una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido cualquiera de las Tablas 16-27, y cada uno de los dominios de SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17 y, opcionalmente, 51.

El dominio de unión de CD123 puede caracterizarse por características o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, la porción de una composición de CAR que comprende un dominio de unión a antígeno se une específicamente a CD123 humano o un fragmento del mismo.

El dominio de unión de CD123 puede ser un fragmento, por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv). El dominio de unión de CD123 puede ser un Fv, un Fab, un (Fab')2 o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico) (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la divulgación se unen a la proteína CD123 o un fragmento de la misma con una afinidad de tipo silvestre o potenciada. En algunos casos, un scFv humano puede obtenerse de una biblioteca de presentación.

El dominio de unión de CD123, por ejemplo, scFv, puede comprender al menos una mutación tal que el scFv mutado confiera una estabilidad mejorada a la construcción CART123. El dominio de unión de CD123, por ejemplo, scFv, puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones que surgen, por ejemplo, del proceso de humanización, de modo que el scFv mutado confiere una estabilidad mejorada al constructo CART123.

El inhibidor de CD123 puede comprender una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo que tiene una secuencia de unión a CD123 como se describe en este documento. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede comprender CDR o un VH y VL como se describe en cualquiera de las Tablas 16-27, o una secuencia con homología con las mismas, por ejemplo, que tenga una identidad del 95-99% con las mismas. La molécula de anticuerpo puede comprender una región de unión a CD123 que tiene una secuencia descrita en esta sección, p. ej., en el contexto de un CAR.

INHIBIDORES DE CD10

También se describe en este documento un inhibidor de CD10 que puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un anticuerpo o un fragmento del mismo (por ejemplo, un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o un fragmento del mismo); una proteína recombinante, por ejemplo, una proteína de fusión, que se une a CD10; un ácido nucleico inhibidor; o una célula que expresa un CAR CD10, por ejemplo, un CART CD10.

El inhibidor de CD10 puede comprender una molécula pequeña, como sacubitril (Novartis), valsartán/sacubritril (Novartis), omapatrilat (Bristol-Myers Squibb), RB-101, UK-414,495 (Pfizer) o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo.

El inhibidor de CD10 puede ser una célula que exprese CAR anti-CD10, por ejemplo, CART CD10 o una célula NK que exprese CAR CD10.

INHIBIDORES DE CD34

También se describe en este documento un inhibidor de CD34 que puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un anticuerpo o un fragmento del mismo (por ejemplo, un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o un fragmento del mismo); una proteína recombinante, por ejemplo, una proteína de fusión, que se une a CD34; un ácido nucleico inhibidor; o una célula que expresa un CAR CD34, por ejemplo, un CART CD34.

El inhibidor de CD34 puede comprender un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se dirige a CD34 o un inmunoliposoma que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD34 o un fragmento del mismo.

El inhibidor de CD34 puede ser una célula que expresa CAR anti-CD34, por ejemplo, CD34 CART o una célula NK que expresa CAR CD34.

INHIBIDORES DE FLT-3

También se describe en este documento un inhibidor de FLT-3 que puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un anticuerpo o un fragmento del mismo (por ejemplo, un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o un fragmento

del mismo); una proteína recombinante, por ejemplo, una proteína de fusión, que se une a FLT-3; un ácido nucleico inhibidor; o una célula que expresa un CAR FLT-3, por ejemplo, un CART FLT-3.

El inhibidor de FLT-3 puede comprender una molécula pequeña, como quizartinib (Ambit Biosciences), midostaurina (Technische Universitat Dresden), sorafenib (Bayer y Onyx Pharmaceuticals), sunitinib (Pfizer), lestaurtinib (Cephalon) o una sal o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

El inhibidor de FLT-3 puede ser una célula que exprese CAR anti-FLT-3, por ejemplo, CART FLT-3 o una célula NK que exprese CAR FLT-3.

MOLÉCULAS DE CAR

La invención proporciona moléculas CAR o ácidos nucleicos que codifican moléculas CAR, o una célula o población de células que las comprenden, de acuerdo con las reivindicaciones. En una realización, la molécula de CAR comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En una realización, el dominio transmembrana comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 15. En una realización, el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15.

En una realización, el dominio de unión está conectado al dominio transmembrana mediante una región bisagra, p. ej., una región bisagra descrita en el presente documento. En una realización, la región de bisagra codificada comprende SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma.

En una realización, la molécula de CAR comprende, además, una secuencia que codifica un dominio coestimulante, p. ej., un dominio coestimulante descrito en el presente documento. En una realización, el dominio coestimulante comprende un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). En una realización, el dominio coestimulante comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio coestimulador comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 51. En una realización, el dominio coestimulante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 51 o una secuencia con un 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 51. En una realización, el dominio coestimulante comprende un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la molécula del MHC de clase I, proteínas receptoras de TNF, proteínas de tipo inmunoglobulina, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), que activan receptores de linfocitos NK, BTLA, receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se une específicamente con CD83. En algunas realizaciones, el dominio coestimulante comprende 4-1BB, CD27, CD28 o ICOS.

En una realización, la molécula de CAR comprende, además, una secuencia que codifica un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 y/o la secuencia de la SEQ ID NO: 43. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de CD27 y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 51 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 51 y/o la secuencia de la SEQ ID NO: 43. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:51 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 43 o una secuencia con un 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:51 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 43. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:51 y la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO:43, en el que las secuencias

que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica.

En una realización, la molécula de CAR comprende, además, una secuencia líder, p. ej., una secuencia conductora descrita en el presente documento. En una realización, la secuencia líder comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.

En un aspecto, el CAR comprende una secuencia líder opcional (p. ej., una secuencia líder opcional descrita en el presente documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra (p. ej., bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (p. ej., dominio transmembrana descrito en el presente documento) y un dominio estimulante intracelular (p. ej., dominio estimulante intracelular descrito en el presente documento). En un aspecto, una construcción de CAR ilustrativa comprende una secuencia líder opcional (p. ej., una secuencia líder descrita en el presente documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembrana, un dominio coestimulante intracelular (p. ej., un dominio coestimulante intracelular descrito en el presente documento) y un dominio estimulante intracelular.

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS

Una molécula de anticuerpo biespecífico (que puede administrarse, p. ej., sola o como parte de un CAR) puede comprender dos regiones VH y dos regiones VL. En algunas realizaciones, el anticuerpo corriente arriba o una porción del mismo (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VH (VHi) en dirección 5' de su VL (VLi) y el anticuerpo corriente abajo o una porción del mismo (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VL (VL_2) en dirección 5' de su VH (VH_2), de modo que la molécula de anticuerpo biespecífico general tiene la disposición VH_1-VL_1-VL_2-VH_2. En otras realizaciones, el anticuerpo aguas arriba o porción del mismo (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VL (VLi) en dirección 5' de su VH (VHi) y el anticuerpo aguas abajo o porción del mismo (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VH (VHz) en dirección 5' de su VL (VL_2), de modo que la molécula de anticuerpo biespecífico general tenga la disposición VL_1-VH_1-VH_2-VL_2.

INHIBIDORES BISPECÍFICOS DE CD22/CD19

En una realización, el inhibidor de linfocitos B comprende una molécula de anticuerpo biespecífico de CAR19/CAR22. En una realización, el inhibidor de células B comprende una molécula de anticuerpo específica de CD19 de la Tabla 2 o 3 (o una secuencia que tiene una identidad del 95-99% con la misma) y una molécula de anticuerpo específica de CD22 de acuerdo con las reivindicaciones. En una realización, el inhibidor de células B comprende una molécula de anticuerpo específica de CD19 que tiene una o más CDR de la Tabla 4 o 5 (o una secuencia que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 alteraciones, por ejemplo, sustituciones en la misma) y una molécula de anticuerpo específica de CD22 de acuerdo con las reivindicaciones.

INHIBIDORES DE MTOR

En una realización, las células que expresan una molécula CAR, administradas opcionalmente en combinación con un inhibidor de células B, se coadministran con una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora el sistema inmunológico. Sin querer limitarnos a la teoría, se cree que el tratamiento con una dosis baja que mejore el sistema inmunológico (por ejemplo, una dosis que es insuficiente para suprimir completamente el sistema inmunológico pero suficiente para mejorar la función inmunológica) está acompañado por una disminución de las células T PD-1 positivas o un aumento de las células PD-1 negativas. Las células T PD-1 positivas, pero no las células T PD-1 negativas, pueden agotarse mediante la interacción con células que expresan un ligando PD-1, por ejemplo, PD-L1 o PD-L2.

En una realización, este enfoque puede utilizarse para optimizar el rendimiento de las células CAR en el sujeto. Sin desear quedar ligados a la teoría, se cree que, en una realización, se mejora el rendimiento de las células efectoras inmunitarias endógenas no modificadas, p. ej., linfocitos T. Sin desear quedar ligados a la teoría, se cree que, en una realización, se mejora el rendimiento de una célula que expresa CAR. En otras realizaciones, las células, por ejemplo, las células T, que tienen o serán diseñadas para expresar un CAR, pueden tratarse ex vivo mediante el contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T, o aumenta la proporción de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T/células efectoras inmunes PD1 positivas, por ejemplo, células T.

En una realización, la administración de una dosis baja, que mejora el sistema inmunitario, de un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor alostérico, por ejemplo, RAD001, o un inhibidor catalítico, se inicia antes de la administración de una célula que expresa CAR, por ejemplo, células T. En una realización, las células CAR se administran después de un tiempo suficiente, o una dosificación suficiente, de un inhibidor de mTOR, de modo que el nivel de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T, o la proporción de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T/células efectoras inmunes PD1 positivas, por ejemplo, células T, se ha incrementado, al menos transitoriamente.

En una realización, la célula, por ejemplo, célula T, que se va a diseñar para expresar un CAR, se recolecta después de un tiempo suficiente, o después de una dosificación suficiente de la dosis baja que mejora la inmunidad, de un inhibidor de mTOR, de modo que el nivel de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T, o la proporción de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T/células efectoras inmunes PD1 positivas, por ejemplo, células T, en el sujeto o recolectadas del sujeto se ha incrementado, al menos transitoriamente.

Las características o realizaciones adicionales de las composiciones o métodos descritos en este documento incluyen una o más de las siguientes:

En algunas realizaciones, el inhibidor de células B comprende un inhibidor de uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. En algunas realizaciones, el inhibidor de células B comprende un número efectivo de una o más células que expresan una molécula CAR que se une a uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de ácido nucleico o una molécula CAR como se define en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, las una o más células que expresan una molécula CAR que se une a CD19 se administran simultáneamente con, antes o después de los uno o más inhibidores de células B.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene o se identifica que tiene una diferencia, p. ej., una diferencia estadísticamente significativa, entre un nivel determinado en comparación con un nivel de referencia de uno o más marcadores enumerados en la **tabla 29** en una muestra biológica.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene o se identifica que tiene una diferencia entre una característica determinada en comparación con una característica de referencia, en una característica de CD19, p. ej., una mutación que causa un cambio de marco o un codón de parada prematuro o ambos, en una muestra biológica.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene o se identifica que tiene una diferencia, p. ej., una diferencia estadísticamente significativa, entre un nivel determinado en comparación con un nivel de referencia de linfocitos Treg en una muestra biológica.

El método puede comprender administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia con receptor de antígeno quimérico (CAR), y si se identifica que el sujeto tiene una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, entre un nivel determinado en comparación con un nivel de referencia, o una característica determinada en comparación con una característica de referencia, en uno o más de (i) un nivel o actividad de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) una característica de CD19, por ejemplo, una mutación, por ejemplo, una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro o ambos, o (iii) un nivel de células TREG en una muestra biológica. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de ácido nucleico o una molécula CAR como se define en las reivindicaciones.

El método puede comprender determinar si el sujeto tiene una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, entre un nivel determinado en comparación con un nivel de referencia, o una característica determinada en comparación con una característica de referencia, en uno o más de (i) un nivel de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) una característica de CD19, por ejemplo, una mutación, por ejemplo, una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro o ambos, o (iii) un nivel o actividad de células T_{REG} en una muestra biológica, y administrar al sujeto una dosis terapéuticamente efectiva de una terapia con receptor de antígeno quimérico (CAR). Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de ácido nucleico o una molécula CAR como se define en las reivindicaciones.

El método puede comprender determinar si el sujeto tiene una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, entre un nivel determinado en comparación con un nivel de referencia, o una característica determinada en comparación con una característica de referencia, en uno o más de (i) un nivel de uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) una característica de CD19, por ejemplo, una mutación, por ejemplo, una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro o ambos, o (iii) un nivel o actividad de células T_{REG} en una muestra biológica, y administrar al sujeto una dosis terapéuticamente efectiva de una terapia con receptor de antígeno quimérico (CAR). Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de ácido nucleico o una molécula CAR como se define en las reivindicaciones.

El método puede comprender administrar a un sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia con receptor de antígeno quimérico (CAR), determinar si el sujeto tiene una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, entre un nivel determinado en comparación con un nivel de referencia, o una característica determinada en comparación con una característica de referencia, en uno o más de (i) un nivel de

uno o más marcadores enumerados en la Tabla 29; (ii) una característica de CD19, por ejemplo, una mutación, por ejemplo, una mutación que causa un cambio de marco o un codón de terminación prematuro o ambos, o (iii) un nivel o actividad de células T_{REG} en una muestra biológica, y si la diferencia está presente, administrar a un sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de uno o más inhibidores de células B. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de ácido nucleico o una molécula CAR como se define en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene o se identifica que tiene un aumento, p. ej., un aumento estadísticamente significativo, entre un nivel determinado y con respecto a un nivel de referencia de linfocitos Treg en una muestra biológica.

En realizaciones, el sujeto ha recaído o se identifica que ha recaído después del tratamiento con la una o más células que expresan una molécula de CAR que se une a CD19, p. ej., un CAR CD19.

Un inhibidor de células B puede comprender un número eficaz de una o más células que expresan: una molécula CAR que se une a CD10, por ejemplo, un CAR CD10 como se describe en este documento; una molécula CAR que se une a CD20, por ejemplo, un CAR CD20 como se describe en este documento; una molécula CAR que se une a CD22, por ejemplo, un CAR CD22 como se describe en este documento; una molécula CAR que se une a CD34, por ejemplo, un CAR CD34 como se describe en este documento; una molécula CAR que se une a CD123, por ejemplo, un CAR CD123 como se describe en este documento; una molécula CAR que se une a FLT-3, por ejemplo, un CAR FLT-3 como se describe en este documento; o una molécula CAR que se une a ROR1, por ejemplo, un CAR ROR1 como se describe en este documento. La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico o molécula CAR como se define en las reivindicaciones.

Un inhibidor de células B puede comprender un CAR CD22 que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD22, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulador, y en el que dicho dominio de unión a CD22 comprende una o más de la región determinante complementaria 1 de cadena ligera (LC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena ligera (LC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena ligera (LC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera de CD22 enumerada en la Tabla 8A, 8B, 10A y/o 10B, y una o más de la región determinante complementaria 1 de cadena pesada (HC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena pesada (HC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena pesada (HC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada de CD22 enumerada en la Tabla 7A, 7B, 7C, 9A y/o 9B.

Un CAR CD22 puede comprender cualquier región variable de cadena ligera enumerada en la Tabla 10A o 10B. Un CAR CD22 puede comprender cualquier región variable de cadena pesada enumerada en la Tabla 9A o 9B. Un CAR CD22 puede comprender cualquier región variable de cadena ligera enumerada en la Tabla 10A o 10B y cualquier región variable de cadena pesada enumerada en la Tabla 9A o 9B. En la invención, el CD22 CAR comprende un dominio de unión a CD22 de acuerdo con las reivindicaciones.

En realizaciones, el inhibidor de células B comprende un CAR que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulador, y en el que dicho dominio de unión a antígeno comprende uno o más de (por ejemplo, todos) la región determinante complementaria de cadena ligera 1 (LC CDR1), la región determinante complementaria de cadena ligera 2 (LC CDR2) y la región determinante complementaria de cadena ligera 3 (LC CDR3), y uno o más de (por ejemplo, todos) la región determinante complementaria de cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante complementaria de cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante complementaria de cadena pesada 3 (HC CDR3) de acuerdo con las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, el inhibidor de linfocitos B comprende un CAR que comprende un scFv. En algunas realizaciones, el inhibidor de linfocitos B comprende un CAR que comprende un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno conectado al dominio transmembrana mediante una región de bisagra. En realizaciones, la región bisagra comprende SEQ ID NO: 14, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con la misma. En algunas realizaciones, el dominio coestimulante es un dominio de señalización funcional obtenido de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). En algunas realizaciones, el dominio coestimulante es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la molécula del MHC de clase I, proteínas receptoras de TNF, proteínas de tipo inmunoglobulina, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), que activan receptores de linfocitos NK, BTLA, receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6,

CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se une específicamente con CD83. En algunas realizaciones, el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 51. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta.

En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 43. En algunas realizaciones, el CAR comprende además una secuencia líder. En algunas realizaciones, la secuencia líder comprende la SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, las células que expresan la molécula de CAR comprenden linfocitos T o linfocitos NK.

Una enfermedad asociada con la expresión de CD19 puede seleccionarse entre una enfermedad proliferativa como un cáncer o una neoplasia maligna o una condición precancerosa como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia, o es una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de CD19. La invención proporciona una célula o población de células como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento del cáncer hematológico. En algunas realizaciones, la enfermedad es una o más de las siguientes: leucemia aguda, leucemia linfoide aguda de células B (BALL), leucemia linfoide aguda de células T (TALL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), leucemia linfoide aguda (ALL); leucemia crónica, leucemia mielógena crónica (CML) o leucemia linfocítica crónica (CLL).

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un agente que aumenta la eficacia de una célula que expresa una molécula de CAR. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula de CAR. En algunas realizaciones, las células que expresan una molécula de CAR se administran en combinación con un agente que trata la enfermedad asociada con CD19.

En realizaciones, de acuerdo con un tratamiento como se recita en las reivindicaciones, un mamífero es un no respondedor, un respondedor parcial o un respondedor completo a una terapia contra el cáncer administrada previamente, por ejemplo, una terapia con CAR CD19 o una terapia contra el cáncer distinta a una célula que expresa CAR CD19. En algunas realizaciones, el mamífero no ha sufrido una recaída, ha sufrido una recaída parcial o ha sufrido una recaída completa de una terapia contra el cáncer administrada previamente, por ejemplo, una terapia con CAR CD19 o una terapia contra el cáncer distinta a una célula que expresa CAR CD19. En algunas realizaciones, el mamífero comprende una célula cancerosa negativa para CD19 o una célula cancerosa positiva para CD19, opcionalmente en donde el mamífero comprende además una célula cancerosa positiva para CD22, positiva para CD123, positiva para FLT-3, positiva para ROR-1, positiva para CD79b, positiva para CD179b, positiva para CD79a, positiva para CD10, positiva para CD34 y/o positiva para CD20. En algunas realizaciones, el mamífero tiene un cáncer de LLA recidivante. En algunas realizaciones, al mamífero se le administró previamente una célula que expresa CAR CD19 y es refractario al tratamiento con CAR CD19.

En algunas realizaciones, el agente es un inhibidor de mTOR y al sujeto se le administra una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR, p. ej., RAD001 o rapamicina. En algunas realizaciones, el inhibidor de mTOR es RAD001. En algunas realizaciones, la dosis comprende un inhibidor de mTOR alostérico y catalítico. En algunas realizaciones, el inhibidor de mTOR se administra durante un período de tiempo suficiente para disminuir la proporción de células T PD-1 positivas, aumentar la proporción de células T PD-1 negativas o aumentar la relación de células T PD-1 negativas/células T PD-1 positivas, en la sangre periférica del sujeto o en una preparación de células T aisladas del sujeto.

En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria, por ejemplo, célula T, que se va a diseñar para expresar un CAR, se recolecta después de un tiempo suficiente, o después de una dosificación suficiente de la dosis baja que mejora la inmunidad de un inhibidor de mTOR, de modo que el nivel de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T, o la proporción de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, por ejemplo, células T/células efectoras inmunitarias PD1 positivas, por ejemplo, células T, en el sujeto o recolectadas del sujeto se ha incrementado, al menos transitoriamente. En algunas realizaciones, la dosis de un inhibidor de mTOR está asociada con una inhibición de mTOR de al menos el 5 pero no más del 90%, por ejemplo, medida por la inhibición de p70 S6 K. En algunas realizaciones, la dosis de un inhibidor de mTOR está asociada con una inhibición de mTOR de al menos el 10%, pero no más del 40%, por ejemplo, medida por la inhibición de p70 S6 K.

En una realización, el tratamiento comprende además la administración de un inhibidor de puntos de control. En algunas realizaciones, el sujeto recibe un pretratamiento con un agente, p. ej., un inhibidor de mTOR y/o un inhibidor de puntos de control, antes del inicio de una terapia con CART. En algunas realizaciones, el sujeto recibe un pretratamiento simultáneo con un agente, p. ej., un inhibidor de mTOR y/o un inhibidor de puntos de control. En

algunas realizaciones, el sujeto recibe tratamiento con un agente, p. ej., un inhibidor de mTOR y/o un inhibidor de puntos de control, después de la terapia con CART.

En algunas realizaciones, el nivel determinado o la característica determinada se adquiere antes, al mismo tiempo o durante un transcurso de terapia con CART.

En algunas realizaciones, el método comprende analizar una firma genética que indica si es probable que el sujeto recaiga o si ha recaído. En algunas realizaciones, el método comprende analizar una firma genética en un sujeto antes del tratamiento con una célula que expresa CAR, por ejemplo, un tratamiento CART que predice una recaída al tratamiento con CAR. En algunas realizaciones, el nivel de uno o más marcadores es el nivel de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 marcadores enumerados en la Tabla 29. En algunas realizaciones, el nivel del marcador comprende un nivel de ARNm o un nivel de una proteína soluble.

En algunas realizaciones, la característica de CD19 es una mutación en el exón 2, por ejemplo, una mutación que causa un cambio de marco o un codón de parada prematuro o ambos. En algunas realizaciones, el nivel de células T_{REG} se determina tiñendo una muestra para detectar un marcador expresado por células T_{REG}. En algunas realizaciones, el nivel de células T_{REG} es el nivel de células Treg en una ubicación relevante en el cuerpo del sujeto, por ejemplo, en un microambiente de cáncer.

En algunas realizaciones, el método comprende además disminuir la firma T_{REG} en el sujeto antes de la aféresis. En algunas realizaciones, el método comprende además disminuir la firma T_{REG} en el sujeto, por ejemplo, administrando ciclofosfamida, un anticuerpo anti-GITR o ambos al sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende pretratar a un sujeto con ciclofosfamida, un anticuerpo anti-GITR o ambos, antes de la recolección de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR. En realizaciones, el método comprende además obtener una muestra del sujeto, en el que la muestra comprende una fracción celular (por ejemplo, que comprende sangre), una fracción de tejido, una muestra de aféresis o una muestra de médula ósea.

En algunas realizaciones, la célula expresa una molécula inhibidora que comprende un primer polipéptido que comprende al menos una porción de una molécula inhibidora, asociada con un segundo polipéptido que comprende una señal positiva de un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, la molécula inhibidora comprende un primer polipéptido que comprende al menos una porción de PD1 y un segundo polipéptido que comprende un dominio coestimulante y un dominio de señalización primario.

En algunas realizaciones, el método comprende analizar una firma genética que indica si es probable que un sujeto tratado con la célula recaiga o si ya ha recaído. En algunas realizaciones, el método comprende analizar la firma genética en la célula antes de la infusión en el sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende además disminuir la firma T_{REG} de una población de células que comprende la célula transducida. En algunas realizaciones, la disminución de la firma T_{REG} comprende realizar una depleción de CD25 en la población de células.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, p. ej., un ser humano.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. A menos que se especifique lo contrario, los números de referencia de secuencia especificados en el presente documento, incluido en cualquier tabla en el presente documento, se refieren a las entradas de la base de datos vigentes al 8 de abril de 2015. Cuando un gen o proteína hace referencia a una pluralidad de números de referencia de secuencia, se abarcan todas las variantes de secuencia.

Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Los encabezamientos, subencabezamientos o elementos con números o letras, p. ej., (a), (b), (i), etc., se presentan únicamente para facilitar la lectura. El uso de encabezamientos o elementos con números o letras en este documento no requiere que las etapas o elementos se realicen en orden alfabético ni que las etapas o elementos sean necesariamente diferentes entre sí.

Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos. La invención se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIG. 1A y 1B son esquemas de CAR representativos.

La FIG. 2 contiene imágenes del análisis inmunohistoquímico de un linfoma de Hodgkin que muestra células que expresan CD19 presentes en el tumor. El panel izquierdo tiene un aumento de 1X y el panel derecho tiene un aumento de 20X.

La FIG. 3 es un diagrama esquemático de la configuración experimental para un estudio para evaluar la eficacia terapéutica del tratamiento con CART19 en pacientes con linfoma de Hodgkin.

Las FIGS. 4A, 4B, 4C y 4D muestran análisis de citometría de flujo de la expresión de PD1 y CAR19 en linfocitos T. Las FIGS. 4A y 4B son perfiles de citometría de flujo representativos que demuestran la distribución de la expresión de PD-1 y CAR19 en linfocitos T CD4+ de sujetos que tienen respuesta completa (CR, por sus siglas en inglés) o no responden (NR) a la terapia con CART. La FIG. 4C es un gráfico que muestra el porcentaje de células PD1 en la población de linfocitos T CD4+ de grupos de sujetos con diferentes respuestas a la terapia con CART. La FIG. 4D es un gráfico que muestra el porcentaje de células PD1 en la población de linfocitos T CD8+ de grupos de sujetos con diferentes respuestas a la terapia con CART.

Las FIGS. 5A y 5B muestran la distribución de la expresión de PD1 en células que expresan CD4 y CAR19 (FIG. 5A) o células que expresan CD8 y CAR19 (FIG. 5B) de grupos de sujetos con diferentes respuestas a la terapia con CART.

La FIG. 6 muestra el análisis de citometría de flujo de la expresión de PD1, CAR 19, LAG3 y TIM3 en linfocitos T de sujetos que tienen respuesta completa (CR) o no responden (NR) a la terapia con CART.

Las FIGS. 7A y 7B muestran la distribución de la expresión de PD1 y LAG3 (FIG. 7A) o la expresión de PD1 y TIM3 (FIG. 7B) de grupos de sujetos con diferentes respuestas a la terapia con CART.

La FIG. 8 muestra el inmunofenotipado de IgA de células plasmáticas de un paciente con mieloma que recibió CART19, lo que demuestra la respuesta a la terapia con CART19.

Las FIGS. 9A y 9B muestran la expresión del receptor de IL-7 (CD127) en líneas de células cancerosas y linfocitos CART. La expresión de CD127 se midió mediante análisis de citometría de flujo en tres líneas celulares de cáncer: RL (linfoma de células del manto), JEKO (también conocido como Jeko-1, linfoma de células del manto) y Nalm-6 (LLA-B) (fig. 9A). La expresión de CD127 se midió mediante análisis de citometría de flujo en células positivas para CD3 (CART) que se habían infundido y circulaban en ratones NSG (fig. 9B).

Las FIGS. 10A, 10B y 10C muestran la respuesta antitumoral después del tratamiento con CART19 y el tratamiento posterior con IL-7. Los ratones NSG en los que se había injertado una línea celular de linfoma del manto que expresa luciferasa (RL-luc) el día 0 se trataron con dosis variables de células CART19 el día 6 y se supervisó la carga tumoral. Los ratones se dividieron en 4 grupos y recibieron células no CART19, $0{,}5\times10^6$ células CART19 (CART19 0,5E6), 1×10^6 células CART19 (CART19 1E6) o 2×10^6 células CART19 (CART19 2E6). La carga tumoral después del tratamiento con CART se midió mediante detección de bioluminiscencia (BLI media) (fig. 10A). Los ratones que recibieron $0{,}5\times10^6$ células CART19 (CART19 0.5E6) o 1×10^6 células CART19 (CART19 1E6) fueron aleatorizados para recibir IL-7 humana recombinante (rhIL-7) o no. La carga tumoral, representada aquí por la bioluminiscencia media (BLI), se supervisó para los tres ratones (n.º 3827, n.º 3829 y n.º 3815, que recibieron la dosis inicial indicada de CART19) de la FIG. 10A que se trataron con IL-7 a partir del día 85 (FIG. 10B). La IL-7 se administró mediante inyección IP 3 veces por semana. La carga tumoral, representada aquí por la bioluminiscencia media (BLI) antes del día 85 (PRE) y después del día 115 (POST), se comparó entre ratones que no recibieron IL-7 (CTRL) y ratones que recibieron tratamiento con IL-7 (IL-7) (fig. 10C).

Las FIGS. 11A y 11B muestran la dinámica de los linfocitos T después del tratamiento con IL-7. Se supervisó el nivel de células T humanas detectados en la sangre para cada uno de los ratones que recibieron IL-7 o ratones de control (fig. 11A). El nivel de células CART19 (células CD3+) detectados en la sangre se midió antes (PRE) y 14 días después (día 14) del inicio del tratamiento con IL-7 (fig. 11B).

La FIG. 12 representa las estructuras de dos configuraciones de RCAR ilustrativas. Los miembros de unión a antígeno comprenden un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de conmutación. Los miembros de unión intracelular comprenden un dominio de conmutación, un dominio de señalización coestimulador y un dominio de señalización primario. Las dos configuraciones demuestran que el primer y el segundo dominio de conmutación descritos en este documento pueden estar en diferentes orientaciones con respecto al miembro de unión de antígeno y al miembro de unión intracelular. Otras configuraciones de RCAR se describen con más detalle en el presente documento.

La FIG. 13 representa dos construcciones para CAR biespecíficas con dominios de unión anti-C22 y anti-CD19. "4G4S" representa la secuencia conectora GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 1311).

La FIG. 14 es un gráfico que representa la actividad de construcciones biespecíficas de CAR CD19/CD22 en un ensayo de NFAT.

Las FIGS. 15A, 15B y 15C son gráficos que muestran el grado de activación de linfocitos T con CAR (medido por luminiscencia relativa) en presencia de diversas líneas de células tumorales diana. La FIG. 15A muestra la activación de linfocitos T con CAR en presencia de la línea celular diana que expresa CD20, Daudi. La FIG. 15B muestra la activación de linfocitos T con CAR en presencia de la línea celular diana que expresa CD20, Raji. La FIG. 15C muestra la activación de linfocitos T con CAR en presencia de un control negativo que no expresa CD20, K562.

La FIG. 16 es un esquema ilustrativo que ilustra una visión general del análisis de la identificación del gen. En resumen, para cada conjunto de genes, se aplicó un modelo estadístico de 2 grupos para determinar si el metagén era estadísticamente diferente entre los CR, PR y NR. Los CR son más como linfocitos T_{EF} en reposo, mientras que los NR son más como linfocitos T_{EF} activados. Los genes regulados positivamente en linfocitos T_{EF} en reposo también están regulados positivamente en los NR.

La FIG. 17 muestra resultados ilustrativos (p = 0,000215) que ilustran que los genes de T_{REG} tienen altos niveles de expresión en muestras de pacientes pediátricos que tuvieron respuesta completa y que se convirtieron en recidivantes (R) en comparación con los que tuvieron respuesta completa (CR) que no recayeron. El eje x son muestras por grupo de respuesta donde CR = respuesta completa sin recaída y R = recidivante. El eje y son puntuaciones de expresión metagénica normalizadas.

Las FIGS. 18A, 18B y 18C son gráficos que muestran la activación de linfocitos CAR T en presencia de líneas de células tumorales diana. En la FIG. 18A, se mezclaron células JNL que expresan CAR con la línea celular diana que expresa CD22 Daudi en las relaciones E:T (efectoras frente a diana, por sus iniciales en inglés) indicadas. En la FIG. 18B, se mezclaron células JNL que expresan CAR con la línea celular diana que expresa CD22 Raji en las relaciones E:T indicadas. En la FIG. 18C, se mezclaron células JNL que expresan CAR con la línea celular K562 de control negativo en las relaciones E:T indicadas.

La FIG. 19 es un gráfico que muestra la expresión de linfocitos T primarios del receptor quimérico para antígeno en la superficie celular. Se usaron proteína-L-biotina/SA-PE (fig. 19-1 y fig. 19-2) y rhCD22-Fc/anti-Fc488 (fig. 19-3 y 19-4) para determinar los niveles de expresión en superficie de CAR. Las células sin CAR se usaron como control negativo.

Las FIGS. 20A, 20B, 20C, 20D, 20E, y 20F son gráficos que muestran un ensayo de destrucción de diana tumoral de linfocito T primario. Los linfocitos T primarios activados y transducidos con CAR CD22 se mezclaron con líneas celulares diana que expresaban luciferasa de forma estable en las relaciones indicadas y se midió la destrucción de células diana. El porcentaje de destrucción se normalizó con respecto a hCD22-8 (28,8 % de transducción). Se utilizaron líneas celulares que expresaban CD22 Raji (FIG. 20A), SEM (FIG. 20B), K562-hCD22 (FIG. 20C), Daudi (FIG. 20D) y Nalm6 (FIG. 20E) para probar la función de clones de CAR CD22 en comparación con el CAR CD22 de control positivo m971 (m971-HL), el CAR de control negativo m971-LH y linfocitos T no transducidos como control negativo. La línea celular K562 no expresa CD22 y se usó como control negativo (FIG. 20F).

Las FIGS. 21A, 21B, 21C, 21D, 21E y 21F son gráficos que muestran la inducción de una respuesta significativa de citocinas proinflamatorias por clones de CAR CD22. Se usaron ensayos de destrucción de linfocitos T primarios para determinar la capacidad del clon de CAR CD22 para producir las citocinas proinflamatorias IFN-g, IL-2 y TNFa. Las células efectoras se cocultivaron durante 20 horas con cada una de las diferentes líneas celulares diana, normalizadas con respecto al 28,8 % de transducción. Se tomaron sobrenadantes de diferentes cultivos con relaciones E:T variables de 2,5:1 y 10:1 de células diana que expresan CD22 Raji (FIG. 21A), células diana que expresan CD22 Nalm6 (FIG. 21B), células diana que expresan CD22 Daudi (FIG. 21C), células diana que expresan CD22 SEM (FIG. 21D), células diana que expresan CD22 K562-hCD22 (FIG. 21E) y células que no expresan CD22 K562 (control negativo) (FIG. 21F).

La FIG. 22 es un gráfico que representa la expresión de diversos antígenos de linfocitos B en la LLA recidivante es un gráfico que representa la expresión de diversos antígenos de linfocitos B en la LLA recidivante detectada por citometría de flujo. Las muestras de 16 pacientes r/r se exploraron mediante citometría de flujo multiparamétrica para los siguientes marcadores: CD19 (16 ptos), CD22 (16 ptos), CD123 (16 ptos), FLT-3 (9 ptos), ROR-1 (3 ptos), CD79b (15 ptos), CD179b (8 ptos), CD79a (16 ptos), CD10 (16 puntos), CD34 (16 puntos) y CD20 (16 puntos). CD22 y CD123 tuvieron expresión alta (>60 %) y homogénea en los blastos de pacientes con LLA r/r (la barra indica la mediana del % de expresión, respectivamente 99,50 %, 98,80 %, 95,70 %, 72,00 %, 47,00 %, 15,00 %, 13,45 %, 4,200 %, 98,00 %, 87,65 % y 7,00 %). Para cada paciente, el porcentaje de células que expresan el marcador indicado se muestra como un único punto de datos.

La FIG. 23 es un conjunto de gráficos que muestran la expresión de CD22 y CD123 en 6 pacientes con recaída de leucemia negativa para CD19, tanto antes del tratamiento con CART19 (valor inicial) como después (recaída negativa para CD19). En todos los análisis, la población de interés se seleccionó en función de las características de dispersión directa frente a lateral seguidas de la compuerta singulete, y las células vivas se seleccionaron utilizando Live Dead Aqua (Invitrogen). Se incluyó el control de tiempo para el control de calidad. La estrategia de activación incluía: control temporal → SSC bajo → singuletes → vivo → CD45dim → CD10+.

La FIG. 24 es un conjunto de gráficos que muestran la expresión de CD22 en blastos de pacientes con recaída de enfermedad CD19-neg después del tratamiento con CART19 (ensayos clínicos UPCC04409/CHP959, UPN del paciente indicado en el recuadro cuadriculado). La fila superior muestra la expresión de CD19 y CD22 en blastos antes del tratamiento con CART19, mientras que la fila inferior muestra el fenotipo de la enfermedad en la recaída. La expresión de CD22 también se mantuvo en la recaída cuando se perdió la expresión de CD19.

La FIG. 25 es un conjunto de gráficos que muestran la expresión de CD123 en un conjunto de gráficos que muestran la expresión de CD123 en blastos de pacientes con recaída de enfermedad CD19-neg después del tratamiento con CART19 (ensayos clínicos UPCC04409/CHP959, UPN del paciente indicado en el recuadro cuadriculado). La fila superior muestra la expresión de CD19 y CD123 en blastos antes del tratamiento con CART19, mientras que la fila inferior muestra el fenotipo de la enfermedad en la recaída. La expresión de CD123 se mantuvo en la recaída en la mayoría de los pacientes, mientras que la expresión de CD 19 se perdió.

La FIG. 26 es un gráfico que muestra la mediana de la expresión de CD19, CD22 y CD123 antes y después del tratamiento con CART19 en pacientes con recaída de una enfermedad negativa para CD19. La expresión de CD19 se perdió en la recaída (94,25 % frente a 0 %, p=0,0009), mientras que CD22 (99,20 % frente a 97,30 %, p=ns) y CD123 (63,00 % frente a 48,75 %, p=ns) aún se expresaban. Para cada paciente, el porcentaje de células que expresan el marcador indicado se muestra como un único punto de datos.

Las FIGS. 27A y 27B son una serie de gráficos que muestran la expresión de CD22 en muestras de 16 pacientes r/r y 4 pacientes con recaída de enfermedad negativa para CD19 después del tratamiento con terapia con CART19. Las muestras se exploraron mediante citometría de flujo multiparamétrica para el marcador de linfocitos B, CD22. CD22 tuvo expresión alta (>60 %) y homogénea en los blastos de 11/15 pacientes con LLA r/r (FIG. 27A). CD22 fue positivo en 4/4 pacientes que tuvieron recaída de leucemia negativa para CD19, tanto antes del tratamiento con CART19 (valor inicial) como después (recaída CD19-neg) (se muestran 2 puntos) (FIG. 27B). Estrategia de selección: SSC bajo→ singletes→ en vivo → Cd45dim

Las FIGS. 28A, 28B y 28C son una serie de gráficos que muestran el efecto de CART CD22 sobre la expresión de CD19 y CD22. Se muestra el esquema de las dos construcciones de CAR22 que se generaron usando diferentes orientaciones de cadena (H a L y L a H) (FIG. 28A). Se optimizaron los codones del scFv anti-CD22 (m971) y este se clonó en el vector murino CAR19 que contenía dominios bisagra CD8, coestimulante 41-BB y de señalización CD3 zeta (FIG. 28A). La expresión de CD19, CD22 y control de isotipo en la línea celular de LLA NALM6 se muestra como intensidad de fluorescencia media (IFM) (FIG. 28B) y capacidad de unión a anticuerpos (ABC) (FIG. 28C). En NALM-6, la expresión de CD19 fue superior a la de CD22. Sin embargo, en la mayoría de las muestras de LLA primaria, las expresiones de CD19 y CD22 fueron similares (véase Fig. 27A).

Las FIGS. 29A, 29B y 29C son una serie de gráficos que muestran expansiones de linfocitos T de donantes normales para generar CART22 y CART19 (junto con células UTD). Las duplicaciones de población (DP) frente a días de cultivo: al final de la expansión (día 11) los linfocitos T CART22 y de control alcanzaron alrededor de 4,5 DP, sin diferencia significativa en comparación con los linfocitos CART19 o UTD (FIG. 29A). Volumen de linfocitos T (fl) frente a días en cultivo: el día 6 hubo un volumen máximo (alrededor de 450 fl) mientras que en los días siguientes el volumen disminuyó a 300 fl cuando las células se recogieron y congelaron. No se observaron diferencias significativas frente a linfocitos CART19 o UTD (FIG. 29B). La expresión de CAR en linfocitos T positivas para CD4 y positivas para CD8 el día 11 de la expansión se muestra en la FIG. 29C. La selección de la expresión de CAR se basa en UTD. Estrategia de selección: Linfocitos FSS vs SSC→ singletes → en vivo → CD3+.

La FIG. 30 es una serie de gráficos que muestran un ensayo de desgranulación de CD107a con producción de citocinas intracitoplasmáticas. Se cocultivaron CART19, CART22 HtoL y LtoH con diferentes dianas (solo, PMA/IONOMICINA, MOLM-14 y NALM-6). CART19 y CART22 HtoL muestran altos niveles de desgranulación de CD107a, producción de IL-2, IFNg y TNFa cuando se cultivan conjuntamente con la línea celular LLA (NALM-6), pero no cuando se cultivan conjuntamente con controles

negativos. UTD y CART22 LtoH no mostraron desgranulación ni producción de citocinas. Estrategia de selección: Linfocitos FSS vs SSC→ singletes → en vivo → CD3+.

La FIG. 31 es un gráfico que muestra un ensayo de destrucción basado en luciferasa. CART22 y CART19 HtoL, pero no las células UTD, pudieron lisar las células NALM-6 cuando se cocultivaron durante 24 horas. Se observó una correlación directa entre la actividad citotóxica y las relaciones E:T, con un mejor efecto antileucémico en una relación E:T 2:1 (78 % y 75 % de destrucción para CART19 y CART22).

La FIGS. 32A y 32B son una serie de gráficos que muestran un ensayo de proliferación basado en CFSE. El cultivo conjunto durante 5 días de CART22 y CART19 con la línea celular NALM-6 de LLA condujo a una proliferación significativa de linfocitos T (94 % y 92,9 %, respectivamente). También se muestran los controles (TCM= medio solo, P-I= PMA/ionomicina, MOLM-14) (FIG. 32A). En los histogramas que muestran la dinámica de la dilución de CFSE en CART19 y CART22, la mayoría de los linfocitos T experimentaron múltiples ciclos proliferativos (FIG. 32B). Estrategia de selección: Linfocitos FSS vs SSC→ singletes → en vivo → CD3+.

La FIG. 33 es una serie de gráficos que muestran la producción de citocinas. CART22, CART19 y UTD se incubaron durante 24 horas con diferentes dianas irradiadas (solo, PMA/ionomicina, MOLM-14 y NALM-6). Cuando se cocultivaron con la línea celular NALM-6 de LLA, solo CART22 y CART19 HtoL pudieron liberar múltiples citocinas (aquí se muestran IFNg, IL-2, GM-CSF, TNFa y MIP1b). Los resultados se muestran como intensidad de fluorescencia media (IFM).

Las FIGS. 34A y 34B son una serie de gráficos que muestran la desgranulación de linfocitos T con blastos de LLA primarios. Los linfocitos CART22, CART19 y UTD se incubaron conjuntamente durante 4 horas con blastos procedentes de un paciente con LLA (CHP-959-101) al inicio y después del tratamiento con CART19 cuando el paciente tuvo recaída de una enfermedad CD19-neg. Tanto CART19 como CART22 fueron capaces de desgranular al inicio (cuando los blastos son CD19+ y CD22+) pero en la recaída solo CART22 estaba desgranulando (cuando la enfermedad es CD19-neg) (FIG. 34A). Los diagramas de puntos que muestran la desgranulación de CD107a en el efector CART19 y CART22 CD8-pos y CD8-neg después de la incubación con la muestra CHP101 en la recaída demuestran que solo CART22 mostró desgranulación en linfocitos T tanto CD8 como CD4 (FIG. 34B). Estrategia de selección: Linfocitos FSS vs SSC→ singletes → vivos --) CD3+.

Las FIGS. 35A, 35B, 35C y 35D son una serie de gráficos que muestran la eficacia de CART22 *in vivo* contra NALM-6. A. Esquema del experimento: Se inyectaron 1 millón de células luciferasa+ NALM-6/ratón i.v. en ratones NSG. Después de 6 días, se evaluó el injerto del tumor mediante bioluminiscencia. A continuación, los ratones se aleatorizaron para recibir linfocitos T no transducidos o diferentes dosis de CART22 (de 1,25 a 5 millones de células totales/ratón, con un 75 % de expresión de CAR). A continuación, se supervisó la carga tumoral, la expansión de linfocitos T SP y la supervivencia de los ratones (FIG. 35A). La carga tumoral por bioluminiscencia (BLI) detectó una respuesta antileucémica relacionada con la dosis. Los ratones que recibieron $5e^6$ linfocitos CART22 mostraron un mejor control del tumor (FIG. 35B). Los ratones tratados con CART22 mostraron una mejor supervivencia general (SG) estadísticamente significativa en comparación con los ratones tratados con linfocitos UTD. Para la SG hubo una correlación significativa entre la dosis más alta de CART22 y una mejor SG (FIG. 35C). La expansión de linfocitos T *in vivo* se supervisó semanalmente mediante extracción de sangre retrorbitaria. Una semana después de la infusión de linfocitos T, los ratones que recibieron la dosis más alta de CART22 mostraron una mejor expansión de CART (mediana de 12 linfocitos T/µl) (FIG. 35D).

Las FIGS. 36A y 36B son una serie de gráficos que muestran una comparación *in vivo* entre CART22 y CART19 contra NALM-6. Esquema del experimento: Se inyectaron 1 millón de células luciferasa+ NALM-6/ratón i.v. en ratones NSG. Después de 6 días, se evaluó el injerto del tumor mediante bioluminiscencia. A continuación, los ratones se aleatorizaron para recibir linfocitos T no transducidos, CART19 o CART22 (5 millones de células en total, con un 75 % de expresión de CAR). A continuación, se supervisó la carga tumoral, la expansión de linfocitos T SP y la supervivencia de los ratones (FIG. 36A). La carga tumoral por bioluminiscencia (BLI) demostró una respuesta antileucemia en ratones tratados con CART22 y CART19, mientras que los ratones UTD progresaron rápidamente (FIG. 36B). Los ratones tratados con CART19 mostraron una mejor supervivencia general (SG) en comparación con CART22, posiblemente debido a la diferente expresión de la diana en NALM-6 (CD19»CD22) (FIG. 36C).

Las FIGS. 37A y 37B son una serie de gráficos que muestran una comparación *in vivo* entre CART22 y CART19 en un modelo de LLA primaria. Los blastos de un paciente con LLA primaria (JH331) se pasaron *in vivo* y se transdujeron con luciferasa para seguir la carga tumoral. Esquema del experimento: Se inyectaron 1 millón de células luciferasa+ JH331/ratón i.v. en ratones NSG. Después de 14 días, se evaluó el injerto del tumor mediante bioluminiscencia. A continuación, los ratones se aleatorizaron para recibir linfocitos T no transducidos, CART19 o CART22 (5 millones de células en total, con un 75 % de expresión de CAR). A continuación, se supervisó la carga tumoral, la expansión de linfocitos T SP y la supervivencia

de los ratones (FIG. 37A). La carga tumoral por bioluminiscencia (BLI) detectó una respuesta antileucemia en ratones tratados con CART22 y CART19, mientras que los ratones UTD progresaron rápidamente (FIG. 37B).

Las figuras 38A, 38B y 38C son una serie de imágenes que muestran micromatrices de tejido para la expresión de CD22 en 28 tejidos humanos normales mediante tinción inmunohistoquímica. Los órganos linfoides resultaron positivos para la expresión de CD22 (amígdala, ganglio linfático, bazo y timo) (FIG. 38A). Los órganos no linfoides no mostraron expresión de CD22 (FIG. 38B). Se observaron linfocitos B residentes positivos para CD22 en múltiples tejidos (FIG. 38C). *= tinción inespecífica.

La FIG. 39 es un gráfico que muestra datos de expresión de ARN de CD22 de GeneAtlas U133A. La expresión de CD22 se observó a un alto nivel en los linfocitos B, las amígdalas y los ganglios linfáticos. Las líneas celulares de linfoblastos B y leucemia/linfoma también fueron muy positivas.

La FIG. 40 es una serie de gráficos que muestran un ensayo de liberación de 51-cromo para la toxicidad de CART22. Tanto las células CART22 como CART 19 pero no UTD desencadenaron la lisis de la línea celular de ALL NALM-6. No se observó ningún efecto citotóxico de CART22 en ningún tejido normal (CD34+, progenitores neuronales humanos o neuronas y queratinocitos) o control (línea celular K562).

La FIG. 41 muestra una representación gráfica de la expresión de CAR en células JNL transducidas con construcciones de CAR anti-CD 123 según se evaluó por FACS y se informó como el porcentaje de células que muestran una señal por encima del nivel de señal en células no transducidas (CAR negativas) utilizando proteína L como reactivo de detección.

Las FIGS. 42A, 42B y 42C muestran representaciones gráficas de actividad de CAR CD123 en células JNL. Se evaluaron construcciones de CAR anti-CD123 para determinar la actividad utilizando una línea de células Jurkat que contenía el indicador de luciferasa impulsado por el promotor de NFAT (denominadas células JNL). La actividad de CAR se mide como la activación de este indicador impulsado por NFAT.

Las FIGS. 43A y 43B muestran la expresión y actividad de CD 123. La figura 43A muestra una representación gráfica de la expresión de CAR CD123 en linfocitos T primarios. El porcentaje de células transducidas (que expresan el CAR anti-CD123 en la superficie celular) y su intensidad de fluorescencia relativa de expresión se determinaron mediante análisis por citometría de flujo en un BD LSRFortessa o BD-FACSCanto utilizando Proteína L como reactivo de detección. La selección de las gráficas de tipo histograma de intensidad de fluorescencia relativa del FACS para la señal por encima de la de las células no teñidas muestra el porcentaje de linfocitos T transducidos. La transducción dio como resultado un intervalo de células positivas para CAR de un 12-42 %. La figura 43B muestra una representación gráfica de la destrucción celular mediada por CD123-CART. La destrucción por linfocitos T se dirigió a células de leucemia mielógena aguda MOLM13 que expresaban CD123 que expresaban de manera estable la luciferasa. Los linfocitos T no transducidos se utilizaron para determinar los niveles de destrucción inespecífica de fondo. Se midieron las actividades citolíticas de CART-CD123 en un intervalo de relaciones de células efectoras:diana de 4:1 y diluciones decrecientes con un factor de 2 de linfocitos T donde se definieron los efectores como linfocitos T que expresaban el receptor quimérico anti-CD123. Los ensayos se iniciaron mezclando un número apropiado de linfocitos T con un número constante de células diana. Se midió la señal de la luciferasa después de 20 horas utilizando el ensayo de luciferasa Bright-Glo™ en el instrumento EnVision.

Las FIGS. 44A y 44B muestran la eficiencia de transducción de linfocitos T con CAR-CD123. La figura 44A muestra la eficiencia de transducción de linfocitos T con 1172 y 1176. La figura 44B muestra la eficiencia de transducción de linfocitos T con los CAR CD123 2-4.

La FIG. 45 muestra la citometría de flujo de los CAR CD123 2-4 y 1172 y 1176 para determinar la relación CD4:CD8.

La FIG. 46 muestra la desgranulación de los CAR CD123 2-4 y 1172 y 1176 tras la exposición a células tumorales CD123+.

La FIG. 47 muestra una representación gráfica de un ensayo de luciferasa para evaluar la citotoxicidad de linfocitos CART (clones NVS 2-4, 1172 y 1176) frente a células tumorales diana (MOLM14).

La FIG. 48 muestra una comparación de la carga tumoral en ratones NSG en los que se han inyectado células MOLM14 que expresan luciferasa en D6 (antes de la inyección de CART) y el día 13 (6 días después de la inyección con clones NVS 2-4, 1172 o 1176) o el día 20.

Las FIGS. 49A, 49B, 49C, 49D, 49E y 49F muestran que CD123 se expresa en gran medida en recaídas de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B negativos para CD19 que se producen después del tratamiento con CART19. La FIG. 49A muestra la expresión de CD123 en comparación con CD19 en 42 muestras de LLA recidivantes/refractarias. La FIG. 49B muestra la coexpresión de CD123 y CD19 en blastos de LLA-B. Selección de blastos (SSC bajo, singulete, vivo, CD45dim). La FIG. 49C muestra la estrategia de selección para las células madre de leucemia (LSC, por sus siglas en inglés). CD123 presenta una expresión elevada en este subconjunto. La FIG. 49D muestra la coexpresión de CD123 y CD19 y los resultados del análisis FISH. Las FIGS. 49E y 49F muestran la comparación de expresión de CD19 y CD123 en las condiciones iniciales o después de la recaída.

Las FIGS. 50A, 50B, 50C, 50D, 50E y 50F muestran los resultados de diversos ensayos *in vitro* utilizando linfocitos T que expresan un CAR CD19 (CAR19) o un CAR CD123 (CAR123). La FIG. 50A muestra la expresión de CD19 y CD123; la FIG. 50B muestra un ensayo de desgranulación de CD107a; la FIG. 50C muestra la capacidad destrucción dirigida de células; las FIGS. 50D y 50E muestran capacidad de proliferación; la FIG. 50F muestra la producción de citocinas para las citocinas indicadas.

Las FIG. 51A, 51B y 51C muestran que los linfocitos CART que expresan CAR CD19 (CAR19) o CAR CD123 (CAR123) tenían un efecto antitumoral en un modelo de ratón *in vivo*. La FIG. 51A muestra la carga tumoral representada por imágenes bioluminiscentes; la FIG. 51B muestra la curva de supervivencia global de ratones que reciben terapia con CART; y la FIG. 51C muestra la expansión de linfocitos CART123 en la sangre periférica.

Las FIGS. 52A, 52B, 52C, 52D, 52E y 52F muestran que CART123 es activo en un modelo en ratones *in vivo* de recaída por pérdida de antígeno. La FIG. 52A muestra el esquema experimental; la FIG. 52B muestra la evolución de la enfermedad según se representa mediante imágenes bioluminiscentes en las condiciones iniciales y con recaída de la enfermedad con respecto a la expresión de CD19 (gráfico superior) y en respuesta al tratamiento con terapia con CART19 (gráfico inferior); la FIG. 52C muestra imágenes bioluminiscentes de ratones a los que se les administraron linfocitos T no transducidos o linfocitos CART19; la FIG. 52D muestra el esquema experimental para tratar con CART19 o CART123; la FIG. 52E muestra la evolución de la enfermedad; y la FIG. 52F muestra la supervivencia global de los ratones tratados.

Las FIGS. 53A, 53B y 53C muestran interacciones LLA-CART en la médula ósea del cráneo de ratones con xenoinjerto. La FIG. 53A muestra el esquema experimental; la FIG. 53B muestra imágenes multifotónicas representativas del plano XY de linfocitos CART19 y linfocitos CART123 que interactúan con el tumor de LLA genomodificado para expresar CD19 y CD123 o CD123 solo (las células móviles se indican en círculos discontinuos, las células no móviles se indican con flechas); y la FIG. 53C es una representación gráfica de las imágenes de microscopia.

Las FIGS. 54A, 54B y 54C muestran la prevención de recaídas de CD19-neg usando CART19 y CART123. La FIG. 54A muestra el esquema experimental; la FIG. 54B muestra la evolución de la enfermedad (carga tumoral representada por BLI) de ratones tratados con linfocitos T no transducidos (gráfico superior), CART19 (gráfico central) o la combinación de CART19 y CART123 (gráfico inferior); y la FIG. 54C muestra la supervivencia global de este experimento.

Las FIGS. 55A y 55B muestran linfocitos T que expresan tanto CAR19 como CAR123 (FIG. 55A) y los resultados de un ensayo de desgranulación (FIG. 55B).

Las FIGS. 56A y 56B muestran la caracterización de los blastos de LLA. La FIG. 56A muestra la expresión de diversos marcadores CD19, CD123, CD10, CD34 y CD20; y la FIG. 56B muestra la estrategia de selección para clasificar las células CD19-CD123+.

Las FIGS. 57A, 57B, 57C y 57D muestran la actividad antileucémica de CART123. La FIG. 57A muestra la expresión de CD19 y CD123 en las células NALM6; la FIG. 57B muestra la carga tumoral (representada por BLI) en respuesta a la terapia con CART19 o CART123; la FIG. 57C muestra la supervivencia global de ratones a los que se administró CART19 o CART123; y la FIG. 57D muestra la supervivencia global de ratones a los que se administró dosis variables de CART123.

Las FIGS. 58A y 58B muestran la caracterización del modelo *in vivo* de la recaída por pérdida de antígeno. La FIG. 58A muestra la expresión de CD123 en enfermedad recidivante negativa para CD19; y la FIG. 58B muestra el ensayo de desgranulación de linfocitos CART19 o CART123 cuando se cultivan con células basales o de recaída *in vitro*.

La FIG. 59 muestra que la proliferación de linfocitos T transducidos que expresan CAR se potencia con dosis bajas de RAD001 en un sistema de cultivo celular. Los CART se cocultivaron con células NALM6 (Nalm-6) en presencia de diferentes concentraciones de RAD001 (nM). El número de linfocitos T positivos

para CAR y positivos para CD3 (negro) y linfocitos T totales (blanco) se evaluó después de 4 días de cocultivo.

La FIG. 60 representa mediciones de crecimiento tumoral de células NALM6-luc con dosificación diaria de RAD001 a 0,3, 1, 3 y 10 mg/kg (mpk) o dosificación de vehículo. Los círculos indican el vehículo; los cuadrados indican la dosis de 10 mg/kg de RAD001; los triángulos indican la dosis de 3 mg/kg de RAD001, los triángulos invertidos indican la dosis de 1 mg/kg de RAD001; y los rombos indican la dosis de 0,3 mg/kg de RAD001.

Las FIGS. 61A y 61B muestran curvas farmacocinéticas que muestran la cantidad de RAD001 en la sangre de ratones NSG con tumores NALM6. La FIG. 61A muestra la PK el día 0 tras la primera dosis de RAD001. La FIG. 61B muestra la PK el día 14 tras la dosis final de RAD001. Los rombos indican la dosis de 10 mg/kg de RAD001; los cuadrados indican la dosis de 1 mg/kg de RAD001; los triángulos indican la dosis de 3 mg/kg de RAD001; y las x indican la dosis de 10 mg/kg de RAD001.

Las FIGS. 62A y 62B muestran la proliferación *in vivo* de linfocitos CART CD19 humanizados con y sin dosificación de RAD001. Las dosis bajas diarias de RAD001 (0,003 mg/kg) conducen a un aumento de la proliferación de linfocitos T CAR, por encima de los niveles normales de proliferación de huCAR19. La figura 62A muestra linfocitos CAR T CD4+; la FIG. 62B muestra linfocitos CAR T CD8+. Los círculos indican PBS; los cuadrados indican huCTL019; los triángulos indican huCTL019 con 3 mg/kg de RAD001; los triángulos invertidos indican huCTL019 con 0,3 mg/kg de RAD001; los rombos indican huCTL019 con 0,03 mg/kg de RAD001; y los círculos indican huCTL019 con 0,003 mg/kg de RAD001.

La FIG. 63 muestra un análisis múltiple FIHC AQUA que muestra una diferencia significativa entre las poblaciones de células CD3+/PD-1+ en muestras de pacientes con LDLBG humano primario y secundario.

La FIG. 64 muestra el análisis AQUA que muestra diversos niveles de CD19 (panel inferior) y PD-L1 (panel superior) en sitios primarios y secundarios de muestras de LDLBG. Un total de 40 muestras de pacientes con LDLBG humano, 25 de sitios primarios y 15 de sitios secundarios, se sometieron a FIHC múltiple y se siguieron de un análisis AQUA para identificar los niveles de expresión de las proteínas CD19 y PD-L1.

La FIG. 65 muestra un esquema de dos poblaciones de células que expresan CAR. En la población de la izquierda (agrupada), cada célula expresa un tipo de CAR. En la población de la derecha (CAR bicistrónico), cada célula expresa dos tipos de CAR.

La FIG. 66 muestra diagramas de CAR bicistrónicos. El CAR superior tiene un CAR CD19 y un CAR CD22, separados por un sitio de escisión de proteasa P2A. El CAR inferior tiene un CAR CD19 y un CAR CD123, separados por un sitio de escisión de proteasa P2A.

La FIG. 67 muestra la coexpresión de CAR CD19 y CD22 de un vector bicistrónico.

La FIG. 68, panel superior, muestra la coexpresión de CAR CD19 y CD123 de un vector bicistrónico. La FIG. 68, panel inferior, muestra el efecto antileucémico de estas células.

La FIG. 69 muestra la carga tumoral en ratones que portan xenoinjertos de LLA-B negativos para CD19 después del tratamiento con un control UTD, CART19 o CART22.

La FIG. 70 muestra la expresión de PD-L1, PD1, LAG3 y TIM3 (de izquierda a derecha en cada conjunto de cuatro barras) en muestras de ganglios linfáticos y médula ósea de cinco pacientes CR, un paciente no clasificado y seis pacientes PD.

La FIG. 71 es un gráfico que muestra la activación (en ULR) de varias construcciones de CAR CD22 en presencia y ausencia de un competidor m971.

La FIG. 72 es un gráfico que muestra la activación (en ULR) de construcciones de CAR CD22 adicionales.

La FIG. 73 muestra tres gráficos de barras que indican la actividad de CAR CD22 en un ensayo de IFN-gamma.

La FIG. 74 muestra la actividad de unión de los CAR CD22-64 y CD22-65.

La FIG. 75 es un diagrama que mapea los epítopos a los que se unen diversos scFv de CD22.

DESCRIPCIÓN DETALLADA ADICIONAL

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece la invención.

El término "un" y "una" se refieren a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o más de un elemento.

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

El término "aféresis" como se utiliza en el presente documento se refiere al proceso extracorpóreo reconocido en la técnica mediante el cual la sangre de un donante o paciente se retira del donante o paciente y se pasa a través de un aparato que separa el o los componentes particulares seleccionados y devuelve el resto a la circulación del donante o paciente, p. ej., mediante retransfusión. Por tanto, "una muestra de aféresis" se refiere a una muestra obtenida utilizando aféresis.

El término "bioequivalente" se refiere a una cantidad de un agente diferente al compuesto de referencia (p. ej., RAD001), necesaria para producir un efecto equivalente al efecto producido por la dosis de referencia o la cantidad de referencia del compuesto de referencia (p. ej., RAD001). En una realización, el efecto es el nivel de inhibición de mTOR, p. ej., medido por la inhibición de la cinasa P70 S6, p. ej., según se evalúa en un ensayo *in vivo* o *in vitro*, p. ej., según se mide mediante un ensayo descrito en el presente documento, p. ej., el ensayo de Boulay o la medida de los niveles de S6 fosforilado por inmunoelectrotransferencia. En una realización, el efecto es la alteración de la proporción de linfocitos T positivos para Pd-1/negativos para PD-1, medidos por clasificación celular. En una realización, una cantidad o dosis bioequivalente de un inhibidor de mTOR es la cantidad o dosis que logra el mismo nivel de inhibición de la cinasa P70 S6 que la dosis de referencia o la cantidad de referencia de un compuesto de referencia. En una realización, una cantidad o dosis bioequivalente de un inhibidor de mTOR es la cantidad o dosis que logra el mismo nivel de alteración en la proporción de linfocitos positivos para PD-1/negativos para PD-1 que la dosis de referencia o la cantidad de referencia de un compuesto de referencia.

El término "inhibición" o "inhibidor" incluye una reducción en un determinado parámetro, p. ej., una actividad, de una molécula dada, p. ej., CD20, CD10, CD19, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a. Por ejemplo, la inhibición de una actividad, p. ej., una actividad de CD20, CD10, CD19, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a, de al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o más está incluida en este término. Por tanto, no es necesario que la inhibición sea del 100 %. Las actividades de los inhibidores se pueden determinar como se describe en el presente documento o mediante ensayos conocidos en la técnica. Un "inhibidor de linfocitos B" es una molécula, p. ej., una molécula pequeña, anticuerpo, CAR o célula que comprende un CAR, que causa la reducción de un determinado parámetro, p. ej., una actividad, p. ej., crecimiento o proliferación, de un linfocito B, o que causa una reducción en un parámetro determinado, p. ej., una actividad, de una molécula asociada con un linfocito B. Los ejemplos no limitantes de moléculas asociadas con un linfocito B incluyen proteínas expresadas en la superficie de linfocitos B, p. ej., CD20, CD10, CD19, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a.

La expresión "receptor de antígeno quimérico" o, como alternativa, un "CAR" se refiere a un conjunto de polipéptidos, normalmente dos en las realizaciones más sencillas, que, cuando están en una célula efectora inmunitaria, proporcionan a la célula especificidad para una célula diana, normalmente una célula cancerosa, y generación de señales intracelulares. En algunas realizaciones, un CAR comprende al menos un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplasmático (también denominado en el presente documento "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora y/o una molécula coestimuladora como se define más adelante. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos están en la misma cadena polipeptídica, p. ej., comprenden una proteína de fusión quimérica. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos no son contiguos entre sí, p. ej., están en diferentes cadenas polipeptídicas. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos incluye un conmutador de la dimerización que, tras la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, p. ej., puede acoplar un dominio de unión al antígeno a un dominio de señalización intracelular. En un aspecto, la molécula estimulante de CAR es la cadena zeta asociada con el complejo receptor de linfocitos T (p. ej., CD3 zeta). En un aspecto, el dominio de señalización citoplasmática comprende un dominio de señalización primario (por ejemplo, un dominio de señalización primario de CD3-zeta). En un aspecto, el dominio de señalización citoplasmática comprende además uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula coestimuladora como se define a continuación. En un aspecto, la molécula coestimulante se elige entre las moléculas coestimulantes descritas en el presente documento, p. ej., 4-1BB (es decir, CD137), CD27 y/o CD28. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización

intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula coestimuladora y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende al menos dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una secuencia líder opcional en el extremo amino (N-ter) de la proteína de fusión CAR. En un aspecto, el CAR comprende, además, una secuencia líder en el extremo N del dominio de unión al antígeno extracelular, en donde la secuencia líder se escinde opcionalmente del dominio de unión al antígeno (p. ej., un scFv) durante el procesamiento celular y la ubicación del CAR en la membrana celular.

La frase "enfermedad asociada con la expresión de CD20" como se utiliza en este documento incluye, pero no se limita a, una enfermedad asociada con la expresión de CD20 (por ejemplo, CD20 de tipo salvaje o mutante) o una afección asociada con células que expresan, o expresaron en cualquier momento, CD20 (por ejemplo, CD20 de tipo salvaje o mutante) que incluye, por ejemplo, una enfermedad proliferativa como un cáncer o una neoplasia maligna o una afección precancerosa como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan CD20 (por ejemplo, CD20 de tipo salvaje o mutante). Para evitar dudas, una enfermedad asociada con la expresión de CD20 puede incluir una afección asociada con células que actualmente no expresan CD20, p. ej., porque la expresión de CD20 ha disminuido de forma regulada, p. ej., debido al tratamiento con una molécula que tiene como diana CD20, p. ej., CAR CD20, pero que en algún momento expresó CD20. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD20 es un cáncer hemático. En un aspecto, un cáncer hemático incluye, pero sin limitación, LMA, síndrome mielodisplásico, LLA, tricoleucemia, leucemia prolinfocítica, leucemia mieloide crónica, linfoma de Hodgkin, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas y similares. Otras enfermedades asociadas con la expresión de expresión de CD20 incluyen, pero sin limitación, p. ej., cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD20. También se pueden incluir indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de CD20. En algunos casos, las células que expresan CD20 expresan, o han expresado en cualquier momento, ARNm de CD20. En un caso, las células que expresan CD20 producen una proteína CD20 (p. ej., de tipo silvestre o mutante) y la proteína CD20 puede estar presente en niveles normales o niveles reducidos. En un caso, las células que expresan CD20 produjeron niveles detectables de una proteína CD20 en un momento y posteriormente no produjeron sustancialmente ninguna proteína CD20 detectable.

La frase "enfermedad asociada con la expresión de CD22" como se utiliza en este documento incluye, pero no se limita a, una enfermedad asociada con la expresión de CD22 (por ejemplo, CD22 de tipo salvaje o mutante) o una afección asociada con células que expresan, o expresaron en cualquier momento, CD22 (por ejemplo, CD22 de tipo salvaje o mutante) que incluye, por ejemplo, una enfermedad proliferativa como un cáncer o una neoplasia maligna o una afección precancerosa como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan CD22 (por ejemplo, CD22 de tipo salvaje o mutante). Para evitar dudas, una enfermedad asociada con la expresión de CD22 puede incluir una afección asociada con células que actualmente no expresan CD22, p. ej., porque la expresión de CD22 ha disminuido de forma regulada, p. ej., debido al tratamiento con una molécula que tiene como diana CD22, p. ej., CAR CD22, pero que en algún momento expresó CD22. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD22 es un cáncer hematológico. La invención proporciona una célula o población de células como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico. En un aspecto, un cáncer hemático incluye, pero sin limitación, LMA, síndrome mielodisplásico, LLA, tricoleucemia, leucemia prolinfocítica, leucemia mieloide crónica, linfoma de Hodgkin, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas y similares. Otras enfermedades asociadas con la expresión de expresión de CD22 incluyen, pero sin limitación, p. ej., cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD22. También se pueden incluir indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de CD22. En algunas realizaciones, las células que expresan CD22 expresan, o expresan en cualquier momento, ARNm de CD22. En una realización, las células que expresan CD22 producen una proteína CD22 (por ejemplo, de tipo salvaje o mutante), y la proteína CD22 puede estar presente en niveles normales o niveles reducidos. En una realización, las células que expresan CD22 produjeron niveles detectables de una proteína CD22 en un punto y, posteriormente, no produjeron prácticamente ninguna proteína CD22 detectable.

Como se usa en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a una acción que ocurre antes de que el sujeto comience a padecer la afección o tenga una recaída de la afección. No es necesario que la prevención dé lugar a una prevención completa

de la afección; este término abarca la prevención parcial o la reducción de la afección o un síntoma de la afección, o la reducción del riesgo de desarrollar la afección.

Administrado "en combinación", como se utiliza en el presente documento, significa que se suministran dos (o más) tratamientos diferentes al sujeto durante el transcurso de la dolencia del sujeto con el trastorno, p. ej., se suministran los dos o más tratamientos después de que se haya diagnosticado el trastorno al sujeto y antes de que el trastorno se haya curado o eliminado o el tratamiento haya cesado por otras razones. En algunas realizaciones, el suministro de un tratamiento todavía se está produciendo cuando comienza el suministro del segundo, de modo que hay solapamiento en cuanto a la administración. Esto a veces se denomina aquí "entrega simultánea" o "entrega concurrente". En otras realizaciones, la administración de un tratamiento finaliza antes de que comience la administración del otro tratamiento. En algunas realizaciones de cualquier caso, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, es decir, se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida que lo que se observaría si el segundo tratamiento se administrara en ausencia del primer tratamiento, o se observa una situación análoga con el primer tratamiento. En algunas realizaciones, la administración es tal que la reducción de un síntoma u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor que lo que se observaría con un tratamiento administrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo o más que aditivo. El suministro puede ser tal que un efecto del primer tratamiento suministrado aún sea detectable cuando se suministra el segundo. En una realización, la célula que expresa CAR se administra a una dosis y/o pauta posológica descritos en el presente documento, y el inhibidor de linfocitos B o agente que mejora la actividad de la célula que expresa CAR CD19, se administra a una dosis y/o pauta posológica descritos en el presente documento.

"Derivado de", como se usa ese término en este documento, indica una relación entre una primera y una segunda molécula. Se refiere de manera general a la similitud estructural entre la primera molécula y una segunda molécula, y no connota ni incluye una limitación, en cuanto a la fuente o el proceso, de una primera molécula que procede de una segunda molécula. Por ejemplo, en el caso de un dominio de señalización intracelular que se deriva de una molécula CD3zeta, el dominio de señalización intracelular conserva suficiente estructura CD3zeta para que tenga la función requerida, es decir, la capacidad de generar una señal en las condiciones apropiadas. No connota ni incluye una limitación a un proceso particular para producir el dominio de señalización intracelular, p. ej., no significa que, para proporcionar el dominio de señalización intracelular, se deba comenzar con una secuencia de CD3zeta y eliminar la secuencia no deseada, o imponer mutaciones, para conseguir el dominio de señalización intracelular.

La expresión "dominio de señalización" se refiere a la porción funcional de una proteína que actúa transmitiendo información dentro de la célula para regular la actividad celular a través de vías de señalización definidas generando segundos mensajeros o funcionando como efectores respondiendo a dichos mensajeros.

Como se utiliza en este documento, el término "CD 19" se refiere a la proteína Grupo de Diferenciación 19, que es un determinante antigénico detectable en las células precursoras de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de CD19 humana se puede encontrar como el n.º de acceso de UniProt/Swiss-Prot P15391 y la secuencia de nucleótidos que codifica la CD19 humana se puede encontrar en el n.º de acceso NM_001178098. Como se usa en el presente documento, "CD19" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, eliminaciones y variantes de corte y empalme de CD 19 de tipo salvaje de longitud completa. CD19 se expresa en la mayoría de los cánceres de linaje B, incluidos, p. ej., leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica y linfoma no hodgkiniano. Más adelante se proporcionan otras células con expresión de CD19 en la definición de «enfermedad asociada con la expresión de CD19». También es un marcador precoz de progenitores de linfocitos B. Véase, p. ej., Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997). En un aspecto, la porción de unión al antígeno del CART reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD 19. En un aspecto, la proteína CD19 se expresa en una célula cancerosa.

El término "anticuerpo", como se utiliza en este documento, se refiere a una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena múltiple o simple, o inmunoglobulinas intactas, y pueden derivar de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una parte de un anticuerpo que conserva la capacidad de interactuar específicamente con (p. ej., mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítopo de un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', $F(ab')_2$, fragmentos Fv, fragmentos de anticuerpo scFv, Fv con enlaces disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único, tales como sdAb (ya sea VL o VH), dominios VHH de camélidos, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, tales como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un enlace disulfuro en la región de bisagra, y una CDR aislada u otros fragmentos de unión a epítopo de un anticuerpo.

Un fragmento de unión a antígeno también se puede incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden injertar en andamiajes basados en polipéptidos como la fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de EE. UU. n.º: 6.703.199, que describe minicuerpos de polipéptido de fibronectina).

El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en el que las regiones variables de cadena ligera y pesada están unidas contiguamente, por ejemplo, a través de un enlazador sintético, por ejemplo, un enlazador polipeptídico corto y flexible, y capaces de expresarse como un polipéptido de cadena única, y en el que el scFv conserva la especificidad del anticuerpo intacto del que deriva. A menos que se especifique, como se usa en este documento, un scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, por ejemplo, con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL.

El término "región determinante de complementariedad" o "CDR", como se utiliza en este documento, se refiere a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de anticuerpos que confieren especificidad de antígeno y afinidad de unión. Por ejemplo, en general, hay tres CDR en cada región variable de cadena pesada (por ejemplo, HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres CDR en cada región variable de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de un CDR determinado se pueden determinar utilizando cualquiera de varios esquemas conocidos, incluidos los descritos por Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia"), o una combinación de los mismos. Según el esquema de numeración de Kabat, en algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de la cadena pesada (VH) están numerados del 31 al 35 (HCDR1), del 50 al 65 (HCDR2) y del 95 al 102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de la cadena ligera (VL) están numerados del 24 al 34 (LCDR1), del 50 al 56 (LCDR2) y del 89 al 97 (LCDR3). Según el esquema de numeración de Chothia, en algunas realizaciones, los aminoácidos CDR en el VH están numerados del 26 al 32 (HCDR1), del 52 al 56 (HCDR2) y del 95 al 102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos CDR en el VL están numerados del 26 al 32 (LCDR1), del 50 al 52 (LCDR2) y del 91 al 96 (LCDR3). En un esquema de numeración combinado de Kabat y Chothia, en algunas realizaciones, los CDR corresponden a los residuos de aminoácidos que forman parte de un CDR de Kabat, un CDR de Chothia o ambos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las CDR corresponden a los residuos de aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en un VH, por ejemplo, un VH de mamífero, por ejemplo, un VH humano; y los residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en un VL, por ejemplo, un VL de mamífero, por ejemplo, un VL humano.

Como se utiliza en este documento, el término "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" se refiere a una proteína, por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina o un fragmento de la misma, que comprende al menos una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. El término "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En una realización, una molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica, por ejemplo, comprende una pluralidad de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, en la que una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad para no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo.

La parte del CAR de la invención que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en diversas formas en las que el dominio de unión a antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo biespecífico (Harlow et al., 1999, en: Uso de anticuerpos: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, En Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de una composición de CAR de la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv.

La expresión "cadena pesada del anticuerpo" se refiere a la mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones de origen natural y que normalmente determina la clase a la que pertenece el anticuerpo.

La expresión "cadena ligera de anticuerpo" se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones que se producen de forma natural. Las cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ) se refieren a los dos isotipos principales de cadenas ligeras de anticuerpos.

La expresión "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago o un sistema de expresión en levaduras. El término también debe interpretarse en el sentido de que significa un anticuerpo que ha sido generado por la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en el que la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido utilizando tecnología de secuencia de ADN o de aminoácidos recombinante que está disponible y es bien conocida en la técnica.

El término "antígeno" o "Ag" se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto comprenderá que cualquier macromolécula, incluidas prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos pueden derivar de ADN recombinante o genómico. Un técnico experto entenderá que cualquier ADN que comprenda una secuencia de nucleótidos o una secuencia parcial de nucleótidos que codifique una proteína que provoca una respuesta inmune, codifica por lo tanto un "antígeno" tal como se utiliza ese término en el presente documento. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita estar codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es evidente que la presente invención incluye, entre otros, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en diversas combinaciones para codificar polipéptidos que provocan la respuesta inmunitaria deseada. Además, un experto entenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente evidente que un antígeno puede generarse, sintetizarse o derivarse de una muestra biológica, o puede ser una macromolécula además de un polipéptido. Una muestra biológica de este tipo puede incluir, entre otros, una muestra tisular, una muestra tumoral, una célula o un líquido con otros componentes biológicos.

Los términos "competir" o "competir de forma cruzada" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a la capacidad de una molécula de anticuerpo de interferir con la unión de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-CD20 o CD22 divulgada en este documento, a una diana, por ejemplo, CD20 o CD22 humano. La interferencia con la unión puede ser directa o indirecta (p. ej., a través de una modulación alostérica de la molécula de anticuerpo o de la diana). La medida en que una molécula de anticuerpo es capaz de interferir con la unión de otra molécula de anticuerpo a la diana y, por lo tanto, si puede decirse que compite, puede determinarse usando un ensayo de unión de competencia, p. ej., como se describe en el presente documento. En algunos casos, un ensayo de unión competitiva es un ensayo competitivo cuantitativo. En algunos casos, se dice que una primera molécula de anticuerpo compite por unirse a la diana con una segunda molécula de anticuerpo cuando la unión de la primera molécula de anticuerpo a la diana se reduce en un 10 % o más, p. ej., 20 % o más, 30 % o más, 40 % o más, 50 % o más, 55 % o más, 60 % o más, 65 % o más, 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, 99 % o más en un ensayo de unión competitivo (p. ej., un ensayo competitivo descrito en el presente documento).

Como se usa en el presente documento, el término "epítopo" se refiere a los restos de un antígeno (p. ej., CD20 o CD22 humanos) que interactúan específicamente con una molécula de anticuerpo. Dichos restos, denominados en el presente documento determinantes epitópicos, normalmente comprenden, o son parte de, elementos tales como cadenas laterales de aminoácidos o cadenas laterales de azúcar. Un determinado epitópico puede definirse, p. ej., mediante métodos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento, p. ej., mediante cristalografía o mediante intercambio de hidrógeno-deuterio. Al menos uno o algunos de los restos de la molécula de anticuerpo, que interactúan específicamente con un determinante epitópico, se localizan normalmente en una o varias CDR. Normalmente, un epítopo tiene unas características estructurales tridimensionales específicas. Normalmente, un epítopo tiene unas características de carga específicas. Algunos epítopos son epítopos lineales, mientras que otros son epítopos conformacionales.

La expresión "efecto antineoplásico" se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar por diversos medios, incluyendo pero sin limitación, p. ej., una disminución del volumen tumoral, una disminución del número de células cancerosas, una disminución del número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida, una disminución de la proliferación de células cancerosas, una disminución de la supervivencia de las células cancerosas o mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto antineoplásico" también se puede manifestar por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de prevenir la aparición de cáncer en primer lugar. La expresión "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que se puede poner de manifiesto por diversos medios, que incluyen, pero sin limitación, p. ej., una disminución del volumen tumoral, una disminución del número de células tumorales, una disminución de la proliferación de células tumorales o una disminución de la supervivencia de células tumorales.

El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que después se le reintroducirá en el individuo.

El término "alogénico" se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser lo suficientemente diferente desde el punto de vista genético para interactuar de forma antigénica.

El término "xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.

El término "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. En el presente documento se describen ejemplos de diversos cánceres y estos incluyen, entre otros, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares. Los términos "tumor" y "cáncer" se usan en este documento de forma intercambiable, p. ej., ambos términos abarcan tumores sólidos y líquidos, p. ej., difusos o circulantes. Como se utiliza en este documento, el término "cáncer" o "tumor" incluye cánceres y tumores tanto premalignos como malignos.

Las expresiones "antígeno asociado al cáncer" o "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno proliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno proliferativo" se refieren indistintamente a una molécula (normalmente una proteína, carbohidrato o lípido) que se expresa preferentemente en la superficie de una célula cancerosa, ya sea en su totalidad o como un fragmento (p. ej., MHC/péptido) en comparación con una célula normal, y que es útil para el direccionamiento preferente de un agente farmacológico a la célula cancerosa. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral es un marcador expresado tanto por células normales como por células cancerosas, por ejemplo, un marcador de linaje, por ejemplo, CD19 en células B. En determinados aspectos, los antígenos tumorales de la presente divulgación proceden de cánceres que incluyen, pero sin limitación, melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer del cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y similares. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral es un antígeno común a un trastorno proliferativo específico. En algunas realizaciones, un antígeno asociado con el cáncer es una molécula de la superficie celular que se sobreexpresa en una célula cancerosa en comparación con una célula normal, por ejemplo, con una sobreexpresión de 1 vez, sobreexpresión de 2 veces, sobreexpresión de 3 veces o más en comparación con una célula normal. En algunas realizaciones, un antígeno asociado con el cáncer es una molécula de la superficie celular que se sintetiza de forma inapropiada en la célula cancerosa, por ejemplo, una molécula que contiene deleciones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en una célula normal. En algunas realizaciones, un antígeno asociado con el cáncer se expresará exclusivamente en la superficie celular de una célula cancerosa, en su totalidad o como un fragmento (p. ej., MHC/péptido), y no se sintetizará ni expresará en la superficie de una célula normal. En algunos casos, los CAR de la presente divulgación incluyen CAR que comprenden un dominio de unión al antígeno (p. ej., anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un péptido presentado en MHC. Normalmente, los péptidos derivados de proteínas endógenas rellenan las cavidades de las moléculas de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y son reconocidos por los receptores de los linfocitos T (TCR) en linfocitos T CD8+. Los complejos del MHC de clase I son expresados de manera constitutiva por todas las células nucleadas. En el cáncer, los complejos péptidos/MHC específicos del virus y/o del tumor representan una clase única de dianas de la superficie celular para la inmunoterapia. Se han descrito anticuerpos similares a TCR dirigidos a péptidos derivados de antígenos virales o tumorales en el contexto del antígeno leucocitario humano (HLA)-A1 o HLA-A2 (véase, por ejemplo, Sastry et al., J Virol. 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Bood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther 2001 8(21) : 1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 2013 5(176) :176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100). Por ejemplo, un anticuerpo tipo TCR se puede identificar a partir del análisis de una biblioteca, como una biblioteca de fagos scFv humanos expuestos.

La frase "enfermedad asociada con la expresión de CD19" incluye, entre otras, una enfermedad asociada con la expresión de CD19 (p. ej., CD19 de tipo natural o mutante) o afección asociada con células que expresan, o han expresado en algún momento, CD19 (p. ej., CD19 de tipo natural o mutante) incluidas, p. ej., enfermedades proliferativas tales como un cáncer o neoplasia maligna o una afección precancerosa tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan CD19. Para evitar dudas, una enfermedad asociada con la expresión de CD19 puede incluir una afección asociada con células que actualmente no expresan CD19, p. ej., porque la expresión de CD19 ha disminuido de forma regulada, p. ej., debido al tratamiento con una molécula que tiene como diana CD19, p. ej., CAR CD19, pero que en algún momento expresó CD19. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico. En un aspecto, el cáncer hemático es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 incluye cánceres y neoplasias malignas que incluyen, entre otras, p. ej., una o más leucemias agudas, que incluyen entre otras, p. ej., leucemia linfoide aguda de linfocitos B (LLAB), leucemia linfoide aguda de linfocitos T (LLAT), leucemia linfoide aguda (LLA); una o más leucemias crónicas que incluyen, entre otras, p. ej., leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfoide crónica (LLC). Los cánceres

hemáticos o las afecciones hemáticas adicionales asociados con la expresión de CD19, comprenden, entre otras, p. ej., leucemia prolinfocítica de linfocitos B, neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, tricoleucemia, linfoma folicular microcítico o macrocítico, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zonas marginales, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoide, macroglobulinemia de Waldenstrom y "preleucemia", que son un conjunto diverso de afecciones hemáticas que tienen en común la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y similares. Las enfermedades adicionales asociadas con la expresión de CD19 incluyen, entre otros, p. ej., cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD19. Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de CD19 incluyen, entre otras, p. ej., enfermedad autoinmunitaria (p. ej., lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes. En algunos casos, las células que expresan CD19 expresan, o han expresado en cualquier momento, ARNm de CD20. En un caso, las células que expresan CD19 producen una proteína CD19 (por ejemplo, de tipo salvaje o mutante) y la proteína CD19 puede estar presente en niveles normales o reducidos. En un caso, las células que expresaban CD19 produjeron niveles detectables de una proteína CD19 en un momento dado y, posteriormente, no produjeron prácticamente ninguna proteína CD19 detectable.

El término "modificaciones de secuencia conservadora" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Estas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la divulgación mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de un CAR de la invención pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el CAR alterado puede probarse utilizando los ensayos funcionales descritos en este documento.

El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3 o CAR) con su ligando cognado (o antígeno tumoral en el caso de un CAR), mediando así un evento de transducción de señales, como, entre otros, la transducción de señales a través del complejo TCR/CD3 o la transducción de señales a través del receptor NK apropiado o los dominios de señalización del CAR. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de ciertas moléculas.

La expresión "molécula estimulante" se refiere a una molécula expresada por una célula inmunitaria, p. ej., linfocito T, linfocito NK o linfocito B que proporciona la o las secuencias de señalización citoplasmática que regulan la activación de la célula inmunitaria de forma estimulante para al menos algún aspecto de la ruta de señalización de las células inmunitarias. En un aspecto, la señal es una señal primaria que se inicia, por ejemplo, mediante la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, y que da lugar a la mediación de una respuesta de linfocitos T, que incluye, entre otros, proliferación, activación, diferenciación y similares. Una secuencia de señalización citoplasmática primaria (también denominada "dominio de señalización primaria") que actúa de manera estimuladora puede contener un motivo de señalización conocido como motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor o ITAM. Los ejemplos de una secuencia de señalización citoplasmática que contiene ITAM que es de uso particular en la divulgación incluye, pero sin limitación, las derivadas de CD3 zeta, FcR gamma común (FCER1G), Fc gamma RIIa, FcR beta (Fc épsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD79a, CD79b, DAP10 y DAP12. En un CAR específico de la invención, el dominio de señalización intracelular en uno o más CARS de la invención comprende una secuencia de señalización intracelular, p. ej., una secuencia de señalización primaria de CD3-zeta. En un CAR específico de la invención, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO:17 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares. En un CAR específico de la invención, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 43 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares.

El término "célula presentadora de antígeno" o "APC" se refiere a una célula del sistema inmunitario, como una célula accesoria (por ejemplo, una célula B, una célula dendrítica y similares) que muestra un antígeno extraño complejado con complejos principales de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Las células T pueden reconocer estos complejos utilizando sus receptores de células T (TCR). Las APC procesan antígenos y los presentan a las células T.

"Célula efectora inmunitaria", como se utiliza dicho término en este documento, se refiere a una célula que participa en una respuesta inmunitaria, por ejemplo, en la promoción de una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de células efectoras inmunitarias incluyen linfocitos T, p. ej., linfocitos T alfa/beta y linfocitos T gamma/delta, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citolíticos naturales (NK-T), mastocitos y fagocitos de origen mieloide.

"Función efectora inmunitaria o respuesta efectora inmunitaria", como se utiliza esa expresión en el presente documento, se refiere a la función o respuesta, p. ej., de una célula efectora inmunitaria, que potencia o fomenta un ataque inmunitario de una célula diana. P. ej., una función o respuesta efectora inmunitaria se refiere a una propiedad de un linfocito T o NK que fomenta la destrucción o la inhibición del crecimiento o la proliferación de una célula diana. En el caso de un linfocito T, la estimulación primaria y la coestimulación son ejemplos de función o respuesta efectora inmunitaria.

La expresión «función efectora» se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas.

Un "dominio de señalización intracelular", como se usa el término en el presente documento, se refiere a una porción intracelular de una molécula. El dominio de señalización intracelular puede generar una señal que fomenta una función efectora inmunitaria de la célula que contiene el CAR, p. ej., un linfocito CART. Los ejemplos de función efectora inmunitaria, p. ej., en un linfocito CART, incluyen actividad citolítica y actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citocinas. En algunas realizaciones, el dominio de señal intracelular es la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar la cadena completa. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta, siempre que transduzca la señal de la función efectora. Por lo tanto, la expresión dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primaria. Los dominios de señalización intracelular primaria ejemplares incluyen aquellos derivados de las moléculas responsables de la estimulación primaria o simulación dependiente de antígeno. En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular coestimulador. Los dominios de señalización intracelular coestimuladores ejemplares incluyen aquellos derivados de moléculas responsables de señales coestimuladoras o estimulación independiente del antígeno. Por ejemplo, en el caso de un CART, un dominio de señalización intracelular primario puede comprender una secuencia citoplasmática de un receptor de células T, y un dominio de señalización intracelular coestimulador puede comprender una secuencia citoplasmática de un correceptor o una molécula coestimuladora.

Un dominio de señalización intracelular primario puede comprender un motivo de señalización conocido como motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen, pero sin limitación, los derivados de CD3 zeta, FcR gamma, FcR gamma común (FCER1G), Fc gamma RIIa, FcR beta (Fc épsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"), FcεRI, CD66d, CD32, DAP10 y DAP12.

El término "zeta" o, como alternativa, "cadena zeta", "CD3-zeta" o "TCR-zeta" se define como la proteína proporcionada como el n.º de ref. de GenBank BAG36664.1, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares, y un "dominio estimulante zeta" o, como alternativa, un "dominio estimulante CD3-zeta" o un "dominio estimulante TCR-zeta" se define como los residuos de aminoácidos del dominio citoplasmático de la cadena zeta, o derivados funcionales de los mismos, que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de linfocitos T. En un aspecto, el dominio citoplasmático de zeta comprende los residuos 52 a 164 del GenBank Acc. No. BAG36664.1 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono, simio y similares, que son ortólogos funcionales del mismo. En un aspecto, el "dominio estimulador zeta" o un "dominio estimulador CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO:17. En un aspecto, el "dominio estimulador zeta" o un "dominio estimulador CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO:43.

El término "molécula coestimuladora" se refiere al socio de unión cognado en una célula T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando así una respuesta coestimuladora de la célula T, como, entre otras, la proliferación. Las moléculas coestimulantes son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que contribuyen a una respuesta inmunitaria eficiente. Las moléculas coestimulantes incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, proteínas receptoras de TNF, proteínas de tipo inmunoglobulina, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores de linfocitos NK activadores, BTLA, un receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4,

CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se une específicamente con CD83.

Un dominio de señalización intracelular coestimulador se refiere a la porción intracelular de una molécula coestimuladora. El dominio de señalización intracelular puede comprender la porción intracelular completa, o el dominio de señalización intracelular nativo completo, de la molécula de la que procede, o un fragmento funcional o derivado de la misma.

El término "4-1BB" se refiere a un miembro de la superfamilia de TNFR con una secuencia de aminoácidos proporcionada como el n.º de ref. de GenBank AAA62478.2, o los restos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares; y un "dominio coestimulador de 4-1BB" se define como los restos de aminoácidos 214-255 del n.º de ref. de GenBank AAA62478.2, o los restos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares. En un aspecto, el "dominio de co-estimulación 4-1BB" es la secuencia proporcionada como la SEQ ID NO: 16 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares.

El término "codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (por ejemplo, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de ellas. Así, un gen, ADNc o ARN, codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia del ARNm y que normalmente se proporciona en los listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden considerarse como codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

A menos que se especifique otra cosa, una «secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos» incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede en alguna versión contener un intrón(es).

El término "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, como se describe en este documento, eficaz para lograr un resultado biológico particular.

El término "endógeno" se refiere a cualquier material procedente o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular impulsada por un promotor.

El término "vector de transferencia" se refiere a una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede utilizarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica, incluidos, entre otros, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector de transferencia" incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse de manera que incluya además compuestos no plasmídicos ni virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, como, por ejemplo, un compuesto de polilisina, un liposoma y similares. Los ejemplos de vectores de transferencia viral incluyen, entre otros, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.

El término "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que se va a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en un sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos aquellos conocidos en la técnica, incluidos cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

El término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus porque pueden infectar células que no se dividen; pueden transferir una cantidad significativa de información genética al ADN de la célula huésped, por lo que son uno de los métodos más eficientes de vector de transferencia de genes. HIV, SIV, y FIV son ejemplos de lentivirus.

La expresión "vector lentivírico" se refiere a un vector derivado de al menos una porción de un genoma de lentivirus, que incluye especialmente un vector lentivírico auto-inactivante tal como se proporciona en Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores lentivíricos que pueden utilizarse en la clínica incluyen, entre otros, p. ej., la tecnología de suministro de genes LENTIVECTOR® de Oxford BioMedica, el sistema de vectores LENTIMAX™ de Lentigen y similares. También están disponibles tipos no clínicos de vectores lentivíricos y el experto en la técnica estará familiarizado con ellos.

El término "homólogo" o "identidad" se refiere a la identidad de la secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son homólogas en un 50%; si el 90% de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10) son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son homólogas en un 90%.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 u otras subsecuencias de unión a antígenos de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados y sus fragmentos de anticuerpos son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o fragmento de anticuerpo) en los que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, un anticuerpo/fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. Estas modificaciones pueden refinar y optimizar aún más el rendimiento del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo del mismo comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o una porción significativa de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado o el fragmento de anticuerpo también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

"Totalmente humano" se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, en la que la molécula completa es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo o inmunoglobulina.

El término "aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o completamente de los materiales coexistentes de su estado natural sí está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislado puede existir en forma sustancialmente purificada o puede existir en un entorno no nativo como, por ejemplo, una célula huésped.

En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que aparecen comúnmente. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina y "U" se refiere a uridina.

La expresión «ligado operablemente» o «control transcripcional» se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da lugar a la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está vinculada operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está vinculado operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de ADN unidas operativamente pueden ser contiguas entre sí y, por ejemplo, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

El término administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (sc), intravenosa (iv), intramuscular (im) o intraesternal, intratumoral o técnicas de infusión.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. La expresión «ácido nucleico» incluye un gen, ADNc o un ARNm. En una realización, la molécula de ácido nucleico es sintética (por ejemplo, sintetizada químicamente) o recombinante. A menos que esté específicamente limitado, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos o derivados de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y se refieren a un compuesto que comprende residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se establece limitación alguna en el número máximo de aminoácidos que puede comprender una secuencia proteica o peptídica. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Como se utiliza en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, a las que también se hace referencia comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, a las que generalmente se hace referencia en la técnica como proteínas, de las que hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Un polipéptido incluye un péptido natural, un péptido recombinante o una combinación de estos.

El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

El término "secuencia promotora/reguladora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto genético unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y, en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores necesarios para la expresión del producto genético. La secuencia promotora/reguladora puede, por ejemplo, ser una que exprese el producto genético de una manera específica del tejido.

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

El término promotor "inducible" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando está enlazada operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente sólo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

El término promotor "específico de tejido" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando está vinculada operativamente con un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente sólo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

El término "enlazador polipeptídico flexible" o "enlazador" tal como se utiliza en el contexto de un scFv se refiere a un enlazador peptídico que consiste en aminoácidos como residuos de glicina y/o serina utilizados solos o en combinación para unir regiones de cadena pesada variable y de cadena ligera variable. En una realización, el enlazador polipeptídico flexible es un enlazador Gly/Ser y comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)n, en donde n es un número entero positivo igual a o mayor que 1. Por ejemplo, n=1, n=2, n=3. n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 y n=10 (SEQ ID NO: 105). En una realización, los enlazadores de polipéptidos flexibles incluyen, pero no se limitan a, (Gly4 Ser) 4 (SEQ ID NO: 106) o (Gly4 Ser) 3 (SEQ ID NO: 107). En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly2Ser), (GlySer) o (Gly3Ser) (SEQ ID NO: 108). También se incluyen dentro del alcance de la invención enlazadores descritos en el documento WO2012/138475.

Como se utiliza en este documento, una tapa 5' (también denominada caperuza de ARN, caperuza de ARN 7-metilguanosina o caperuza de ARN m7G) es un nucleótido de guanina modificado que se ha añadido al extremo "frontal" o 5' de un ARN mensajero eucariota poco después del inicio de la transcripción. La caperuza 5' consiste en un grupo terminal que está unido al primer nucleótido transcrito. Su presencia es importante para el

reconocimiento por parte del ribosoma y la protección contra RNasas. La adición de la caperuza está acoplada a la transcripción y se produce junto con la transcripción, de modo que cada uno influye sobre el otro. Poco después del inicio de la transcripción, el extremo 5' del ARNm que se está sintetizando se une a un complejo sintetizador de caperuza asociado con la ARN polimerasa. Este complejo enzimático cataliza las reacciones químicas necesarias para la protección del ARNm. La síntesis se desarrolla como una reacción bioquímica de varias etapas. La fracción de protección se puede modificar para modular la funcionalidad del ARNm, como su estabilidad o eficiencia de traducción.

Como se utiliza en el presente documento, "ARN transcrito *in vitro*" se refiere a ARN, p. ej., ARNm, que se ha sintetizado *in vitro*. Generalmente, el ARN transcrito in vitro se genera a partir de un vector de transcripción in vitro. El vector de transcripción in vitro comprende un molde que se utiliza para generar el ARN transcrito in vitro.

Como se usa en el presente documento, una "poli(A)" es una serie de adenosinas unidas mediante poliadenilación al ARNm. En algunas realizaciones de una construcción para la expresión transitoria, el poliA está entre 50 y 5000 (SEQ ID NO: 28), p. ej., mayor que 64, p. ej., mayor que 100, p. ej., mayor que 300 o 400. Las secuencias de poli(A) se pueden modificar química o enzimáticamente para modular la funcionalidad de ARNm, tal como la localización, la estabilidad o la eficiencia de la traducción.

Como se usa en el presente documento, "poliadenilación" se refiere al enlace covalente de un resto de poliadenililo, o su variante modificada, a una molécula de ARN mensajero. En los organismos eucariotas, la mayoría de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) están poliadeniladas en el extremo 3'. La cola de poli(A) 3' es una secuencia larga de nucleótidos de adenina (a menudo varios cientos) añadidos al pre-ARNm a través de la acción de una enzima, la poliadenilato··polimerasa. En los eucariotas superiores, la cola poli(A) se añade a las transcripciones que contienen una secuencia específica, la señal de poliadenilación. La cola de poli(A) y la proteína unida a ella ayudan a proteger el ARNm de la degradación por parte de exonucleasas. La poliadenilación también es importante para la terminación de la transcripción, la exportación del ARNm desde el núcleo y la traducción. La poliadenilación ocurre en el núcleo inmediatamente después de la transcripción del ADN en ARN, pero también puede ocurrir más tarde en el citoplasma. Una vez terminada la transcripción, la cadena de ARNm se escinde mediante la acción de un complejo de endonucleasa asociado con la ARN polimerasa. El sitio de escisión generalmente se caracteriza por la presencia de la secuencia de bases AAUAAA cerca del sitio de escisión. Una vez escindido el ARNm, se añaden residuos de adenosina al extremo 3' libre en el sitio de escisión.

Como se utiliza en este documento, "transitorio" se refiere a la expresión de un transgén no integrado durante un período de horas, días o semanas, en el que el período de tiempo de expresión es menor que el período de tiempo para la expresión del gen si está integrado en el genoma o contenido dentro de un replicón plasmídico estable en la célula huésped.

El término "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que desempeñan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. La expresión "receptor de la superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitir la señal a través de la membrana de una célula.

El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmune (por ejemplo, mamíferos, humanos).

El término "célula sustancialmente purificada" se refiere a una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos celulares con los que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a células que han sido separadas de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunos aspectos, las células se cultivan in vitro. En otros aspectos, las células no se cultivan in vitro.

El término "terapéutico", como se utiliza en el presente documento, significa un tratamiento. Un efecto terapéutico se obtiene mediante la reducción, supresión, remisión o erradicación de un estado patológico.

El término "profilaxis" tal como se utiliza en este documento significa la prevención o el tratamiento protector de una enfermedad o estado patológico.

En el contexto de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de un trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo" se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos. En ciertos aspectos, los antígenos del trastorno hiperproliferativo de la presente divulgación proceden de cánceres que incluyen, pero sin limitación, melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y similares.

El término "transfectado", "transformado" o "transducido" se refiere a un proceso mediante el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o se introduce en la célula huésped. Una célula «transfectada» o «transformada» o «transducida» es una que se ha transfectado, transformado o transducido con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula objeto principal y su descendencia.

Un sujeto "responde" al tratamiento si un parámetro de un cáncer (p. ej., un cáncer hemático, p. ej., crecimiento, proliferación y/o supervivencia de células cancerosas) en el sujeto se retrasa o se reduce en una cantidad detectable, p. ej., aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más según lo determine cualquier medida apropiada, p. ej., por masa, recuento de células o volumen. En un ejemplo, un sujeto responde al tratamiento si el sujeto experimenta una esperanza de vida extendida en aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más por encima de la esperanza de vida predicha si no se administra ningún tratamiento. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento, si el sujeto tiene una mayor supervivencia sin enfermedad, una mayor supervivencia global o un mayor tiempo hasta la progresión. Se pueden utilizar varios métodos para determinar si un paciente responde a un tratamiento, incluidos, por ejemplo, los criterios proporcionados por las Pautas de práctica clínica en oncología de la NCCN (NCCN Guidelines®). Por ejemplo, en el contexto de LLA-B, una respuesta completa o un respondedor completo puede implicar uno o más de: < 5% blastos de médula ósea, >1000 neutrófilos/RAN (µl). >100.000 plaquetas (µl) sin blastos circulantes ni enfermedad extramedular (sin linfadenopatía, esplenomegalia, infiltración de piel/encías/masa testicular/afectación del SNC), hematopoyesis trilinaje y sin recurrencia durante 4 semanas. Una respuesta parcial puede implicar uno o más de >50 % de reducción en blastos de MO, >1000 neutrófilos/CAN (/µl). >100.000 plaquetas (/µl). Un paciente que no responde puede mostrar progresión de la enfermedad, p. ej., >25 % en blastos de MO.

"Refractario" como se utiliza en este documento se refiere a una enfermedad, por ejemplo, cáncer, que no responde a un tratamiento. En algunas realizaciones, un cáncer refractario puede ser resistente a un tratamiento antes o al comienzo del tratamiento. En otras realizaciones, el cáncer refractario se puede volver resistente durante un tratamiento. Un cáncer refractario también se denomina cáncer resistente.

El término "recaída", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la reaparición de un cáncer después de un periodo inicial de respuesta (p. ej., respuesta completa o respuesta parcial). El período inicial de respuesta puede implicar que el nivel de células cancerosas caiga por debajo de un cierto umbral, por ejemplo, por debajo del 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%. La reaparición puede implicar que el nivel de células cancerosas aumente por encima de un cierto umbral, por ejemplo, por encima del 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%. Por ejemplo, en el contexto de LLA-B, la reaparición puede implicar, por ejemplo, una reaparición de blastos en la sangre, la médula ósea (> 5%) o cualquier sitio extramedular, después de una respuesta completa. Una respuesta completa, en este contexto, puede implicar < 5% de blasto en médula ósea. De manera más general, en una realización, una respuesta (por ejemplo, respuesta completa o respuesta parcial) puede implicar la ausencia de ERM detectable (enfermedad residual mínima). En una realización, el período inicial de respuesta dura al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días; al menos 1, 2, 3 o 4 semanas; al menos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 12 meses; o al menos 1, 2, 3, 4 o 5 años.

En algunas realizaciones, una terapia que incluye un inhibidor de CD19, p. ej., una terapia con CAR CD19, puede presentar recaídas o ser refractaria al tratamiento. La recaída o resistencia puede estar provocada por la pérdida de CD19 (p. ej., una mutación con pérdida del antígeno) u otra alteración de CD19 que reduzca el nivel de CD19 (p. ej., provocada por la selección clonal de clones negativos para CD19). Un cáncer que posee tal pérdida o alteración de CD19 se denomina en este documento un "cáncer CD19-negativo" o un "cáncer recidivante CD 19-negativo"). Se entenderá que no es necesario que un cáncer negativo para CD19 tenga una pérdida de CD19 de un 100 %, sino una reducción suficiente para reducir la eficacia de una terapia con CD19 de modo que el cáncer presente recaídas o se vuelva refractario. En algunos casos, un cáncer CD19-negativo resulta de una terapia de CAR CD19.

La expresión "se une específicamente" se refiere a un anticuerpo, o un ligando, que reconoce y se une a una proteína compañera de unión (p. ej., un antígeno tumoral estimulante) presente en una muestra, pero cuyo anticuerpo o ligando no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en la muestra.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de sujetos sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y son adecuadas a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, Berge et al. describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66:1-19.

"Receptor de antígeno quimérico regulable (RCAR)", como se utiliza ese término en este documento, se refiere a un conjunto de polipéptidos, normalmente dos en las realizaciones más simples, que cuando están en una célula RCARX, proporcionan a la célula RCARX especificidad para una célula diana, normalmente una célula cancerosa, y generación o proliferación de señales intracelulares regulables, lo que puede optimizar una propiedad efectora inmunitaria de la célula RCARX. Una célula RCARX se basa, al menos en parte, en un dominio de unión a antígeno

para proporcionar especificidad para una célula diana que comprende el antígeno unido por el dominio de unión a antígeno. En una realización, un RCAR incluye un interruptor de dimerización que, ante la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar un dominio de señalización intracelular al dominio de unión al antígeno.

"Anclaje de membrana" o "dominio de anclaje de membrana", como se utiliza ese término en este documento, se refiere a un polipéptido o fracción, por ejemplo, un grupo miristoilo, suficiente para anclar un dominio extracelular o intracelular a la membrana plasmática.

"Dominio de conmutación", como se utiliza dicho término en este documento, por ejemplo, cuando se hace referencia a un RCAR, se refiere a una entidad, típicamente una entidad basada en polipéptidos, que, en presencia de una molécula de dimerización, se asocia con otro dominio de conmutación. La asociación da como resultado un acoplamiento funcional de una primera entidad vinculada a, por ejemplo, fusionada a, un primer dominio de conmutación, y una segunda entidad vinculada a, por ejemplo, fusionada a, un segundo dominio de conmutación. Un primer y un segundo dominio de conmutación se denominan colectivamente interruptor de dimerización. En algunas realizaciones, el primer y segundo dominio de conmutación son iguales entre sí, por ejemplo, son polipéptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos primaria, y se les denomina colectivamente un interruptor de homodimerización. En algunas realizaciones, el primer y segundo dominio de conmutación son diferentes entre sí, por ejemplo, son polipéptidos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos primarias, y se les denomina colectivamente un interruptor de heterodimerización. En algunas realizaciones, el cambio es intracelular. En algunas realizaciones, el cambio es extracelular. En algunas realizaciones, el dominio de tipo interruptor es una entidad basada en polipéptidos, p. ej., basada en FKBP o FRB, y la molécula de dimerización es una molécula pequeña, p. ej., un rapálogo. En algunas realizaciones, el dominio de tipo interruptor es una entidad basada en polipéptidos, p. ej., un scFv que se une a un péptido myc, y la molécula de dimerización es un polipéptido, un fragmento del mismo o un multímero de un polipéptido, p. ej., un ligando myc o multímeros de un ligando myc que se unen a uno o más scFvs myc. En algunas realizaciones, el dominio de tipo interruptor es una entidad basada en polipéptidos, p. ej., receptor myc, y la molécula de dimerización es un anticuerpo o fragmentos del mismo, p. ej., anticuerpo myc.

"Molécula de dimerización", como se utiliza dicho término en este documento, por ejemplo, cuando se hace referencia a un RCAR, se refiere a una molécula que promueve la asociación de un primer dominio de conmutación con un segundo dominio de conmutación. En algunas realizaciones, la molécula de dimerización no se encuentra de forma natural en el sujeto o no se encuentra en concentraciones que darían lugar a una dimerización significativa. En algunas realizaciones, la molécula de dimerización es una molécula pequeña, p. ej., rapamicina o un rapálogo, p. ej., RAD001.

La expresión "dosis baja, de potenciación inmunitaria", cuando se utiliza junto con un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR alostérico, p. ej., RAD001 o rapamicina, o un inhibidor de mTOR catalítico, se refiere a una dosis de inhibidor de mTOR que inhibe parcialmente, pero no completamente, la actividad de mTOR, p. ej., medida por la inhibición de la actividad quinasa P70 S6. Los métodos para evaluar la actividad de mTOR, p. ej., mediante inhibición de P70 S6 cinasa, se describen en este documento. La dosis es insuficiente para producir una supresión inmunitaria completa, pero es suficiente para mejorar la respuesta inmunitaria. En una realización, la dosis baja, de potenciación inmunitaria, de inhibidor de mTOR da como resultado una disminución en el número de célula T PD-1 positivos y/o un aumento en el número de célula T PD-1 negativos, o un aumento en la relación de células T PD-1 negativas/células T PD-1 positivas. En una realización, la baja dosis, potenciadora de la inmunidad, del inhibidor de mTOR da como resultado un aumento del número de células T sin tratamiento previo. En una realización, la dosis baja de inhibidor de mTOR que mejora el sistema inmunológico da como resultado uno o más de los siguientes efectos:

un aumento en la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: $CD62L^{alta}$, $CD127^{alta}$ $CD27^{+}$, y BCL2, por ejemplo, en células T de memoria, por ejemplo, precursores de células T de memoria;

una disminución en la expresión de KLRG1, por ejemplo, en células T de memoria, por ejemplo, precursores de células T de memoria; y

un aumento en el número de precursores de células T de memoria, por ejemplo, células con una o una combinación de las siguientes características: aumento de $CD62L^{alta}$, aumento de $CD127^{alta}$, aumento de $CD27^{+}$, disminución de KLRG1 y aumento de BCL2;

en los que se produce cualquiera de los cambios descritos anteriormente, por ejemplo, al menos de forma transitoria, por ejemplo, en comparación con un sujeto no tratado.

Intervalos: a lo largo de esta divulgación, se pueden presentar en un formato de intervalo diversos aspectos de la invención. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no se debe interpretar como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un rango revela específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, la descripción de un rango como de 1 a 6 debe

considerarse como si hubiera revelado específicamente subrangos como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 hasta 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Como otro ejemplo, un rango como 95-99% de identidad, incluye algo con 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad, e incluye subrangos como 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% y 98-99% de identidad. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a moléculas CAR que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD22 de acuerdo con las reivindicaciones.

Inhibidores de CD19 y dominios de unión

También se describen aquí composiciones de materia y métodos de uso para el tratamiento de una enfermedad tal como cáncer utilizando receptores de antígeno quimérico CD19 (CAR). Los métodos incluyen, entre otros, administrar un CAR CD19 descrito en el presente documento en combinación con otro agente como un inhibidor de linfocitos B. Los métodos también incluyen, por ejemplo, la administración de un CAR CD19 descrito en el presente documento para tratar un linfoma tal como el linfoma de Hodgkin.

En el presente documento se describen varios receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo diseñado para la unión específica a una proteína CD19. Una instancia de la divulgación se refiere a una célula (por ejemplo, célula T) diseñada para expresar un CAR, en la que la célula T CAR ("CART") exhibe una propiedad anticancerígena. En un aspecto, una célula se transforma con el CAR y el CAR se expresa en la superficie celular. En algunos casos, la célula (p. ej.,célula T) se transduce con un vector viral que codifica un CAR. En algunos casos, el vector viral es un vector retroviral. En algunos casos, el vector viral es un vector lentiviral. En algunos de estos casos, la célula puede expresar de forma estable el CAR. En otro caso, la célula (p. ej., célula T) se transfecta con un ácido nucleico, p. ej., ARNm, ADNc, ADN, que codifica un CAR. En algunos de estos casos, la célula puede expresar transitoriamente el CAR.

En un aspecto, la porción de unión a proteína anti-CD19 del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv. En un aspecto, fragmentos de anticuerpos de este tipo son funcionales, debido a que conservan la afinidad de unión equivalente, p. ej., se unen al mismo antígeno con una afinidad comparable a la del anticuerpo IgG del que proceden. En un aspecto, fragmentos de anticuerpos de este tipo son funcionales, debido a que proporcionan una respuesta biológica que puede incluir, pero sin limitación, la activación de una respuesta inmunitaria, la inhibición del origen de la transducción de señales a partir de su antígeno diana, la inhibición de la actividad cinasa y similares, tal como entenderá un experto en la materia. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno anti-CD19 del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv que se humaniza en comparación con la secuencia murina del scFv del que procede. En un aspecto, la secuencia de scFv murina parental es la construcción CAR19 proporcionada en la publicación PCT WO2012/079000 y proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 59. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv descrito en el documento WO2012/079000 y proporcionado en SEQ ID NO:59, o una secuencia al menos 95%, por ejemplo, 95-99%, idéntica al mismo. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 es parte de una construcción CAR proporcionada en la publicación PCT WO2012/079000 y proporcionada aquí como SEQ ID NO: 58, o una secuencia al menos 95%, por ejemplo, 95%-99%, idéntica a la misma. En un caso, el dominio de unión anti-CD 19 comprende al menos un CDR (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6) seleccionado de la Tabla 4 y/o la Tabla 5.

En algunos aspectos, los anticuerpos de la divulgación se incorporan en un receptor de antígeno quimérico (CAR). En un aspecto, el CAR comprende la secuencia polipeptídica proporcionada como la SEQ ID NO: 12 en la publicación PCT WO2012/079000, y proporcionada en el presente documento como la SEQ ID NO: 58, en donde el dominio scFv está sustituido con una o más secuencias seleccionadas de las SEQ ID NO: 1-12. En un aspecto, los dominios scFv de SEQ ID NOS:1-12 son variantes humanizadas del dominio scFv de SEQ ID NO:59, que es un fragmento scFv de origen murino que se une específicamente al CD 19 humano. La humanización de este scFv de ratón puede ser deseable para el entorno clínico, donde los residuos específicos para ratón pueden inducir una respuesta de antígeno anti-ratón humano (HAMA) en pacientes que reciben tratamiento con CART19, p. ej., tratamiento con linfocitos T transducidos con la construcción de CAR19.

En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19, p. ej., scFv humanizado, porción de un CAR de la divulgación es codificado por un transgén cuya secuencia se ha optimizado con codones para la expresión en una célula de mamífero. En un aspecto, la construcción CAR completa de la divulgación es codificada por un transgén, cuya secuencia completa se ha optimizado con codones para la expresión en una célula de mamífero. La optimización de codones se refiere al descubrimiento de que la frecuencia de aparición de codones sinónimos (es decir, codones que codifican el mismo aminoácido) en el ADN codificante está sesgada en diferentes especies. Tal degeneración de codones permite que un polipéptido idéntico sea codificado por varias secuencias de nucleótidos. Se conocen diversos métodos de optimización de codones en la técnica y éstos incluyen, p. ej., métodos divulgados en al menos las Patentes de EE. UU. con números 5 786 464 y 6 114 148.

En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 2. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 3. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 4. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 5. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 6. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 7. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 8. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 9. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 10. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 11. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 12.

En un aspecto, los CAR de la divulgación combinan un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo específico con una molécula de señalización intracelular. Por ejemplo, en algunos aspectos, la molécula de señalización intracelular incluye, pero sin limitación, la cadena CD3-zeta, los módulos de señalización 4-1BB y CD28 y combinaciones de estos. En un aspecto, el CAR CD19 comprende un CAR seleccionado de la secuencia proporcionada en una o más de las SEQ ID NO: 31-42. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 31. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 32. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 33. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 34. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 35. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 36. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 37. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 38. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 39. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 40. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 41. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 42.

Por tanto, en un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementeridad de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de complementeridad de cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de complementeridad de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 murino o humanizado descrito en este documento, y/o una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementeridad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementeridad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementeridad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 murino o humanizado descrito en este documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una o más (por ejemplo, las tres) de región determinante de complementeridad de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 murino o humanizado descrito en este documento, por ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado tiene dos regiones de cadena pesada variables, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en este documento. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una región variable de cadena ligera humanizada descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 2) y/o una región variable de cadena pesada humanizada descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 2). En un caso, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una región variable de cadena pesada humanizada descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 2), por ejemplo, al menos dos regiones variables de cadena pesada humanizadas descritas en este documento (por ejemplo, en la Tabla 2). En un caso, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 2, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 2, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2. En un caso, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con una identidad del 95-99% de la misma. En un caso, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71 y SEQ ID

NO:72, o una secuencia con una identidad del 95-99% de la misma. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 2, está unida a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 2, a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador descrito en este documento. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado incluye un enlazador $(Gly_4\text{-}Ser)n$, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, por ejemplo, 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador-región variable de cadena ligera.

En un aspecto, la porción del dominio de unión a antígeno comprende una o más secuencias seleccionadas de las SEQ ID NO: 1-12. En un aspecto, el CAR humanizado se selecciona de una o más secuencias seleccionadas de las SEQ ID NO: 31-42. En algunos aspectos, un anticuerpo no humano se humaniza, en el que se modifican secuencias o regiones específicas del anticuerpo para aumentar la similitud con un anticuerpo producido naturalmente en un ser humano o un fragmento del mismo.

En un caso, la molécula CAR comprende un dominio de unión anti-CD19 que comprende una o más (por ejemplo, las tres) regiones determinantes complementarias de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante complementaria de cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante complementaria de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en este documento, y una o más (por ejemplo, las tres) regiones determinantes complementarias de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante complementaria de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante complementaria de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en este documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 que comprende una o más, por ejemplo, las tres, CDR LC y una o más, por ejemplo, las tres, CDR HC. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 comprende una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la la cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, p. ej., el dominio de unión anti-CD19 tiene dos regiones de cadena pesada variable, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en esta memoria.

En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 se caracteriza por características o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, en un aspecto, la porción de una composición de CAR de la divulgación que comprende un dominio de unión a antígeno se une específicamente a CD19 humano. En un aspecto, la divulgación se refiere a un dominio de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, en el que el dominio de unión al anticuerpo se une específicamente a una proteína CD19 o un fragmento de la misma, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo comprende una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-12 o SEQ ID NO: 59. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un scFv seleccionado de las SEQ ID NO: 1-12 o SEQ ID NO: 59. En determinados aspectos, el scFv es contiguo y está en el mismo marco de lectura que una secuencia líder. En un aspecto, la secuencia líder es la secuencia polipeptídica proporcionada como la SEQ ID NO: 13.

En un aspecto, la porción del CAR que comprende el dominio de unión a antígeno comprende un dominio de unión a antígeno que se dirige a CD19. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno se dirige al CD 19 humano. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno del CAR tiene la misma especificidad de unión o una similar a la del fragmento scFv FMC63 descrito en Nicholson et al., o incluye dicho fragmento. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997). En un aspecto, la porción de CAR que comprende el dominio de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno que se dirige a un antígeno de linfocitos B, p. ej., un antígeno de linfocitos B humanos. Una molécula de anticuerpo de CD19 puede ser, p. ej., una molécula de anticuerpo (p. ej., una molécula de anticuerpo anti-CD19 humanizada) descrita en el documento WO2014/153270. El documento WO2014/153270 también describe métodos para ensayar la unión y la eficacia de diversas construcciones de CART.

En un caso, el dominio de unión anti-CD19 comprende una región variable de cadena ligera murina descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 3) y/o una región variable de cadena pesada murina descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 3). En un caso, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv que comprende una cadena ligera murina y una cadena pesada murina de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 59, o una secuencia con una identidad del 95-99% de la misma. En un

caso, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 3, está unida a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 3, a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador descrito en este documento. En un caso, el dominio de unión al antígeno incluye un enlazador (Gly4-Ser)n, el que n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, por ejemplo, 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador-región variable de cadena ligera.

Además, la presente divulgación se refiere (entre otras cosas) a composiciones de CAR CD19, opcionalmente en combinación con un inhibidor de células B, y su uso en medicamentos o métodos para tratar, entre otras enfermedades, cáncer o cualquier neoplasia maligna o enfermedades autoinmunes que involucren células o tejidos que expresen CD19.

En un aspecto, el CAR de la divulgación se puede usar para eradicar células normales que expresan CD 19, aplicable así para uso como una terapia de acondicionamiento celular antes del transplante celular. En un aspecto, la célula normal que expresa CD19 es una célula madre normal que expresa CD19 y el trasplante de células es un trasplante de células madre.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una célula (por ejemplo, célula T) diseñada para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en la que la célula que expresa CAR, por ejemplo, célula T CAR ("CART") exhibe una propiedad anticancerígena. Un antígeno adecuado es CD19. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno del CAR comprende un fragmento de anticuerpo anti-CD19 parcialmente humanizado. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno del CAR comprende un fragmento de anticuerpo anti-CD19 parcialmente humanizado que comprende un scFv. En consecuencia, se describe en este documento (entre otras cosas) un CD 19-CAR que comprende un dominio de unión anti-CD19 humanizado y está diseñado en una célula efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula T o una célula NK, y métodos para su uso para terapia adoptiva. La invención proporciona un CD22-CAR de acuerdo con las reivindicaciones y células que comprenden dicho CD22 CAR.

En un aspecto, el CAR comprende al menos un dominio intracelular seleccionado del grupo de un dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización CD28, un dominio de señalización CD3zeta y cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el CAR comprende al menos un dominio de señalización intracelular de una o más moléculas coestimulantes distintas de CD137 (4-1BB) o CD28.

La presente divulgación abarca, pero sin limitación, una construcción de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican un CAR, en donde el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD19, CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1, p. ej., CD19 humano, CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1, en donde la secuencia del fragmento de anticuerpo es contiguo y está en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. En el CAR de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a CD22. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimulador y/o un dominio de señalización primario, por ejemplo, una cadena zeta. El dominio de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende al menos una porción del dominio intracelular de una molécula coestimuladora. En una realización, el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo murino o un fragmento de anticuerpo descrito en este documento. En una realización, el dominio de unión al antígeno es un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo.

En aspectos específicos, una construcción CAR de la divulgación comprende un dominio scFv seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-12 o un dominio scFV de la SEQ ID NO: 59, en donde el scFv puede estar precedido por una secuencia líder opcional, tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 13, y seguido por una secuencia de bisagra opcional como la proporcionada en la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49, una región transmembrana tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:51 y una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:43, en donde los dominios son contiguos y están en el mismo marco de lectura. para formar una única proteína de fusión. También se incluye en la divulgación (entre otras cosas) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cada uno de los fragmentos scFv seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 59. También se incluye en la divulgación (entre otras cosas) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cada uno de los fragmentos scFv seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 59 y cada uno de los dominios de SEQ ID NOS: 13-17, más una proteína de fusión CD 19 CAR codificada de la divulgación. En un aspecto, una construcción de CAR CD19 ilustrativa comprende una secuencia líder opcional, un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio de transmembrana y un dominio estimulante intracelular. En un aspecto, una construcción de CAR CD19 ilustrativa comprende una secuencia líder opcional, un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio

transmembrana, un dominio coestimulante intracelular y un dominio estimulante intracelular. En algunos casos, se proporcionan construcciones CD19 CAR específicas que contienen dominios scFv humanizados de la divulgación como SEQ ID NOS: 31-42, o un dominio scFv murino proporcionado como SEQ ID NO:59.

Las secuencias CAR de longitud completa también se divulgan en este documento como SEQ ID NOS: 31-42 y 58 tal como se muestra en la Tabla 2 y la Tabla 3.

Se proporciona una secuencia líder ejemplar como SEQ ID NO: 13. Se proporciona una secuencia de bisagra/espaciador ejemplar como SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49. Se proporciona una secuencia de dominio transmembrana ejemplar como SEQ ID NO: 15. Se proporciona una secuencia ejemplar del dominio de señalización intracelular de la proteína 4-1BB como SEQ ID NO: 16. Se proporciona una secuencia ejemplar del dominio de señalización intracelular de CD27 como SEQ ID NO: 51. Se proporciona una secuencia de dominio CD3zeta ejemplar como SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 43. Estas secuencias pueden usarse, por ejemplo, en combinación con un scFv que reconoce uno o más de CD 19, CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1.

Se describen en este documento secuencias ejemplares de varios fragmentos scFv y otros componentes CAR. Cabe señalar que estos componentes de CAR (p. ej., de las SEQ ID NO: 121, o una secuencia de la Tabla 2, 3, 6, 11A, 11B, 16 o 25) sin una secuencia líder (por ejemplo, sin la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 54), también se proporcionan en el presente documento.

En algunos casos, las secuencias CAR descritas en este documento contienen un cambio de residuo Q/K en el dominio de señal del dominio coestimulador derivado de la cadena CD3zeta.

En un aspecto, la presente divulgación abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión anti-CD19, p. ej., descrito en esta memoria, que es contiguo con y en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 se selecciona de uno o más de los SEQ ID NOS: 1-12 y 58. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la secuencia proporcionada en una o más de las SEQ ID NO: 61-72 y 97. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 61. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 62. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 63. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 64. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 65. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 66. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 67. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 68. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 69. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 70. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 71. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 72.

En el presente documento se desvelan inhibidores de CD19 y terapias combinadas. En algunos casos, el inhibidor de CD19 (p. ej., una terapia celular o un anticuerpo) se administra en combinación con un inhibidor de linfocitos B, p. ej., uno o más inhibidores de CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. Un inhibidor de CD19 incluye, pero sin limitación, una célula que expresa CAR CD19, p. ej., un linfocito CART CD19 o un anticuerpo anti-CD19 (p. ej., un anticuerpo anti-CD19 mono o biespecífico) o un fragmento o conjugado del mismo. En algunos casos, el inhibidor de CD19 se administra en combinación con un inhibidor de células B, por ejemplo, una célula que expresa CAR descrita en este documento. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de ácido nucleico o una molécula CAR como se define en las reivindicaciones.

En esta divulgación, se describen numerosas células que expresan CAR CD19. Por ejemplo, un inhibidor de CD19 incluye una célula que expresa CAR anti-CD19, por ejemplo, CART, por ejemplo, una célula que expresa una construcción de CAR anti-CD19 descrita en la Tabla 2 o codificada por un CAR de unión a CD19 que comprende un scFv, CDR o VH. y cadenas VL descritas en las Tablas 2, 4 o 5. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-CD19, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-CD19 (que comprende un dominio de unión a CD19) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

En un caso, un dominio de unión a antígeno comprende uno, dos, tres (por ejemplo, las tres) CDR de cadena pesada, HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3, de un anticuerpo enumerado en este documento, por ejemplo, en la

Tabla 2, 4 o 5 y/o uno, dos, tres (por ejemplo, las tres) CDR de cadena ligera, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, de un anticuerpo enumerado en este documento, por ejemplo, en la Tabla 2, 4 o 5. En un caso, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo enumerado o descrito anteriormente.

En un caso, el dominio de unión de CD19 (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 2, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 2, o una secuencia con una identidad del 95-99 % con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2. En algunos casos, el dominio de unión de CD19 comprende una o más CDR (por ejemplo, uno de cada uno de los siguientes: HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3) de la Tabla 4 o la Tabla 5, o CDR que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco o seis modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una o más de las CDR.

Los anticuerpos ilustrativos anti-CD19 o fragmentos o conjugados de los mismos incluyen, pero sin limitación, blinatumomab, SAR3419 (Sanofi), MEDI-551 (MedImmune LLC), Combotox, DT2219ARL (Masonic Cancer Center), MOR-208 (también denominado XmAb-5574; MorphoSys), XmAb-5871 (Xencor), MDX-1342 (Bristol-Myers Squibb), SGN-CD19A (Seattle Genetics) y AFM11 (Affimed Therapeutics). Véase, p. ej., Hammer. MAbs. 4.5(2012): 571-77. Blinatomomab es un anticuerpo biespecífico que comprende dos scFv, uno que se une a CD19 y uno que se une a CD3. Blinatomomab dirige los linfocitos T para que ataquen las células cancerosas. Véase, p. ej., Hammer *et al.*; Identificador de Ensayos Clínicos N.º NCT00274742 y NCT01209286. MEDI-551 es un anticuerpo anti-CD19 humanizado con un Fc modificado para tener una mejor citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase, p. ej., Hammer *et al.*; e Identificador de Ensayos Clínicos N.º NCT01957579. Combotox es una mezcla de inmunotoxinas que se unen a CD19 y CD22. Las inmunotoxinas están compuestas por fragmentos de anticuerpo scFv fusionados con una cadena A de ricina desglucosilada. Véase, p. ej., Hammer et al.; y Herrera et al. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 31.12(2009):936-41; Schindler et al. Br. J. Haematol. 154.4(2011):471-6. DT2219ARL es una inmunotoxina biespecífica que tiene como diana CD19 y CD22, que comprende dos scFv y una toxina diftérica truncada. Véase, p. ej., Hammer *et al.*; e Identificador de Ensayos Clínicos N.º NCT00889408. SGN-CD19A es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD19 ligado a un agente citotóxico sintético que provoca la muerte de las células, auristatina monometilo F (MMAF). Véase, p. ej., Hammer *et al.*; e Identificador de Ensayos Clínicos N.º NCT01786096 y NCT01786135. SAR3419 es un conjugado anticuerpo anti-CD19-fármaco (ADC) que comprende un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD19 conjugado con un derivado de maitansina mediante un conector escindible. Véase, p. ej., Younes et al. J. Clin. Oncol. 30.2(2012): 2776-82; Hammer et al.; Clinical Trial Identifier No. NCT00549185; y Blanc et al. Clin. Cancer Res. 2011;17:6448-58. XmAb-5871 es un anticuerpo anti-CD19 humanizado con Fc modificado. Véase, por ejemplo, Hammer et al. MDX-1342 es un anticuerpo anti-CD19 diseñado por Fc humano con ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, Hammer et al. En algunos casos, la molécula de anticuerpo es una molécula biespecífica anti-CD19 y anti-CD3. Por ejemplo, AFM11 es un anticuerpo biespecífico que tiene como diana CD19 y CD3. Véase, p. ej., Hammer *et al.*; e Identificador de Ensayos Clínicos N.º NCT02106091. En algunos casos, un anticuerpo anti-CD19 descrito en este documento está conjugado o unido de otro modo a un agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, una vacuna peptídica (tal como la descrita en Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971), agente inmunosupresor o agente inmunoablativo, por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato, FK506, CAMPATH, anticuerpo anti-CD3, citoxina, fludarabina, rapamicina, ácido micofenólico, esteroide, FR901228 o citocina.

Las moléculas de anticuerpos anti-CD19 ejemplares (incluidos los anticuerpos o fragmentos o conjugados de los mismos) pueden incluir un scFv, CDR o cadenas VH y VL descritas en las Tablas 2, 4 o 5. En un caso, la molécula de anticuerpo de unión a CD19 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 2, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 2, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 2. En algunos casos, la molécula de anticuerpo que se une a CD19 comprende una o más CDR (por ejemplo, una de cada uno de las siguientes: HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3) de la Tabla 4 o la Tabla 5, o CDR que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco o seis modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de uno o más de los CDR. La molécula de anticuerpo puede ser, p. ej., una molécula de anticuerpo aislada.

En un caso, un dominio de unión a antígeno contra CD19 es una porción de unión a antígeno, por ejemplo, CDR, de un dominio de unión a antígeno descrito en una Tabla aquí. En un caso, un dominio de unión al antígeno CD19 puede ser de cualquier CAR CD19, por ejemplo, LG-740; Patente de EE. UU. nº 8.399.645; Patente de EE. UU. nº 7.446.190; Xu et al., Leuk Lymphoma. 2013 54(2):255-260(2012); Cruz et al., Blood 122(17):2965-2973 (2013); Brentjens et al., Blood, 118(18):4817-4828 (2011); Kochenderfer et al., Blood 116(20):4099-102 (2010); Kochenderfer et al., Blood 122 (25):4129-39(2013); y 16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther (ASGCT) (15-18 de mayo, Salt Lake City) 2013, Abst 10.

En un caso, la célula T CAR que se une específicamente a CD19 tiene la designación USAN TISAGENLECLEUCEL-T. CTL019 se produce mediante una modificación genética de las células T mediada por inserción estable a través de la transducción con un vector lentiviral (LV) autoinactivante y deficiente en replicación que contiene el transgén CTL019 bajo el control del promotor EF-1 alfa. CTL019 puede ser una mezcla de células T positivas y negativas al transgén que se administran al sujeto en función del porcentaje de células T positivas al transgén.

En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR de la divulgación se selecciona de uno o más de SEQ ID NOS: 85-96. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:85. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:86. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:87. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:88. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:89. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:90. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:91. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:92. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:93. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:94. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:95. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:96. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:97. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:98. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR es SEQ ID NO:99.

Inhibidores de CD20 y dominios de unión

Como se utiliza en el presente documento, el término "CD20" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en los linfocitos B. CD20 humano también se denomina miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios transmembrana (MS4A1). Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de CD20 humano se puede encontrar en los n.º de referencia NP_690605.1 y NP_068769.2, y la secuencia de nucleótidos que codifica las variantes de transcripción 1 y 3 del CD20 humano se puede encontrar en el n.º de referencia NM_152866.2 y NM_021950.3, respectivamente. Como se utiliza en este documento, "CD20" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del CD20 de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD20. En un aspecto, la proteína CD20 se expresa en una célula cancerosa.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un inhibidor de CD20 o un dominio de unión, por ejemplo, un inhibidor de CD20 o un dominio de unión como se describe en este documento. La divulgación también se refiere a un ácido nucleico que codifica el dominio de unión a CD20, o un CAR que comprende el dominio de unión a CD20. Un inhibidor de CD20 incluye, pero sin limitación, una célula que expresa CAR CD20, p. ej., un linfocito CART CD20 o un anticuerpo anti-CD20 (p. ej., un anticuerpo anti-CD20 mono o biespecífico) o un fragmento del mismo. La composición también puede comprender un segundo agente, p. ej., una célula que expresa CAR anti-CD19 o un dominio de unión a CD19. Los agentes pueden estar, p. ej., codificados por un solo ácido nucleico o diferentes ácidos nucleicos.

Se puede administrar un inhibidor de CD20 o un dominio de unión como monoterapia. En algunos aspectos, el inhibidor de CD20 o el dominio de unión se administra en combinación con un segundo agente. En un caso, el inhibidor de CD20 se administra en combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de ácido nucleico o una molécula CAR como se define en las reivindicaciones.

Células que expresan CAR CD20, p. ej., CART

En una instancia de la divulgación, la molécula de anticuerpo CD20 comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia

de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 15A o 15B, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 15A o 15B; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 14A o 14B, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 14A o 14B. En un caso, la molécula de anticuerpo de CD20 comprende una o más (p. ej., dos o las tres) región determinante de la complementariedad 1 de cadena ligera (CDR1 LC), región determinante de la complementariedad 2 de cadena ligera (CDR2 LC) y región determinante de la complementariedad 3 de cadena ligera (CDR3 LC) de un dominio de unión a CD20 descrito en el presente documento, y/o una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad 1 de cadena pesada (CDR1 HC), región determinante de la complementariedad 2 de cadena pesada (CDR2 HC) y región determinante de la complementariedad 3 de cadena pesada (CDR3 HC) de un dominio de unión a CD20 descrito en el presente documento, p. ej., un dominio de unión a CD20 que comprende una o más, p. ej., las tres, CDR LC y una o más, p. ej., las tres, CDR HC. Estas CDR pueden ser, por ejemplo, las de la Tabla 12A, 12B y/o la Tabla 13, o una secuencia sustancialmente idéntica a las mismas. En un caso, la molécula de anticuerpo de CD20 comprende una o más CDR (p. ej., una CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC o CDR3 LC) que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco o seis modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la **tabla 12A, 12B** y/o **tabla 13.** La molécula de anticuerpo puede ser, p. ej., una molécula de anticuerpo aislada.

En algunos casos, un inhibidor de CD20 incluye una célula que expresa CAR anti-CD20, p. ej., CART, p. ej., una célula que expresa una construcción de CAR anti-CD20 descrita en la **tabla 11A u 11B**, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma, o codificada por un CAR de unión a CD20 que comprende un scFv, CDR o cadenas VH y VL descritas en las **tablas 11A-15B**, o una secuencia sustancialmente idéntica a las mismas. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-CD20, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-CD20 (que comprende un dominio de unión a CD20) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

En un caso, el dominio de unión a CD20 (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 15A o 15B, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 15A o 15B; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 14A o 14B, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 14A o 14B.

En un caso, el dominio de unión a CD20 comprende una o más (p. ej., dos o las tres) región determinante de la complementariedad 1 de cadena ligera (CDR1 LC), región determinante de la complementariedad 2 de cadena ligera (CDR2 LC) y región determinante de la complementariedad 3 de cadena ligera (CDR3 LC) de un dominio de unión a CD20 descrito en el presente documento, y/o una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad 1 de cadena pesada (CDR1 HC), región determinante de la complementariedad 2 de cadena pesada (CDR2 HC) y región determinante de la complementariedad 3 de cadena pesada (CDR3 HC) de un dominio de unión a CD20 descrito en el presente documento, p. ej., un dominio de unión a CD20 que comprende una o más, p. ej., las tres, CDR LC y una o más, p. ej., las tres, CDR HC. Estas CDR pueden ser, por ejemplo, las de la Tabla 12A, 12B y/o la Tabla 13, o una secuencia sustancialmente idéntica a las mismas. En un caso, el dominio de unión a CD20 (p. ej., un scFv) comprende una o más CDR (p. ej., una CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC o CDR3 LC) que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco o seis modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la **tabla 12A, 12B** y/o **tabla 13.**

En algunos casos, el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD20, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El dominio de unión de CD20 puede comprender una o más de la región determinante complementaria de cadena ligera 1 (LC CDR1), la región determinante complementaria de cadena ligera 2 (LC CDR2) y la región determinante complementaria de cadena ligera 3 (LC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera de CD20 enumerada en la Tabla 13, 15A o 15B, y una o más de la región determinante complementaria de cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante complementaria de cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante complementaria de cadena pesada 3 (HC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada de CD20 enumerada en la Tabla 12A, 12B, 14A o 14B.

En un caso, el dominio de unión a CD20 comprende seis CDR (p. ej., una de cada una de CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC y CDR3 LC) de una cualquiera de CAR20-1, CAR20-2, CAR20-3, CAR20-4, CAR20-5, CAR20-6, CAR20-7, CAR20-8, CAR20-9, CAR20-10, CAR20-11, CAR20-12, CAR20-13, CAR20-14,

CAR20-15 o CAR20-16, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En un caso, el dominio de unión a CD20 comprende tres CDR (p. ej., una de cada una de CDR1 HC, CDR2 HC y CDR3 HC, o una de cada una de CDR1 LC, CDR2 LC y CDR3 LC) de una cualquiera de CAR20-1, CAR20-2, CAR20-3, CAR20-4, CAR20-5, CAR20-6, CAR20-7, CAR20-8, CAR20-9, CAR20-10, CAR20-11, CAR20-12, CAR20-13, CAR20-14, CAR20-15 o CAR20-16, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma.

En un caso, el dominio de unión de CD20 comprende una región variable de cadena ligera descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 15A o 15B) y/o una región variable de cadena pesada descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 14A o 14B), o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En un caso, el dominio de unión a CD20 (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 15A o 15B, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 15A o 15B; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 14A o 14B, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 14A o 14B.

Otros casos incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido descrito en esta sección. Por ejemplo, otros casos incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de cualquiera de las **tablas 11A-15B.** Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos puede comprender una construcción CAR o scFv de la Tabla 11A o 11B. El nucleótido puede codificar un VH de la Tabla 14A o 14B, un VL de la Tabla 15A o 15B, o ambos. El nucleótido puede codificar uno o más de (por ejemplo, dos o tres de) una VH CDR1, VH CDR2 o VH CDR3 de la Tabla 12A o 12B y/o el nucleótido puede codificar uno o más de (por ejemplo, dos o tres de) una VL CDR1, VL CDR2 o VL CDR3 de la Tabla 13. La secuencia de nucleótidos también puede incluir uno o más de, p. ej., todos los dominios de las SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17 y 51.

En otro aspecto, se describe aquí una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD20. Por ejemplo, en un caso, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR CD20. En un caso, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR (p. ej., un CAR CD19, un CAR ROR1, un CAR CD20 o un CAR CD22) que incluye un dominio de señalización intracelular primario, y una segunda célula que expresa un CAR (p. ej., un CAR CD19, un CAR ROR1, un CAR CD20 o un CAR CD22)) que incluye un dominio de señalización secundario. Una célula o población de células de la invención comprende una molécula de ácido nucleico o CAR como se define en las reivindicaciones.

El CAR CD20 también puede comprender uno o más de un dominio transmembrana, p. ej., un dominio transmembrana como se describe en el presente documento, un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización intracelular como se describe en el presente documento, un dominio coestimulante, p. ej., un dominio coestimulante como se describe en el presente documento, una secuencia líder, p. ej., una secuencia líder como se describe en el presente documento, o una bisagra, p. ej., una bisagra como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos anti-CD20 ejemplares incluyen, entre otros, rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, veltuzumab, obinutuzumab, TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), ocaratuzumab y Pro 13 1921 (Genentech). Véase, p. ej., Lim et al. Haematologica. 95.1(2010):135-43.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende rituximab. Rituximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa quimérico de ratón/ser humano que se une a CD20 y provoca la citólisis de una célula que expresa CD20, p. ej., como se describe en www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf. En algunos casos, el rituximab se puede usar para tratar neoplasias malignas de linfocitos B, tales como linfoma no hodgkiniano (LNH) (p. ej., LNH folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes) y leucemia linfocítica crónica (LLC). En otros casos, se puede usar el rituximab para tratar enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, anemia autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, aplasia pura de glóbulos rojos, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), síndrome de Evans, vasculitis, trastornos cutáneos ampollosos, diabetes mellitus de tipo 1, síndrome de Sjogren, encefalitis anti-receptores de NMDA y enfermedad de Devic, oftalmopatía de Graves y pancreatitis autoinmunitaria. En algunos casos, se puede usar rituximab para tratar el rechazo a trasplantes.

En algunos casos, se administra rituximab por vía intravenosa, p. ej., como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada infusión proporciona aproximadamente 500-2000 mg (p. ej., aproximadamente 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900 o 1900-2000 mg) de rituximab.

En algunos casos, se administra rituximab a una dosis de 150 mg/m^2 a 750 mg/m^2, p. ej., aproximadamente 150-175 mg/m^2, 175-200 mg/m^2, 200-225 mg/m^2, 225-250 mg/m^2, 250-300 mg/m^2, 300-325 mg/m^2, 325-350 mg/m^2, 350-375 mg/m^2, 375-400 mg/m^2, 400-425 mg/m^2, 425-450 mg/m^2, 450-475 mg/m^2, 475-500 mg/m^2, 500-525 mg/m^2, 525-550 mg/m^2, 550-575 mg/m^2, 575-600 mg/m^2, 600-625 mg/m^2, 625-650 mg/m^2, 650-675 mg/m^2 o 675-700 mg/m^2, donde m^2 indica el área de superficie corporal del sujeto.

En algunos casos, se administra rituximab en un intervalo de dosificaciones de al menos 4 días, p. ej., 4, 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, se administra rituximab en un intervalo de dosificaciones de al menos 0,5 semanas, p. ej., 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas o más.

En algunos casos, se administra rituximab en una dosis e intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un periodo de tiempo, p. ej., al menos 2 semanas, p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 semanas, o más. Por ejemplo, se administra rituximab en una dosis e intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un total de al menos 4 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD20 comprende ofatumumab. El ofatumumab es un anticuerpo monoclonal humano IgG1κ anti-CD20 con un peso molecular de aproximadamente 149 kDa. Por ejemplo, se genera ofatumumab utilizando tecnología de ratón transgénico e hibridoma y se expresa y purifica a partir de una línea celular murina recombinante (NS0). Véase, p. ej., www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125326lbl.pdf; y los números de identificador de ensayos clínicos NCT01363128, NCT01515176, NCT01626352 y NCT01397591.

Se puede usar ofatumumab para tratar enfermedades tales como LLC, linfoma no hodgkiniano (LNH) (p. ej., LNH folicular y LDLBG), leucemia prolinfocítica de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma de células del manto, artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

En algunos casos, se administra ofatumumab como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada infusión proporciona aproximadamente 150-3000 mg (p. ej., aproximadamente 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1200, 1200-1400, 1400-1600, 1600-1800, 1800-2000, 2000-2200, 2200-2400, 2400-2600, 2600-2800 o 2800-3000 mg) de ofatumumab.

En algunos casos, ofatumumab se administra en un intervalo de dosificación de al menos 4 días, por ejemplo, 4, 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, se administra ofatumumab en un intervalo de dosificaciones de al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 20, 22, 24, 26, 28, 30 semanas o más.

En algunos casos, se administra ofatumumab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un periodo de tiempo, p. ej., al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o 1, 2, 3, 4, 5 años o más. Por ejemplo, se administra ofatumumab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en esta memoria durante un total de al menos 2 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD20 comprende ocrelizumab. Ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado, p. ej., como se describe en los Identificadores de Ensayo Clínico Nºs NCT00077870, NCT01412333, NCT00779220, NCT00673920, NCT01194570, y Kappos et al. Lancet. 19.378(2011):1779-87. Por ejemplo, el ocrelizumab se puede usar para tratar enfermedades tales como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y el lupus.

En algunos casos, se administra ocrelizumab como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada infusión proporciona aproximadamente 50-2000 mg (p. ej., aproximadamente 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900, o 1900-2000 mg) de ocrelizumab.

En algunos casos, se administra ocrelizumab en un intervalo de dosificaciones de al menos 7 días, p. ej., 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, se administra ocrelizumab en un intervalo de dosificaciones de al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 20, 22, 24, 26, 28, 30 semanas o más.

En algunos casos, se administra ocrelizumab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un periodo de tiempo, p. ej., al menos 2 semanas, p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o 1, 2, 3, 4, 5 años o más. Por ejemplo, se administra ocrelizumab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un total de al menos 4 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD20 comprende veltuzumab. Veltuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra CD20. Véase, por ejemplo, Identificador de ensayo clínico núm. NCT00547066, NCT00546793, NCT01101581 y Goldenberg et al. Leuk Lymphoma. 51 (5) (2010): 747-55. Por ejemplo, se puede usar veltuzumab para tratar LNH (p. ej., LDLBG, linfoma folicular), LLC y enfermedades autoinmunitarias tales como la púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI).

En algunos casos, se administra veltuzumab por vía subcutánea o intravenosa, p. ej., como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, veltuzumab se administra a una dosis de 50-800 mg/m^2, por ejemplo, aproximadamente 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250, 250-275, 275-300, 300-325, 325-350, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475, 475-500, 500-525, 525-550, 550-575, 575-600, 600-625, 625-650, 650-675, 675-700, 700-725, 725-750, 750-775, o 775-800 mg/m^2. En algunos casos, se administra una dosis de 50-400 mg, p. ej., 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 o 400 mg de veltuzumab.

En algunos casos, se administra veltuzumab en un intervalo de dosificaciones de al menos 7 días, p. ej., 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, se administra veltuzumab en un intervalo de dosificaciones de al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 20, 22, 24, 26, 28, 30 semanas o más.

En algunos casos, se administra veltuzumab a una dosis y un intervalo de dosificación descritos en el presente documento durante un periodo de tiempo, p. ej., al menos 2 semanas, p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o 1, 2, 3, 4, 5 años o más. Por ejemplo, se administra veltuzumab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un total de al menos 4 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD20 comprende GA101. GA101 (también denominado obinutuzumab o RO5072759) es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado y gluco-manipulado. Por ejemplo, se puede usar GA101 para tratar enfermedades tales como neoplasias malignas linfoides de linfocitos B, p. ej., LLC, linfoma no hodgkiniano (LNH) y linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG). Véase, p. ej., Robak. Curr. Opin. Investig. Drugs. 10.6(2009):588-96; Números de identificación de ensayos clínicos: NCT01995669, NCT01889797, NCT02229422 y NCT01414205; y

www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s000lbl.pdf.

En algunos casos, se administra GA101 por vía intravenosa, p. ej., como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada infusión proporciona aproximadamente 100-3000 mg (p. ej., aproximadamente 100-150, 150-200, 200-250, 250-500, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1200, 1200-1400, 1400-1600, 1600-1800, 1800-2000, 2000-2200, 2200-2400, 2400-2600, 2600-2800, o 2800-3000 mg) de GA101.

En algunos casos, se administra GA101 con un intervalo de dosificaciones de al menos 7 días, p. ej., 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, se administra GA101 en un intervalo de dosificaciones de al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 20, 22, 24, 26, 28, 30 semanas o más. Por ejemplo, se administra GA101 en un intervalo de dosificaciones de al menos 1 mes, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses. En algunos casos, se administra GA101 en un intervalo de dosificaciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días.

En algunos casos, se administra GA101 a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un periodo de tiempo, p. ej., al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o 1, 2, 3, 4, 5 años o más. Por ejemplo, se administra GA101 a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un total de al menos 2 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD20 comprende AME-133v. El AME-133v (también denominado LY2469298 u ocaratuzumab) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado contra CD20 con mayor afinidad por el receptor FcγRIIIa y una actividad de citotoxicidad celular potenciada dependiente de anticuerpos (ADCC) en comparación con rituximab. Véase, p. ej., Robak et al. BioDrugs 25.1(2011): 13-25. En algunos casos, se puede usar AME-133v para tratar cánceres tales como LNH, p. ej., linfoma folicular. Véase, por ejemplo, Forero-Torres et al. Clin. Cancer Res. 18.5(2012):1395-403.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD20 comprende PRO131921. El PRO131921 es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado manipulado para tener una mejor unión a FcγRIIIa y ADCC potenciada en comparación con rituximab. Véase, p. ej., Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25; y Casulo et al. Clin Immunol. 154.1(2014):37-46. En algunos casos, se puede usar PRO131921 para tratar el LNH. Véase, p. ej., el identificador

de ensayo clínico n.º NCT00452127. En algunos casos, se administra PRO131921 por vía intravenosa, p. ej., como una infusión intravenosa. En algunos casos, PRO131921 se administra a una dosis de 15 mg/m^2 a 1000 mg/m^2, por ejemplo, aproximadamente 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-100, 100-125, 125-150, 150-175, 175-200, 200-226, 225-250, 250-300, 300-325, 325-350, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475, 475-500, 500-525, 525-550, 550-575, 575-600, 600-625, 625-650, 650-675, 675-700, 700-725, 725-750, 750-775, 775-800, 800-825, 825-850, 850-875, 875-900, 900-925, 925-950, 950-975, o 975-1000 mg/m^2, en la que m^2 indica el área de superficie corporal del sujeto.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD20 comprende TRU-015. El TRU-015 es una proteína de fusión anti-CD20 derivada de dominios de un anticuerpo contra CD20. El TRU-015 es más pequeño que los anticuerpos monoclonales, pero conserva las funciones efectoras mediadas por Fc. Véase, p. ej., Robak et al. BioDrugs 25.1(2011): 13-25. TRU-015 contiene un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-CD20 vinculado a los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana, pero carece de los dominios CH1 y CL. En algunos casos, se puede usar TRU-015 para tratar linfomas de linfocitos B y artritis reumatoide. En algunos casos, se administra TRU-015 por vía intravenosa, p. ej., como una infusión intravenosa. En algunos casos, se administra TRU-015 a una dosis de 0,01-30 mg/kg, p. ej., 0,01-0,015, 0,015-0,05, 0,05-0,15, 0,15-0,5, 0,5-1, 1-1,5, 1,5-2,5, 2,5-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25 o 25-30 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, se administra TRU-015 en un intervalo de dosificaciones de al menos 1 día, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días de diferencia. Véase, por ejemplo, Burge et al. Clin Ther. 30.10(2008):1806-16.

En algunos casos, un anticuerpo anti-CD20 descrito en el presente documento se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico, p. ej., un agente quimioterapéutico (p. ej., citoxano, fludarabina, inhibidor de histona desacetilasa, agente desmetilante, vacuna peptídica, antibiótico antitumoral, inhibidor de tirosina cinasa, agente alquilante, agente antimicrotubular o antimitótico, anticuerpo de CD20 o conjugado de fármaco de anticuerpo de CD20 descrito en el presente documento), agente antialérgico, agente contra las náuseas (o antiemético), analgésico o agente citoprotector descrito en el presente documento.

Inhibidores de CD22 y dominios de unión

Como se utiliza en el presente documento, el término "CD22" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células precursoras de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1-5 de CD22 humano se pueden encontrar en los n.º de referencia NP 001762.2, NP 001172028.1, NP 001172029.1, NP 001172030.1 y NP 001265346.1, respectivamente, y la secuencia de nucleótidos que codifica las variantes 1-5 del CD22 humano se puede encontrar en los n.º de referencia NM 001771.3, NM 001185099.1, NM 001185100.1, NM 001185101.1 y NM 001278417.1, respectivamente. Como se utiliza en este documento, "CD22" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del CD22 de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD22. En un aspecto, la proteína CD22 se expresa en una célula cancerosa.

En algunos aspectos, la presente divulgación se refiere a un inhibidor de CD22 o un dominio de unión, por ejemplo, un inhibidor de CD22 o un dominio de unión como se describe en este documento. La divulgación también se refiere a un ácido nucleico que codifica el dominio de unión a CD22, o un CAR que comprende el dominio de unión a CD22. La invención proporciona un CAR y una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. Un inhibidor de CD22 incluye, pero sin limitación, una célula que expresa CAR CD22, p. ej., un linfocito CART CD22 o un anticuerpo anti-CD22 (p. ej., un anticuerpo anti-CD22 mono o biespecífico) o un fragmento del mismo. La invención proporciona una célula o población de células que comprende una molécula de ácido nucleico o CAR como se define en las reivindicaciones. La composición también puede comprender un segundo agente, p. ej., una célula que expresa CAR anti-CD19 o un dominio de unión a CD19. Los agentes pueden estar, p. ej., codificados por un solo ácido nucleico o diferentes ácidos nucleicos.

En algunos aspectos, un inhibidor de CD22 o un dominio de unión se administra como monoterapia. En algunos aspectos, el inhibidor de CD22 o dominio de unión se administra en combinación con un segundo agente tal como una célula que expresa CAR anti-CD19. En una realización, el inhibidor de CD22 se administra en combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

Células que expresan CAR CD22, p. ej., CART

En una realización, el inhibidor de CD22 es una célula que expresa CAR CD22 de acuerdo con las reivindicaciones, por ejemplo, un CD22-CAR que comprende un dominio de unión a CD22 y está diseñado en una célula (por ejemplo, célula T o célula NK) para su administración en combinación con una célula que expresa CAR CD19, por ejemplo, CART, y su uso para terapia adoptiva.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD22 de acuerdo con las reivindicaciones. Por ejemplo, en una realización, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR CD22. En una realización, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR (p. ej., un CAR CD19 o un CAR CD22) que incluye un dominio de señalización intracelular primario, y una segunda célula que expresa un CAR (p. ej., un CAR CD19 o un CAR CD22) que incluye un dominio de señalización secundario.

En un aspecto, el CAR-CD22 comprende una secuencia líder opcional (p. ej., una secuencia líder opcional descrita en el presente documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra (p. ej., bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (p. ej., dominio transmembrana descrito en el presente documento) y un dominio estimulante intracelular (p. ej., dominio estimulante intracelular descrito en el presente documento). En un aspecto, una construcción de CAR CD22 ilustrativa comprende una secuencia líder opcional (p. ej., una secuencia líder descrita en el presente documento), un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembrana, un dominio coestimulante intracelular (p. ej., un dominio coestimulante intracelular descrito en el presente documento) y un dominio estimulante intracelular.

Los dominios de unión de CAR22 pueden comprender la porción scFv de una secuencia de aminoácidos (o codificada por una secuencia de nucleótidos) proporcionada en cualquiera de las SEQ ID NO: 200-428. En un aspecto, el dominio de unión de CAR22 comprende la porción scFv proporcionada en cualquiera de SEQ ID NOs: 203, 209, 215, 221, 227, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364, 370, 376, 382, 388, 394, 400, 406, 412, 418, o 423. En la invención, el dominio de unión a CD22 está de acuerdo con las reivindicaciones.

Una construcción CAR de la divulgación puede comprender un dominio scFv seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 203, 209, 215, 221, 227, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364, 370, 376, 382, 388, 394, 400, 406, 412, 418, o 423,, en la que el scFv puede estar precedido por una secuencia líder opcional tal como la proporcionada en SEQ ID NO: 13 y seguido por una secuencia de bisagra opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49, una región transmembrana tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 51 y una secuencia CD3 zeta que incluye la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 43, p. ej., en donde los dominios son contiguos y están en el mismo marco de lectura para formar una única proteína de fusión. En algunos casos de la divulgación, el dominio scFv es un dominio scFv humano seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 203, 209, 215, 221, 227, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364, 370, 376, 382, 388, 394, 400, 406, 412, 418, o 423. En la invención, el dominio de unión a CD22 está de acuerdo con las reivindicaciones.

También se incluye en la divulgación una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cada uno de los fragmentos scFv seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 203, 209, 215, 221, 227, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364, 370, 376, 382, 388, 394, 400, 406, 412, 418, o 423. También se incluye en la divulgación una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cada uno de los fragmentos scFv seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 203, 209, 215, 221, 227, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364, 370, 376, 382, 388, 394, 400, 406, 412, 418, o 423, y cada uno de los dominios de SEQ ID NOS: 13-17, más el CAR CD22 codificado de la divulgación. En la invención, el dominio de unión a CD22 está de acuerdo con las reivindicaciones.

Las secuencias CAR CD22 de longitud completa también se divulgan en este documento como SEQ ID NOS: 207, 213, 219, 225, 230, 236, 242, 248, 254, 260, 266, 272, 278, 284, 290, 296, 302, 308, 314, 320, 326, 332, 338, 344, 350, 356, 362, 368, 374, 380, 386, 392, 398, 404, 410, 416, 422, o 427, como se muestra en la Tabla 6A o 6B. En la invención, el CD22 CAR está de acuerdo con las reivindicaciones.

En un aspecto, la presente divulgación abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión a CD22 de acuerdo con las reivindicaciones, por ejemplo, que es contigua y está en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. En un aspecto, la presente invención abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en la que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión a CD22, por ejemplo, en la que la secuencia es contigua y está en el mismo marco de lectura que la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular ilustrativo que puede utilizarse en el CAR incluye, pero sin limitación, uno o más dominios de señalización intracelular de, p. ej., CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares.

La secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR de la divulgación puede comprender la construcción CAR de uno o más de SEQ ID NOS: 200, 208, 214, 220, 226, 231, 237, 243, 249, 255, 261, 267, 273, 279, 285, 291, 297, 303, 309, 315, 321, 327, 333, 339, 345, 351, 357, 363, 369, 375, 381, 387, 393, 399, 405, 411, 417, 422, o 428. La secuencia de ácido nucleico de una construcción CAR de la divulgación puede comprender una secuencia codificante de scFv de uno o más de SEQ ID NOs: 204, 210, 216, 222, 116, 233, 239, 245, 251, 257, 263, 269, 275, 281, 287, 293, 299, 305, 311, 317, 323, 329, 335, 341, 347, 353, 359, 365, 371, 377, 383, 389, 395, 401, 407, 413, 117, o 424. En la invención, el CAR está de acuerdo con las reivindicaciones.

En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión al antígeno se derive de la misma especie en la que finalmente se utilizará el CAR. Por ejemplo, para su uso en seres humanos, puede ser beneficioso que el dominio de unión al antígeno del CAR comprenda residuos humanos o humanizados para el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por lo tanto, en un aspecto, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo humano o un fragmento de anticuerpo. En un caso, el dominio de unión a CD22 humano comprende una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad 1 de cadena ligera (CDR1 LC), región determinante de la complementariedad 2 de cadena ligera (CDR2 LC) y región determinante de la complementariedad 3 de cadena ligera (CDR3 LC) de un dominio de unión a CD22 humano descrito en el presente documento, y/o una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad 1 de cadena pesada (CDR1 HC), región determinante de la complementariedad 2 de cadena pesada (CDR2 HC) y región determinante de la complementariedad 3 de cadena pesada (CDR3 HC) de un dominio de unión a CD22 humano descrito en el presente documento, p. ej., un dominio de unión a CD22 humano que comprende una o más, p. ej., las tres, CDR LC y una o más, p. ej., las tres, CDR HC. En un caso, el dominio de unión a CD22 humano comprende una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad 1 de cadena pesada (CDR1 HC), región determinante de la complementariedad 2 de cadena pesada (CDR2 HC) y región determinante de la complementariedad 3 de cadena pesada (CDR3 HC) de un dominio de unión a CD22 humano descrito en el presente documento, p. ej., el dominio de unión a CD22 humano tiene dos regiones variables de cadena pesada, comprendiendo cada una una CDR1 HC, una CDR2 HC y una CDR3 HC descritas en el presente documento. En un caso, el dominio de unión de CD22 humano comprende una región variable de cadena ligera humana descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 6A, 6B, 10A o 10B) y/o una región variable de cadena pesada humana descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 6A, 6B, 9A o 9B). En un caso, el dominio de unión de CD22 humano comprende una región variable de cadena pesada humana descrita en este documento (por ejemplo, en la Tabla 6A, 6B, 9A o 9B), por ejemplo, al menos dos regiones variables de cadena pesada humana descritas en este documento (por ejemplo, en la Tabla 6A, 8B, 9A o 9B). En un caso, el dominio de unión de CD22 es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 6A, 6B, 9A, 9B, 10A o 10B. En un caso, el dominio de unión de CD22 (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 6A, 6B, 10A o 10B, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 6A, 6B, 10A o 10B; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 6A, 6B, 9A o 9B, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 6A, 6B, 9A o 9B. En un caso, el dominio de unión a CD22 humana comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 203, 209, 215, 221, 227, 232, 238, 244, 250, 256, 262, 268, 274, 280, 286, 292, 298, 304, 310, 316, 322, 328, 334, 340, 346, 352, 358, 364, 370, 376, 382, 388, 394, 400, 406, 412, 418, o 423, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con la misma. En un caso, el dominio de unión de CD22 humano es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 6A, 6B, 10A o 10B, está unida a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en este documento, por ejemplo, en la Tabla 6A, 6B, 9A o 9B, a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador descrito en este documento. En la invención, el dominio de unión a CD22 comprende: (i) una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1) TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 648), una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) DVSNRPS (SEQ ID NO: 659), y una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 670); y (ii) una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1) GDSMLSNSDTWN (SEQ ID NO: 498) o SNSDTWN (SEQ ID NO: 1345), una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 509) o RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 1354), y una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 520) o VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 1363). En una realización, el dominio de unión de CD22 comprende una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 690 o una secuencia con una identidad de secuencia del 95-99% con la misma y una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 680 o una secuencia con una identidad de secuencia del 95-99% con la misma.

En una realización, el dominio de unión a CD22 humano incluye un conector $(Gly_4\text{-}Ser)n$, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, p. ej., 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de

un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador-región variable de cadena ligera.

En un aspecto, el dominio de unión a CD22 se caracteriza por características o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, en un aspecto, la porción de una composición de CAR de la invención que comprende un dominio de unión a antígeno se une específicamente a CD22 humano o un fragmento del mismo. En determinados aspectos, el scFv es contiguo y está en el mismo marco de lectura que una secuencia líder. En un aspecto, la secuencia líder es la secuencia polipeptídica proporcionada como la SEQ ID NO: 13.

En la invención, el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD22, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En los casos de la divulgación, el dominio de unión de CD22 comprende una o más de la región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1), la región determinante de complementariedadde cadena ligera 2 (LC CDR2) y la región determinante de complementariedadde cadena ligera 3 (LC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera de CD22 enumerada en la Tabla 8A, 8B, 10A o 10B, y una o más de la región determinante de complementariedadde cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante de complementariedadde cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante de complementariedadde cadena pesada 3 (HC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada de CD22 enumerada en la Tabla 7A, 7B, 7C, 9A o 9B. En la invención, el dominio de unión a CD22 está de acuerdo con las reivindicaciones.

En un aspecto, el dominio de unión a CD22 es un fragmento, p. ej., un fragmento variable monocatenario (scFv). En un aspecto, el dominio de unión de CD22 es un Fv, un Fab, un (Fab')2 o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico) (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos que se utilizan en la invención se unen a una proteína CD22 o un fragmento de la misma con afinidad de tipo salvaje o mejorada.

En algunos casos, un scFv humano puede obtenerse de una biblioteca de presentación.

En una realización, el dominio de unión a CD22, por ejemplo, scFv, comprende al menos una mutación de modo que el scFv mutado confiere una mejora de la estabilidad a la construcción de CART22. En otra realización, el dominio de unión a CD22, p. ej., scFv, comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones que surgen, p. ej., del proceso de humanización, de modo que el scFv mutado confiere una mejora de la estabilidad a la construcción de CART22.

En un aspecto, la presente invención contempla modificaciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento (p. ej., scFv) de partida que generan moléculas funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, el VH o VL de un dominio de unión CD22, p. ej., scFv, comprendido en el CAR puede modificarse para conservar al menos aproximadamente el 70 %, 71 %. 72%. 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%,81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de la región marco conservada inicial de VH o VL del dominio de unión a CD22, p. ej., scFv. La presente invención contempla modificaciones de la construcción de CAR completa, p. ej., modificaciones en una o más secuencias de aminoácidos de los diversos dominios de la construcción de CAR con el fin de generar moléculas funcionalmente equivalentes. La construcción de CAR se puede modificar para mantener una identidad de al menos aproximadamente un 70 %, 71 %, 72%. 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de la construcción de CAR inicial.

Un dominio de unión a CD22 puede comprender seis CDR (por ejemplo, una de cada una de una HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3) de cualquiera de CAR22-1, CAR22-2, CAR22-3, CAR22-4, CAR22-5, CAR22-6, CAR22-7, CAR22-8, CAR22-9, CAR22-10, CAR22-11, CAR22-12, CAR22-13, CAR22-14, CAR22-15 o CAR22-16, CAR22-17, CAR22-18, CAR22-19, CAR22-20, CAR22-21, CAR22-22, CAR22-23, CAR22-24, CAR22-25, CAR22-26, CAR22-27, CAR22-28, CAR22-29, CAR22-30, CAR22-31, CAR22-32, CAR22-33, CAR22-34, CAR22-35, CAR22-36, CAR22-37 o CAR22-38 (por ejemplo, como se describe en la Tabla 7A, 7B, 7C, 8A y/o 8B), o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. Un dominio de unión a CD22 puede comprender tres CDR (por ejemplo, una de cada una de un HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3, o una de cada una de una LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3) de cualquiera de CAR22-1, CAR22-2, CAR22-3, CAR22-4, CAR22-5, CAR22-6, CAR22-7, CAR22-8, CAR22-9, CAR22-10, CAR22-11, CAR22-12, CAR22-13, CAR22-14, CAR22-15 o CAR22-16, CAR22-17, CAR22-18, CAR22-19, CAR22-20, CAR22-21, CAR22-22, CAR22-23, CAR22-24, CAR22-25, CAR22-26, CAR22-27, CAR22-28, CAR22-29, CAR22-30, CAR22-31, CAR22-32, CAR22-33, CAR22-34, CAR22-35, CAR22-36, CAR22-37 o CAR22-38 (por ejemplo, como se describe en la Tabla 7A, 7B, 7C, 8A y/o 8B), o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En la invención, el dominio de unión a CD22 está de acuerdo con las reivindicaciones.

Otros casos incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido descrito en esta sección. Por ejemplo, otros casos incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de cualquiera de las **tablas 6A-10B.** Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos puede comprender una construcción CAR o scFv de la Tabla 6A o 6B. El nucleótido puede codificar un VH de la Tabla 9A o 9B, un VL de la Tabla 10A o 10B, o ambos. El nucleótido puede codificar una o más de (por ejemplo, dos o tres de) una VH CDR1, VH CDR2 o VH CDR3 de la Tabla 7A, 7B o 7C y/o el nucleótido puede codificar una o más de (por ejemplo, dos o tres de) una VL CDR1, VL CDR2 o VL CDR3 de la Tabla 8A o 8B. La secuencia de nucleótidos también puede incluir uno o más de, p. ej., todos los dominios de las SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17 y 51. La invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con las reivindicaciones.

El CAR CD22 también puede comprender uno o más de un dominio transmembrana, p. ej., un dominio transmembrana como se describe en el presente documento, un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización intracelular como se describe en el presente documento, un dominio coestimulante, p. ej., un dominio coestimulante como se describe en el presente documento, una secuencia líder, p. ej., una secuencia líder como se describe en el presente documento, o una bisagra, p. ej., una bisagra como se describe en el presente documento.

En un caso de la divulgación, el inhibidor de CD22 es un inhibidor de CD22 descrito en este documento. El inhibidor de CD22 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD22 (por ejemplo, un anticuerpo mono o biespecífico anti-CD22), una molécula pequeña o un CART CD22. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD22 se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico. Los agentes terapéuticos ejemplares incluyen, por ejemplo, agentes disruptores en microtúbulos (por ejemplo, monometil auristatina E) y toxinas (por ejemplo, toxina de la difteria o exotoxina A de Pseudomonas, ricina). En un caso, el inhibidor de CD22 se administra en combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

En un caso, el anticuerpo anti-CD22 se selecciona de una toxina dirigida por ligando biespecífico anti-CD19/CD22 (p. ej., dos ligandos scFv, que reconocen CD19 y CD22 humanos, unidos a los primeros 389 aminoácidos de la toxina diftérica (TD), TD 390, p. ej., DT2219ARL); conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22-MMAE (p. ej., DCDT2980S); scFv de un anticuerpo RFB4 anti-CD22 fusionado con un fragmento de exotoxina A de Pseudomonas (p. ej., BL22); anti-CD19/anti-CD22 conjugado con cadena de ricina A desglucosilada (p. ej., Combotox); anticuerpo monoclonal anti-CD22 humanizado (p. ej., epratuzumab); o la porción Fv de un anticuerpo anti-CD22 fusionado covalentemente con un fragmento de 38 KDa de exotoxina A de Pseudomonas (p. ej., moxetumomab pasudotox).

En un caso, el anticuerpo anti-CD22 es una toxina dirigida a un ligando biespecífico anti-CD19/CD22 (p. ej., DT2219ARL) y la toxina dirigida a un ligando biespecífico anti-CD19/CD22 se administra en una dosis de aproximadamente 1 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 6 µg/kg, 7 µg/kg, 8 µg/kg, 9 µg/kg, 10 µg/kg, 11 µg/kg, 12 µg/kg, 13 µg/kg, 14 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg, 60 µg/kg, 80 µg/kg, 100 µg/kg, 120 µg/kg, 140 µg/kg, 160 µg/kg, 180 µg/kg, 200 µg/kg, 220 µg/kg, 250 µg/kg, 300 µg/kg, 350 µg/kg, 400 µg/kg, 450 µg/kg, 500 µg/kg, 600 µg/kg, 700 µg/kg, 800 µg/kg, 900 µg/kg, 1 mg.kg (por ejemplo, 30 µg/kg, 40 µg/kg, 60 µg/kg o 80 µg/kg) durante un período de tiempo, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más días. En algunos casos, la toxina dirigida por ligando biespecífico anti-CD19/CD22 se administra mediante infusión intravenosa.

En un caso, el anticuerpo anti-CD22 es BL22 y BL22 se administra a una dosis de aproximadamente 1 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 6 µg/kg, 7 µg/kg, 8 µg/kg, 9 µg/kg, 10 µg/kg, 11 µg/kg, 12 µg/kg, 13 µg/kg, 14 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg, 60 µg/kg, 80 µg/kg, 100 µg/kg, 120 µg/kg, 140 µg/kg, 160 µg/kg, 180 µg/kg, 200 µg/kg, 220 µg/kg, 250 µg/kg, 300 µg/kg, 350 µg/kg, 400 µg/kg, 450 µg/kg, 500 µg/kg, 600 µg/kg, 700 µg/kg, 800 µg/kg, 900 µg/kg, 1 mg.kg (p. ej., 3 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg o 50 µg/kg) durante un periodo de tiempo, p. ej., cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más días. En algunos casos, BL22 se administra diariamente, cada dos días, cada tres días o cada cuatro días durante un periodo de tiempo, p. ej., durante un ciclo de 4 días, un ciclo de 6 días, un ciclo de 8 días, un ciclo de 10 días, un ciclo de 12 días o un ciclo de 14 días. En un caso, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de BL22. En algunos casos, se administra BL22 mediante infusión intravenosa.

En un caso, el anticuerpo anti-CD22 es un anti-CD19/anti-CD22 conjugado con cadena de ricina A desglicosilada (p. ej., Combotox) y el anti-CD19/anti-CD22 conjugado con cadena de ricina A desglicosilada se administra en una dosis de aproximadamente 500 µg/m^2 600 µg/m^2, 700 µg/m^2, 800 µg/m^2, 900 µg/m^2, 1 mg/m^2, 2 mg/m^2, 3 mg/m^2, 4 mg/m^2, 5 mg/m^2, 6 mg/m^2, o 7 mg/m^2 durante un período de tiempo, p. ej., cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o más días. En algunos casos, el anti-CD19/anti-CD22 conjugado con la cadena A de ricina desglucosilada se administra diariamente, cada dos días, cada tres días o cada cuatro días durante un periodo de tiempo, p. ej., durante un ciclo de 4 días, un ciclo de 6 días, un ciclo de 8 días, un ciclo de 10 días, un ciclo de 12 días o un ciclo de 14 días (p. ej., cada dos días durante 6 días). En un caso, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o

más ciclos de anti-CD19/anti-CD22 conjugado con la cadena A de ricina desglucosilada. En algunos casos, el anti-CD19/anti-CD22 conjugado con cadena A de ricina desglucosilada se administra mediante infusión intravenosa.

En un caso, el anticuerpo anti-CD22 es un anticuerpo monoclonal anti-CD22 humanizado (p. ej., epratuzumab) y el anticuerpo monoclonal anti-CD22 humanizado se administra en una dosis de aproximadamente 10 mg/m^2/semana, 20 mg/m^2/semana, 50 mg/m^2/semana, 100 mg/m^2/semana, 120 mg/m^2/semana, 140 mg/m^2/semana, 160 mg/m^2/semana, 180 mg/m^2/semana, 200 mg/m^2/semana, 220 mg/m^2/semana, 250 mg/m^2/semana, 260 mg/m^2/semana, 270 mg/m^2/semana, 280 mg/m^2/semana, 290 mg/m^2/semana, 300 mg/m^2/semana, 305 mg/m^2/semana, 310 mg/m^2/semana, 320 mg/m^2/semana, 325 mg/m^2/semana, 330 mg/m^2/semana, 335 mg/m^2/semana, 340 mg/m^2/semana, 345 mg/m^2/semana, 350 mg/m^2/semana, 355 mg/m^2/semana, 360 mg/m^2/semana, 365 mg/m^2/semana, 370 mg/m^2/semana, 375 mg/m^2/semana, 380 mg/m^2/semana, 385 mg/m^2/semana, 390 mg/m^2/semana, 400 mg/m^2/semana, 410 mg/m^2/semana, 420 mg/m^2/semana, 430 mg/m^2/semana, 440 mg/m^2/semana, 450 mg/m^2/semana, 460 mg/m^2/semana, 470 mg/m^2/semana, 480 mg/m^2/semana, 490 mg/m^2/semana, 500 mg/m^2/semana, 600 mg/m^2/semana, 700 mg/m^2/semana, 800 mg/m^2/semana, 900 mg/m^2/semana, 1 g/m^2/semana, o 2 g/m^2/semana (p. ej., 360 mg/m^2/semana o 480 mg/m^2/semana) durante un período de tiempo, p. ej., cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más semanas. En algunos casos, una primera dosis es más baja que las dosis posteriores (p. ej., una primera dosis de 360 mg/m^2/semana seguido de dosis posteriores de 370 mg/m^2/semana). En algunos casos, el anticuerpo monoclonal anti-CD22 humanizado se administra mediante infusión intravenosa.

En un caso, el anticuerpo anti-CD22 es moxetumomab pasudotox y moxetumomab pasudotox se administra en una dosis de aproximadamente 1 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 6 µg/kg, 7 µg/kg, 8 µg/kg, 9 µg/kg, 10 µg/kg, 11 µg/kg, 12 µg/kg, 13 µg/kg, 14 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg, 60 µg/kg, 80 µg/kg, 100 µg/kg, 120 µg/kg, 140 µg/kg, 160 µg/kg, 180 µg/kg, 200 µg/kg, 220 µg/kg, 250 µg/kg, 300 µg/kg, 350 µg/kg, 400 µg/kg, 450 µg/kg, 500 µg/kg (por ejemplo, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 20 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg o 50 µg/kg) un período de tiempo, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más días. En algunos casos, el moxetumomab pasudotox se administra se administra diariamente, cada dos días, cada tres días o cada cuatro días durante un periodo de tiempo, p. ej., durante un ciclo de 4 días, un ciclo de 6 días, un ciclo de 8 días, un ciclo de 10 días, un ciclo de 12 días o un ciclo de 14 días (p. ej., cada dos días durante 6 días). En un caso, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos del moxetumomab pasudotox. En algunos casos, el moxetumomab pasudotox se administra mediante infusión intravenosa.

En un caso, una molécula de anticuerpo CD22 comprende seis CDR (por ejemplo, una de cada una de las siguientes: CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC) de cualquiera de CAR22-1, CAR22-2, CAR22-3, CAR22-4, CAR22-5, CAR22-6, CAR22-7, CAR22-8, CAR22-9, CAR22-10, CAR22-11, CAR22-12, CAR22-13, CAR22-14, CAR22-15 o CAR22-16, CAR22-17, CAR22-18, CAR22-19, CAR22-20, CAR22-21, CAR22-22, CAR22-23, CAR22-24, CAR22-25, CAR22-26, CAR22-27, CAR22-28, CAR22-29, CAR22-30, CAR22-31, CAR22-32, CAR22-33, CAR22-34, CAR22-35, CAR22-36, CAR22-37 o CAR22-38 (por ejemplo, como se describe en la Tabla 7A, 7B, 7C, 8A y/o 8B), o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En un caso, una molécula de anticuerpo CD22 comprende tres CDR (por ejemplo, una de cada una de las siguientes: CDR1 de HC, CDR2 de HC y CDR3 de HC, o una de cada una de las siguientes: CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC) de cualquiera de CAR22-1, CAR22-2, CAR22-3, CAR22-4, CAR22-5, CAR22-6, CAR22-7, CAR22-8, CAR22-9, CAR22-10, CAR22-11, CAR22-12, CAR22-13, CAR22-14, CAR22-15 o CAR22-16, CAR22-17, CAR22-18, CAR22-19, CAR22-20, CAR22-21, CAR22-22, CAR22-23, CAR22-24, CAR22-25, CAR22-26, CAR22-27, CAR22-28, CAR22-29, CAR22-30, CAR22-31, CAR22-32, CAR22-33, CAR22-34, CAR22-35, CAR22-36, CAR22-37 o CAR22-38 (por ejemplo, como se describe en la Tabla 7A, 7B, 7C, 8A y/o 8B), o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En un caso, una molécula de anticuerpo CD22 comprende una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, o ambas, una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, o un scFv, como se describe en la Tabla 6A o 6B, o una secuencia sustancialmente idéntica a la misma. En algunos casos, la molécula de anticuerpo de CD22 es una molécula de anticuerpo aislada.

Inhibidores de ROR1

Como se utiliza en el presente documento, el término "ROR1" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células precursoras de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1 y 2 precursoras de ROR1 humano se pueden encontrar en los n.º de referencia NP_005003.2 y NP_001077061.1, respectivamente, y las secuencias de ARNm que las codifican se pueden encontrar en los n.º de referencia NM_005012.3 y NM_001083592.1, respectivamente. Como se utiliza en este documento, "ROR1" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del ROR1 de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína ROR1. En un aspecto, la proteína ROR1 se expresa en una célula cancerosa.

También se describen en este documento inhibidores de ROR1 y terapias combinadas. Los inhibidores de ROR1 incluyen, pero sin limitación, células que expresan CAR anti-ROR1, p. ej., CART y anticuerpos anti-ROR (p. ej., un

anticuerpo monoespecífico o biespecífico anti-ROR1) y fragmentos de los mismos. En algunos casos, los inhibidores anti-ROR1 se pueden utilizar para tratar neoplasias malignas de células B (por ejemplo, leucemias, como la LLC, y linfomas de células B, como el linfoma de células del manto, LLA, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células B de células marginales y linfoma de Burkett) o cánceres epiteliales (por ejemplo, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón, cánceres colorrectales, cáncer de ovario y melanoma). En un caso, el inhibidor de CD20 se administra en combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

Un inhibidor anti-ROR1 ejemplar se describe en Hudecek, et al. Clin. Cancer Res. 19.12(2013):3153-64. Por ejemplo, un inhibidor anti-ROR1 incluye los CART anti-ROR1 descritos en Hudecek et al. (por ejemplo, generado como se describe en Hudecek et al. en la página 3155, primer párrafo completo). En otros ejemplos, un inhibidor anti-ROR1 incluye un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende las secuencias VH y/o VL de los anticuerpos monoclonales anti-ROR1 2A2 y R12 descritos en Hudecek et al. en el párrafo que une las páginas 3154-55; Baskar et al. MAbs 4(2012):349-61; y Yang et al. PLoS ONE 6(2011):e21018.

En otros casos, un inhibidor de ROR1 incluye un anticuerpo o fragmento del mismo (por ejemplo, fragmento variable de cadena única (scFv)) que se dirige a ROR1, incluidos los descritos en el documento US 2013/0101607, por ejemplo, SEQ ID NOs: 1 o 2 del documento US 2013/0101607. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpos anti-ROR1 (por ejemplo, scFv) se conjugan o fusionan a una molécula biológicamente activa, por ejemplo, para formar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que dirige a las células inmunes, por ejemplo, las células T, para responder a las células que expresan ROR1.

En algunos casos, un inhibidor de ROR1 ejemplar incluye un anticuerpo monoclonal anti-ROR1 denominado UC-961 (Cirmtuzumab). Véase, p. ej., el identificador de ensayo clínico n.º NCT02222688. El cirmtuzumab se puede usar para tratar cánceres, tales como la leucemia linfocítica crónica (LLC), el cáncer de ovario y el melanoma. Véase, por ejemplo, Hojjat-Farsangi et al. PLoS One. 8(4): e61167; y NCT02222688.

En algunos casos, cirmtuzumab se administra por vía intravenosa, por ejemplo, como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada infusión proporciona aproximadamente 700-7000 µg (p. ej., 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1500, 1500-2000, 2000-2500, 2500-3000, 3000-3500, 3500-4000, 4000-4500, 4500-5000, 5000-5500, 5500-6000, 6000-6500 o 6500-7000 µg) de cirmtuzumab. En otros casos, cirmtuzumab se administra en una dosis de 10-100 µg/kg de peso corporal, por ejemplo, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95, o 95-100 µg/kg de peso corporal. En un caso, se administra cirmtuzumab en una dosis inicial de 15 µg/kg de peso corporal.

En algunos casos, cirmtuzumab se administra en un intervalo de dosificación de al menos 7 días, por ejemplo, 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, se administra cirmtuzumab en un intervalo de dosificaciones de al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 20, 22, 24, 26, 28, 30 semanas o más.

En algunas realizaciones, se administra cirmtuzumab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en esta memoria durante un periodo de tiempo, p. ej., al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o 1, 2, 3, 4, 5 años o más. Por ejemplo, se administra cirmtuzumab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un total de al menos 2 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos casos, el anticuerpo anti-ROR1 se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico.

En algunos casos, un inhibidor de ROR1 incluye una célula que expresa CAR anti-ROR1, p. ej., CART, p. ej., una célula que expresa una construcción de CAR anti-ROR1 o codificada por un CAR de unión a ROR1 que comprende un scFv, CDR o cadenas VH y VL. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-ROR1, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-ROR1 (que comprende un dominio de unión a ROR1) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

También se describe en este documento una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR ROR1. Por ejemplo, en un caso, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR ROR1.

Inhibidores de CD123

CD123 también se denomina cadena alfa del receptor de interleucina-3 (IL-3RA). El receptor de IL-3 (IL-3R) es un heterodímero compuesto por cadenas alfa y beta. IL-3R es un receptor de membrana. La cadena IL-3Rα es una

glucoproteína de 360 residuos de aminoácidos. Con frecuencia se observan anomalías de CD123 en algunos trastornos leucémicos. CD123 se sobreexpresa en múltiples neoplasias hemáticas malignas, p. ej., leucemias linfoides B y mieloides agudas, neoplasias dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN) y tricoleucemia.

Como se utiliza en el presente documento, el término "CD123" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células de cáncer hemático maligno, p. ej., células de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de CD123 humano se pueden encontrar en los n.º de referencia NP_002174.1 (precursor de isoforma 1); NP_001254642.1 (precursor de isoforma 2), y las secuencias de ARNm que las codifican se pueden encontrar en los n.º de referencia NM_002183.3 (variante 1) y NM_001267713.1 (variante 2). Como se usa en el presente documento, "CD123" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, eliminaciones y variantes de corte y empalme de CD 123 de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD123. En un aspecto, la proteína CD123 se expresa en una célula cancerosa.

En el presente documento se desvelan inhibidores de CD123 y terapias combinadas. Los inhibidores de CD123 incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas recombinantes, células que expresan CAR anti-CD123, p. ej., CART y anticuerpos anti-CD123 (p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico anti-CD123) y fragmentos de los mismos. En algunos casos, los inhibidores anti-CD123 se pueden usar para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B descrita en el presente documento. En un caso, el inhibidor de CD123 se administra en combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

En un caso, el inhibidor de CD123 es una proteína recombinante, p. ej., que comprende el ligando natural (o un fragmento) del receptor de CD123. Por ejemplo, la proteína recombinante es SL-401 (también denominada DT388IL3; Centro Médico del Suroeste de la Universidad de Texas), que es una proteína de fusión que comprende IL-3 humana fusionada con una toxina diftérica truncada. Véase, por ejemplo, Testa et al. Biomark Res. 2014; 2: 4; y el Identificador de Ensayo Clínico n.º NCT00397579.

En otro caso, el inhibidor de CD123 es un anticuerpo anti-CD123 o fragmento del mismo. En un caso, el anticuerpo anti-CD123 o fragmento del mismo comprende un anticuerpo monoclonal, p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o fragmento del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD123 o fragmento del mismo comprende CSL360 (CSL Limited). CSL360 es un anticuerpo monoclonal quimérico recombinante que se une a CD123. En algunos casos, se administra CSL360 por vía intravenosa, p. ej., mediante infusión intravenosa. Por ejemplo, se administra CSL360 a una dosis de 0,1-10 mg/kg, p. ej., 0,1-0,5 mg/kg, 0,5-1 mg/kg, 1-5 mg/kg o 5-10 mg/kg. Véase, p. ej., el identificador de ensayo clínico n.º NCT01632852; y Testa *et al*.

En otro caso, el anticuerpo de CD123 o fragmento del mismo comprende CSL362 (CSL Limited). CSL362 es un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige al CD123 y está optimizado para una activación mejorada de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunos casos, se administra CSL362 por vía intravenosa, p. ej., mediante infusión intravenosa. En algunos ejemplos, se administra CSL362 a una dosis de 0,1-12 mg/kg, p. ej., 0,1-0,2 mg/kg, 0,2-0,5 mg/kg, 0,5-1 mg/kg, 1-6 mg/kg o 6-12 mg/kg. Véase, p. ej., el identificador de ensayo clínico n.º NCT01632852.

En un caso, el anticuerpo de CD123 o fragmento del mismo comprende un anticuerpo biespecífico, p. ej., MGD006 (MacroGenics). MGD006 es un anticuerpo biespecífico que se dirige a CD123 y CD3. Véase, p. ej., el identificador de ensayo clínico n.º NCT02152956.

En algunos casos, el inhibidor de CD123 se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico.

En algunos casos, un inhibidor de CD123 incluye una célula que expresa CAR anti-CD123, p. ej., CART, p. ej., una célula que expresa una construcción de CAR anti-CD123 o codificada por un CAR de unión a CD123 que comprende un scFv, CDR o cadenas VH y VL. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-CD123, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-CD123 (que comprende un dominio de unión a CD123) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. En un caso, la construcción de CAR anti-CD123 comprende una secuencia de scFv, p. ej., una secuencia de scFv proporcionada en el documento US 2014/0322212 A1. En un caso, el dominio de unión anti-CD123 es un scFv descrito en el documento US 2014/0322212 A1. En un caso, el dominio de unión anti-CD123 es parte de una construcción de CAR proporcionada en el documento US 2014/0322212 A1. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

En otro aspecto, se describe aquí una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD123. Por ejemplo, en un caso, la población

de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR CD123.

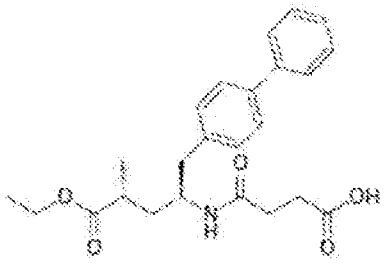
Inhibidores de CD10

El grupo de diferenciación 10 (CD10) también se denomina neprilisina, metaloendopeptidasa de membrana (MME), endopeptidasa neutra (NEP) y antígeno de leucemia linfoblástica aguda común (CALLA). CD10 es una enzima codificada por el gen de la metaloendopeptidasa de membrana (MME). CD10 se expresa en células leucémicas de fenotipo pre-B y es un antígeno común de leucemia linfocítica aguda.

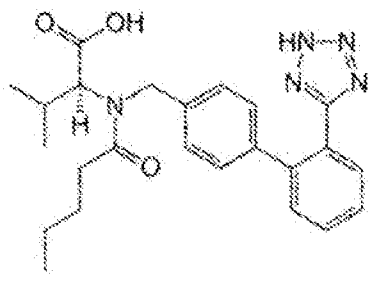
Como se utiliza en el presente documento, el término "CD10" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de CD10 humano se pueden encontrar en los n.º de referencia NP_009218.2; NP_000893.2; NP_009219.2; NP_009220.2 y las secuencias de ARNm que las codifican se pueden encontrar en los n.º de referencia NM_007287.2 (variante 1bis); NM_000902.3 (variante 1); NM_007288.2 (variante 2a); NM_007289.2 (variante 2b). Como se utiliza en este documento, "CD10" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del CD10 de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD10. En un aspecto, la proteína CD10 se expresa en una célula cancerosa.

También se describen en este documento inhibidores de CD10 y terapias combinadas. Los inhibidores de CD10 incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas recombinantes, células que expresan CAR anti-CD10, p. ej., CART y anticuerpos anti-CD10 (p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico anti-CD10) y fragmentos de los mismos. En algunos casos, los inhibidores anti-CD10 se pueden usar para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B descrita en el presente documento. En un caso, el inhibidor de CD10 se administra en combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

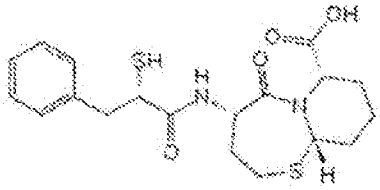
En un caso, el inhibidor de CD10 comprende sacubitrilo (AHU-377; Novartis) (ácido 4-{[(2S,4R)-1-(4-bifenilil)-5-etoxi-4-metil-5-oxo-2-pentanil]amino}-4-oxobutanoico), o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo. La estructura del sacubitrilo se muestra a continuación.



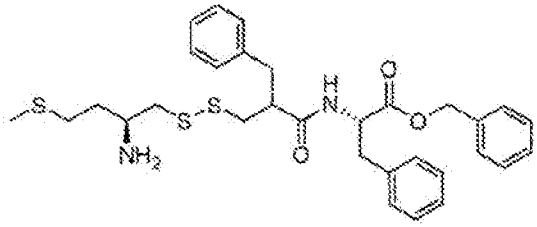
En otro caso, el inhibidor de CD10 comprende valsartán/sacubritril (LCZ696; Novartis) o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo. Valsartán/sacubitrilo es un medicamento combinado que comprende una mezcla 1:1 de valsartán y sacubitrilo. La estructura de valsartán (ácido (*S*)-3-metil-2-(*N*-{[2'-(2*H*-1,2,3,4-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil}pentanamido)butanoico) se muestra a continuación.



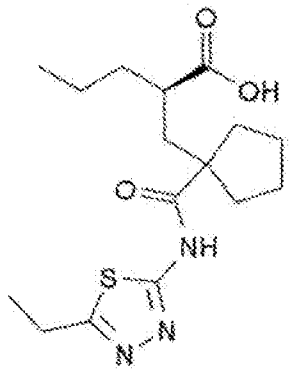
En un caso, el inhibidor de CD10 comprende omapatrilat (Bristol-Myers Squibb) (ácido (4S,7S,10aS)-5-oxo-4-{[(2S)-3-fenil-2-sulfanilpropanoil]amino}-2,3,4,7,8,9,10,10a-octahidropirido[6,1-b][1,3]tiazepina-7-carboxílico), o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo. La estructura del omapatrilat se muestra a continuación.



En un caso, el inhibidor de CD10 comprende RB-101 (N-(3-{[(2S)-2-amino-4-(metiltio)butil]ditio}-2-bencilpropanoil)-L-fenilalaninato de bencilo), o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo. La estructura de RB-101 se muestra a continuación.



En un caso, el inhibidor de CD10 comprende UK-414.495 (Pfizer) (ácido (R)-2-({1-[(5-etil-1,3,4-tiadiazol-2-il)carbamoil]ciclopentil}metil)valérico), o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo. La estructura de UK-414.495 se muestra a continuación.



En algunos casos, el inhibidor de CD10 se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico.

En algunos casos, un inhibidor de CD10 incluye una célula que expresa CAR anti-CD10, p. ej., CART, p. ej., una célula que expresa una construcción de CAR anti-CD10 o codificada por un CAR de unión a CD10 que comprende un scFv, CDR o cadenas VH y VL. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-CD10, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-CD10 (que comprende un dominio de unión a CD10) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

También se describe en este documento una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD10. Por ejemplo, en un caso, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR CD10.

Inhibidores de CD34

El grupo de diferenciación 34 (CD34) también se denomina antígeno de células progenitoras hematopoyéticas CD34 y es una glucoproteína de superficie celular que funciona como factor de adhesión célula-célula. El CD34 se expresa, en ocasiones, en algunos cánceres/tumores, p. ej., sarcoma alveolar de partes blandas, preLLA-B, LMA, LMA-M7, dermatofibrosarcoma protuberante, tumores del estroma gastrointestinal, fibroblastoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Kaposi, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos, hemangiopericitomas meníngeos, meningiomas, neurofibromas, schwannomas y carcinoma papilar de tiroides.

Como se utiliza en el presente documento, el término "CD34" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células madre hematopoyéticas y algunas células cancerosas. Las secuencias de aminoácidos

y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de CD34 humano se pueden encontrar en los n.º de referencia NP_001020280.1 (precursor de isoforma a); NP_001764.1 (precursor de isoforma b), y las secuencias de ARNm que las codifican se pueden encontrar en los n.º de referencia NM_001025109.1 (variante 1) y NM_001773.2 (variante 2). Como se utiliza en este documento, "CD34" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del CD34 de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD34. En un aspecto, la proteína CD34 se expresa en una célula cancerosa.

También se describen en este documento inhibidores de CD34 y terapias combinadas. Los inhibidores de CD34 incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas recombinantes, células que expresan CAR anti-CD34, p. ej., CART y anticuerpos anti-CD34 (p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico anti-CD34) y fragmentos de los mismos. En algunos casos, los inhibidores anti-CD34 se pueden usar para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B descrita en el presente documento. En un caso, el inhibidor de CD34 se administra en combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

En un caso, el inhibidor de CD34 comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal My-10 o un inmunoliposoma que comprende el anticuerpo monoclonal My-10, como se describe en Mercadal et al. Biochim. Biophys. Acta. 1371.1(1998):17-23. En otros casos, el inhibidor de CD34 comprende un inmunoliposoma que contiene un fármaco contra el cáncer, por ejemplo, doxorrubicina, que está dirigido a las células que expresan CD34, como se describe en Carrion et al. Life Sci. 75.3(2004):313-28. En un caso, el inhibidor de CD34 comprende un anticuerpo monoclonal contra CD34 como se describe en Maleki et al. Hum. Antibodies. 22(2013):1-8. En otro caso, el inhibidor de CD34 comprende un anticuerpo monoclonal que se dirige a CD34, como se describe en Maleki et al. Cell J. 16.3(2014):361-66.

En algunos casos, el inhibidor de CD34 se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico.

En algunos casos, un inhibidor de CD34 incluye una célula que expresa CAR anti-CD34, p. ej., CART, p. ej., una célula que expresa una construcción de CAR anti-CD34 o codificada por un CAR de unión a CD34 que comprende un scFv, CDR o cadenas VH y VL. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-CD34, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-CD34 (que comprende un dominio de unión a CD34) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

También se describe en este documento una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD34. Por ejemplo, en un caso, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR CD34.

Inhibidores de FLT-3

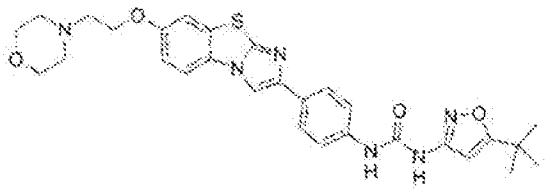
La tirosina cinasa 3 de tipo Fms (FLT-3), también denomina antígeno de Grupo de diferenciación 135 (CD135), tirosina-proteína cinasa de tipo receptor FLT3 o cinasa de hígado fetal-2 (Flk2), es una tirosina cinasa receptora. FLT-3 es un receptor de citocinas para el ligando, ligando de citocina de Flt3 (FLT3L). FLT-3 se expresa en la superficie de muchas células progenitoras hematopoyéticas y es importante para el desarrollo de linfocitos. El gen de FLT3 habitualmente está mutado en la leucemia, p. ej., la leucemia mieloide aguda (LMA).

Como se utiliza en el presente documento, el término "FLT-3" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células progenitoras hematopoyéticas y algunas células cancerosas, p. ej., células de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de FLT-3 humana se pueden encontrar en el n.º de referencia NP_004110.2 y las secuencias de ARNm que las codifican se pueden encontrar en el n.º de referencia NM_004119.2. Como se utiliza en este documento, "FLT-3" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del FLT-3 de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína FLT-3. En un aspecto, la proteína FLT-3 se expresa en una célula cancerosa.

También se describen en este documento inhibidores de FLT-3 y terapias combinadas. Los inhibidores de FLT-3 incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas recombinantes, células que expresan CAR anti-FLT-3, p. ej., CART y anticuerpos anti-FLT-3 (p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico anti-FLT-3) y fragmentos de los mismos. En algunos casos, los inhibidores anti-FLT-3 se pueden usar para tratar una neoplasia

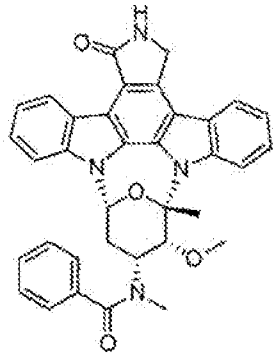
maligna de linfocitos B descrita en el presente documento. En un caso, el inhibidor de FLT-3 se administra en combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

En algunos casos, el inhibidor de FLT-3 comprende quizartinib (AC220; Ambit Biosciences) o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo. Quizartinib es un inhibidor de la tirosina cinasa del receptor de molécula pequeña. La estructura de quizartinib (1-(5-(terc-butil)isoxazol-3-il)-3-(4-(7-(2-morfolinoetoxi)benzo[d]imidazo[2,1-b]tiazol-2-il)fenil)urea) se muestra a continuación.



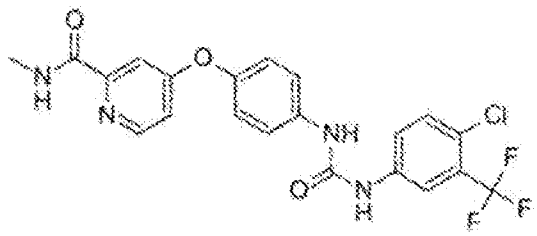
En algunos casos, el inhibidor de FLT-3 comprende midostaurina (PKC412; Technische Universität Dresden) o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado de la misma. La midostaurina es un inhibidor de la proteína cinasa que es un derivado semisintético de la estaurosporina, un alcaloide de la bacteria Streptomyces staurosporeus.

A continuación se muestra la estructura de la midostaurina ((9*S*,10*R*,11*R*,13*R*)-2,3,10,11,12,13-Hexahidro-10-metoxi-9-metil-11-(metilamino)-9,13-epoxi-1*H*,9*H*-diindolo[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiamzonina-1-ona).



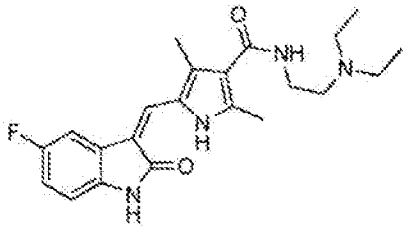
En algunos casos, la midostaurina se administra por vía oral, por ejemplo, en una dosis de aproximadamente 25-200 mg, por ejemplo, aproximadamente 25-50 mg, 50-100 mg, 100-150 mg o 150-200 mg. Por ejemplo, la midostaurina se administra, por ejemplo, por vía oral, en una dosis de aproximadamente 25-200 mg dos veces al día, por ejemplo, aproximadamente 25-50 mg, 50-100 mg, 100-150 mg o 150-200 mg dos veces al día. Véase, p. ej., el identificador de ensayo clínico n.º NCT01830361.

En un caso, el inhibidor de FLT-3 comprende sorafenib (Bayer y Onyx Pharmaceuticals) o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado del mismo. Sorafenib es un inhibidor molecular pequeño de múltiples proteínas cinasas de tirosina (p. ej., VEGFR y PDGFR), cinasas Raf (p. ej., C-Raf y B-Raf) y algunas cinasas de serina/treonina intracelulares (p. ej., C-Raf, B-Raf de tipo salvaje y B-Raf mutante). Véase, p. ej., labeling.bayerhealthcare.com/html/products/pi/ Nexavar_PI.pdf. La estructura de sorafenib (4-[4-[[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]carbamoilamino] fenoxi]-N-metil-piridina-2-carboxamida) se muestra a continuación.

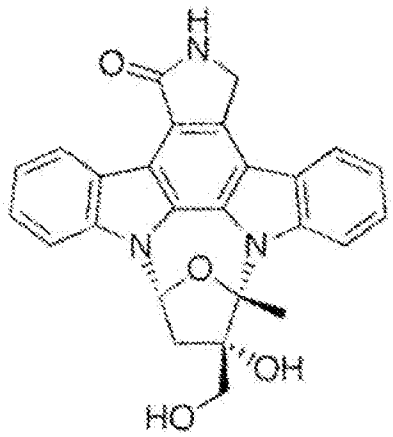


En algunos casos, el inhibidor de FLT-3 comprende sunitinib (anteriormente conocido como SU11248; Pfizer) o una sal o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. Sunitinib es un fármaco oral de molécula pequeña que inhibe múltiples tirosina cinasas receptoras, incluida FLT3. Sunitinib ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento del carcinoma de células renales (CCR) y el tumor del

estroma gastrointestinal (TEGI) resistente a imatinib. La estructura de sunitinib (*N*-(2-dietilaminoetil)-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-ilideno)metil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxamida) se muestra a continuación.



En algunos casos, el inhibidor de FLT-3 comprende lestaurtinib (CEP-701; Cephalon) o una sal o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. Lestaurtinib es un inhibidor de la tirosina cinasa estructuralmente relacionado con la estaurosporina. La estructura de lestaurtinib ((9*S*,10*S*,12*R*)-2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-hidroxi-10-(hidroximetil)-9-metil-9,12-epoxi-1*H*-dindolo[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*]pirrolo[3,4-*i*][1,6]benzodiazocin-1-ona) se muestra a continuación.



En algunos casos, lestaurtinib se administra por vía oral, por ejemplo, en una dosis de aproximadamente 40-100 mg dos veces al día, por ejemplo, aproximadamente 40-60 mg, 50-70 mg, 60-80 mg, 70-90 mg o 80-100 mg dos veces al día. Véase, p. ej., el identificador de ensayo clínico n.º NCT00079482; o NCT00030186.

En algunos casos, el inhibidor de FLT-3 se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico.

En algunos casos, un inhibidor de FLT-3 incluye una célula que expresa CAR anti-FLT-3, p. ej., CART, p. ej., una célula que expresa una construcción de CAR anti-FLT-3 o codificada por un CAR de unión a FLT-3 que comprende un scFv, CDR o cadenas VH y VL. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-FLT-3, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-FLT-3 (que comprende un dominio de unión a FLT-3) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

También se describe en este documento una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR FLT-3. Por ejemplo, en un caso, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR FLT-3.

En un caso, el CAR de dominio de unión a antígeno (p. ej., un dominio de unión a antígeno CD19, ROR1, CD20, CD22, CD123, CD10, CD34 o FLT-3) comprende una porción de scFv, p. ej., una porción de scFv humano. El scFv puede estar precedido por una secuencia líder opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 13, y seguido de una secuencia bisagra opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49, una región transmembrana tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:51 y una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO:43, por ejemplo, en el que los dominios son contiguos y están en el mismo marco de lectura para formar una única proteína de fusión.

En algunos casos, la presente divulgación abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR (p. ej., un CAR CD19, un CAR ROR1, un CAR CD20, un CAR CD22, un CAR CD123, un CAR CD10, un CAR CD34 o un CAR FLT-3), en donde la molécula de

ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión a antígeno, p. ej., descrito en el presente documento, p. ej., que es contiguo a una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular y está en el mismo marco de lectura que esta. Un dominio de señalización intracelular ilustrativo que puede utilizarse en el CAR incluye, pero sin limitación, uno o más dominios de señalización intracelular de, p. ej., CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares.

En un caso, el dominio de unión a antígeno (p. ej., un dominio de unión a antígeno CD19, ROR1, CD20, CD22, CD123, CD10, CD34 o FLT-3) se caracteriza por características o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, en un caso, la porción de una composición de CAR de la divulgación que comprende un dominio de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno de linfocitos B humano (p. ej., CD19, ROR1, CD20, CD22, CD123, CD10, CD34 o FLT-3) o un fragmento del mismo. En determinados casos, el scFv es contiguo y está en el mismo marco de lectura que una secuencia líder. En un aspecto, la secuencia líder es la secuencia polipeptídica proporcionada como SEQ ID NO: 13.

En un caso, el dominio de unión al antígeno es un fragmento, por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv). En un caso, el dominio de unión al antígeno es un Fv, un Fab, un (Fab')2 o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico) (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la divulgación se unen a una proteína de linfocitos B o un fragmento de la misma con una afinidad de tipo silvestre o potenciada. En algunos casos, un scFv humano puede obtenerse de una biblioteca de presentación.

En un caso, el dominio de unión al antígeno, por ejemplo, scFv, comprende al menos una mutación tal que el scFv mutado confiere una estabilidad mejorada a la construcción CAR. En otro caso, el dominio de unión al antígeno, por ejemplo, scFv, comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones que surgen, por ejemplo, del proceso de humanización, de modo que el scFv mutado confiere una estabilidad mejorada a la construcción CAR.

En un caso, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR (p. ej., un CAR CD19, un CAR ROR1, un CAR CD20, un CAR CD22, un CAR CD123, un CAR CD10, un CAR CD34 o un CAR FLT-3) que incluye un dominio de señalización intracelular primario, y una segunda célula que expresa un CAR (p. ej., un CAR CD19, un CAR ROR1, un CAR CD20, un CAR CD22, un CAR CD123, un CAR CD10, un CAR CD34 o un CAR FLT-3)) que incluye un dominio de señalización secundario.

Inhibidores de CD79b

Como se utiliza en el presente documento, el término "CD79b" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células de cáncer hemático maligno, p. ej., células de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de CD79b humano se pueden encontrar en los n.º de referencia NP_000617.1 (precursor de isoforma 1), NP_067613.1 (precursor de isoforma 2) o NP_001035022.1 (precursor de isoforma 3) y las secuencias de ARNm que las codifican se pueden encontrar en los n.º de referencia NM_000626.2 (variante de transcrito 1), NM_021602.2 (variante de transcrito 2) o NM_001039933.1 (variante de transcrito 3). Como se utiliza en este documento, "CD79b" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del CD79b de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD79b. En un aspecto, la proteína CD79b se expresa en una célula cancerosa. En algunos casos, la proteína CD79b es una proteína CD79b de tipo salvaje; en otros casos, la proteína CD79b es una proteína CD79b mutante.

CD79b también se denomina beta asociada a inmunoglobulina, que es un componente del complejo multimérico del receptor de antígeno de linfocitos B. CD79b forma un heterodímero con otra proteína accesoria denominada CD79a (alfa asociada a inmunoglobulina) y el heterodímero forma complejos con inmunoglobulinas de superficie en linfocitos B. CD79b es importante para el ensamblaje y la expresión superficial del receptor de antígeno de linfocitos B. CD79b y CD79a son importantes para el desarrollo de prelinfocitos B y linfocitos B. La mutación y la expresión aberrante de CD79b se producen en muchas células de LLC-B y se pueden correlacionar con la pérdida de la expresión superficial y/o la señalización defectuosa del receptor de antígeno de linfocitos B en LLC-B. Véase, por ejemplo, Thompson et al. Blood 90,4(1997):1387-94. En algunos casos, la sobreexpresión de una forma mutante o una variante de corte y empalme de CD79b se ha correlacionado con un receptor de antígeno de linfocitos B disminuido en LLC-B y otras neoplasias malignas linfoides. Véase, por ejemplo, Cragg et al. Blood 100,9(2002):3068-76.

En el presente documento se desvelan inhibidores de CD79b y terapias combinadas. Los inhibidores de CD79b incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas recombinantes, células que expresan CAR anti-CD79b, p. ej., CART y anticuerpos anti-CD79b (p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico anti-CD79b) y fragmentos de los mismos. En algunos casos, los inhibidores anti-CD79b se pueden usar para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B descrita en el presente documento. En un caso, el inhibidor de CD79b se administra en

combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

En un caso, el inhibidor de CD79b es un anticuerpo anti-CD79b o fragmento del mismo. En un caso, el anticuerpo anti-79b o fragmento del mismo comprende un anticuerpo monoclonal, p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o fragmento del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD79b o fragmento del mismo comprende un conjugado de fármaco de anticuerpo anti-CD79b tal como polatuzumab vedotina (Roche). En algunos casos, polatuzumab vedotin se utiliza para tratar un cáncer, por ejemplo, LNH, por ejemplo, linfoma folicular o DLBCL, por ejemplo, linfoma folicular recidivante o refractario o DLBCL. Véase, p. ej., NCT02257567. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD79b o fragmento del mismo es un anticuerpo biespecífico que comprende componentes que se unen a CD32B y D79B, como MGD010 (MacroGenics). Véase, p. ej., NCT02376036.

En algunos casos, el inhibidor de CD79b se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico.

En algunos casos, un inhibidor de CD79b incluye una célula que expresa CAR anti-CD79b, p. ej., CART, p. ej., una célula que expresa una construcción de CAR anti-CD79b o codificada por un CAR de unión a CD79b que comprende un scFv, CDR o cadenas VH y VL. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-CD79b, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-CD79b (que comprende un dominio de unión a CD79b) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

También se describe en este documento una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART o células NK que expresan CAR, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD79b. Por ejemplo, en un caso, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR CD79b.

Inhibidores de C179b

Como se utiliza en el presente documento, el término "CD179b" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células de cáncer hemático maligno, p. ej., células de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de CD179b humano se pueden encontrar en los n.º de referencia NP_064455.1 (precursor de isoforma a) o NP_690594.1 (precursor de isoforma b), y las secuencias de ARNm que las codifican se pueden encontrar en los n.º de referencia NM_020070.3 (variante de transcrito 1) y NM_152855.2 (variante de transcrito 2). Como se utiliza en este documento, "CD179b" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del CD179b de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD179b. En un aspecto, la proteína CD179b se expresa en una célula cancerosa. En algunos casos, la proteína CD179b es una proteína CD179b de tipo salvaje; en otros casos, la proteína CD179b es una proteína CD179b mutante.

CD179b también se denomina polipéptido 1 de tipo inmunoglobulina lambda (IGLL1). CD179b es una subunidad de una cadena ligera heterodimérica que forma complejo con una cadena pesada de Ig mu unida a la membrana. Juntas, la cadena ligera y la cadena pesada forman el receptor de prelinfocitos B. Las mutaciones en CD179b se han correlacionado con la deficiencia de linfocitos B y la agammaglobulinemia. CD179b se expresa en algunas células cancerosas, p. ej., células de linfoma linfoblástico de linfocitos B precursoras.

En el presente documento se desvelan inhibidores de CD179b y terapias combinadas. Los inhibidores de CD179b incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas recombinantes, células que expresan CAR anti-CD179b, p. ej., CART y anticuerpos anti-CD179b (p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico anti-CD179b) y fragmentos de los mismos. En algunos casos, los inhibidores anti-CD179b se pueden usar para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B descrita en el presente documento. En un caso, el inhibidor de CD179b se administra en combinación con un inhibidor de CD20, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

En un caso, el inhibidor de CD179b es un anticuerpo anti-CD179b o fragmento del mismo. En un caso, el anticuerpo anti-179b o fragmento del mismo comprende un anticuerpo monoclonal, p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o fragmento del mismo.

En algunos casos, el inhibidor de CD179b se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico.

En algunos casos, un inhibidor de CD179b incluye una célula que expresa CAR anti-CD179b, p. ej., CART, p. ej., una célula que expresa una construcción de CAR anti-CD179b o codificada por un CAR de unión a CD179b que

comprende un scFv, CDR o cadenas VH y VL. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-CD179b, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-CD179b (que comprende un dominio de unión a CD179b) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

También se describe en este documento una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART o células NK que expresan CAR, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD179b. Por ejemplo, en un caso, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD19 y una segunda célula que expresa un CAR CD179b.

Inhibidores de CD79a

Como se utiliza en el presente documento, el término "CD79a" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células de cáncer hemático maligno, p. ej., células de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de CD79a humano se pueden encontrar en los n.º de referencia NP_001774.1 (precursor de isoforma 1) o NP_067612.1 (precursor de isoforma 2), y las secuencias de ARNm que las codifican se pueden encontrar en los n.º de referencia NM_001783.3 (variante de transcrito 1) y NM_021601.3 (variante de transcrito 2). Como se utiliza en este documento, "CD79a" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de empalme del CD79a de tipo salvaje de longitud completa. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD79a. En un aspecto, la proteína CD79a se expresa en una célula cancerosa. En algunos casos, la proteína CD79a es una proteína CD79a de tipo salvaje; en otros casos, la proteína CD79a es una proteína CD79a mutante.

CD79a también se denomina alfa asociado a inmunoglobulina. CD79a se heterodimeriza con CD79b para formar un componente del complejo multimérico receptor de antígeno de linfocitos B. CD79a se expresa en muchos cánceres hemáticos, p. ej., leucemias agudas (p. ej., LMA), linfomas de linfocitos B y mielomas.

En el presente documento se desvelan inhibidores de CD79a y terapias combinadas. Los inhibidores de CD79a incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas, proteínas recombinantes, células que expresan CAR anti-CD79a, p. ej., CART y anticuerpos anti-CD79a (p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico anti-CD79a) y fragmentos de los mismos. En algunos casos, los inhibidores anti-CD79a se pueden usar para tratar una neoplasia maligna de linfocitos B descrita en el presente documento. En un caso, el inhibidor de CD79a se administra en combinación con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa un CAR que comprende un dominio de unión a anticuerpo que es murino, humano o humanizado.

En un caso, el inhibidor de CD79a es un anticuerpo anti-CD79a o fragmento del mismo. En un caso, el anticuerpo anti-CD79a o fragmento del mismo comprende un anticuerpo monoclonal, p. ej., un anticuerpo monoespecífico o biespecífico o fragmento del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD79a o fragmento del mismo comprende un anticuerpo anti-CD79a o fragmento del mismo (por ejemplo, regiones variables o CDR) descrito en Polson et al. Blood 110,2(2007):616-23. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD79a o fragmento del mismo comprende el anticuerpo 7H7, 15E4 o 16C11 o fragmento del mismo (por ejemplo, regiones variables o CDR) descritos en Polson et al. Véase Id.

En algunos casos, el inhibidor de CD79a se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico.

En algunos casos, un inhibidor de CD79a incluye una célula que expresa CAR anti-CD79a, p. ej., CART, p. ej., una célula que expresa una construcción de CAR anti-CD79a o codificada por un CAR de unión a CD79a que comprende un scFv, CDR o cadenas VH y VL. Por ejemplo, una célula que expresa CAR anti-CD79a, p. ej., CART, se genera mediante la genomodificación de un CAR-CD79a (que comprende un dominio de unión a CD79a) en una célula (p. ej., un linfocito T o un linfocito NK), p. ej., para administración en combinación con una célula que expresa CAR descrita en el presente documento. También se describen en este documento métodos de uso de las células que expresan CAR descritas en este documento para terapia adoptiva.

También se describe en este documento una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART o células NK que expresan CAR, que comprende una mezcla de células que expresan CAR CD19 y CAR CD79a. Por ejemplo, en un caso, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR CD20 y una segunda célula que expresa un CAR CD79a.

Terapias con CAR

Los inhibidores del presente documento, p. ej., células que expresan CAR dirigidas contra CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a, pueden comprender una o más de las composiciones

descritas en el presente documento, p. ej., un dominio transmembrana, dominio de señalización intracelular, dominio coestimulante, secuencia líder o bisagra.

En un aspecto, la presente invención abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende un transgén que codifica un CAR de acuerdo con las reivindicaciones. También se describe en este documento una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión anti-CD19 seleccionado entre uno o más de los SEQ ID NOS: 61-72, en la que la secuencia es contigua y está en el mismo marco de lectura que la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular ilustrativo que puede utilizarse en el CAR incluye, pero sin limitación, uno o más dominios de señalización intracelular de, p. ej., CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares.

En un aspecto, la presente invención contempla modificaciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento (p. ej., scFv) de partida que generan moléculas funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, el VH o VL de un dominio de unión a antígeno, p. ej., scFv, comprendido en el CAR puede modificarse para conservar al menos aproximadamente el 70 %, 71 %. 72%. 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de la región marco conservada inicial de VH o VL del dominio de unión a antígeno, p. ej., scFv. La presente invención contempla modificaciones de la construcción de CAR completa, p. ej., modificaciones en una o más secuencias de aminoácidos de los diversos dominios de la construcción de CAR con el fin de generar moléculas funcionalmente equivalentes. La construcción de CAR se puede modificar para mantener una identidad de al menos aproximadamente un 70 %, 71 %, 72%. 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de la construcción de CAR inicial. La presente divulgación también contempla modificaciones de CDR, por ejemplo, modificaciones en una o más secuencias de aminoácidos de una o más CDR de una construcción CAR para generar moléculas funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, la CDR puede tener, p. ej., hasta e incluyendo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 alteraciones (p. ej., sustituciones) con respecto a una secuencia de CDR proporcionada en el presente documento.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que lo incluye o aislándolo directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el ácido nucleico de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

La presente invención incluye, entre otras cosas, construcciones de vectores retrovíricos y lentivíricos que expresan un CAR que se puede utilizar para transducir directamente una célula.

La presente invención también incluye una construcción de ARN que se puede utilizar directamente para transfectar una célula. Un método para generar ARNm para su uso en la transfección conlleva la transcripción *in vitro* (IVT, por sus siglas en inglés) de un molde con cebadores diseñados especialmente, seguida de la adición de poliA, para producir una construcción que contiene la secuencia no traducida 3' y 5' ("UTR"), una caperuza 5' y/o un Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés), el ácido nucleico que se va a expresar y una cola de poliA, normalmente de una longitud de 50 a 2000 bases (SEQ ID NO: 118). El ARN producido de esta manera se puede utilizar para transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En una realización, el molde incluye secuencias para el CAR. En una realización, un vector de ARN de CAR se utiliza para transducir un linfocito T por electroporación.

Dominio de unión a antígenos

El CAR de la invención comprende un elemento de unión específica a la diana también denominado dominio de unión al antígeno. La elección de la fracción depende del tipo y número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana asociadas con un estado de enfermedad particular. Por tanto, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión al antígeno en un CAR de la divulgación incluyen los asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias y células cancerosas. El dominio de unión a antígeno puede unirse, p. ej., a uno o más de CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a. En la presente invención, definida en las reivindicaciones, el dominio de unión a antígeno se une a CD22.

En un aspecto, la respuesta de células T mediada por CAR se puede dirigir a un antígeno de interés mediante la ingeniería de un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno deseado en el CAR.

El dominio de unión al antígeno puede ser cualquier dominio que se una al antígeno, incluyendo, entre otros, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo murino, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento funcional del mismo, incluyendo, entre otros, un anticuerpo de

dominio único, tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de nanocuerpo derivado de camélido, y un andamio alternativo conocido en la técnica por funcionar como dominio de unión al antígeno, tal como un dominio de fibronectina recombinante y similares.

En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión al antígeno se derive de la misma especie en la que finalmente se utilizará el CAR. Por ejemplo, para su uso en seres humanos, puede ser beneficioso que el dominio de unión al antígeno del CAR comprenda residuos humanos o humanizados para el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Se puede producir un anticuerpo humanizado utilizando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, entre otras, el injerto de CDR (véase, por ejemplo, la patente europea n.º EP 239.400; la publicación internacional n.º WO 91/09967; y la patente de EE. UU. números 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o renovación de la superficie (véase, por ejemplo, las patentes europeas números EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973), reordenamiento de cadenas (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. Nº 5.565.332) y técnicas divulgadas, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. Nº US2005/0042664, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. Nº US2005/0048617, la patente de EE. UU. Nº. nº 6.407.213, patente de EE. UU. Nº 5.766.886, la Publicación Internacional Nº WO 9317105, Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002), Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Sup):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994) y Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994). A menudo, los residuos del marco en las regiones del marco se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante CDR para alterar, por ejemplo, mejorar, la unión del antígeno. Estas sustituciones del marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de la CDR y los residuos del marco para identificar residuos del marco importantes para la unión del antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos del marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen et al., Patente de EE. UU. No. 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323.)

Un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo tiene uno o más residuos de aminoácidos restantes provenientes de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "de importación", que normalmente se toman de un dominio variable de "importación". Como se proporciona en este documento, los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos comprenden uno o más CDR de moléculas de inmunoglobulina no humanas y regiones marco en donde los residuos de aminoácidos que comprenden el marco se derivan completamente o en su mayor parte de la línea germinal humana. En la técnica se conocen bien múltiples técnicas para la humanización de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y se pueden realizar esencialmente siguiendo el método de Winter et al. (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR de roedores o las secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano, es decir, injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT n.º WO 91/09967; y patente de EE. UU. núms. 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640). En dichos anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpos, sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados son a menudo anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos del marco (FR) se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La humanización de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también se puede lograr mediante recubrimiento o renovación de la superficie (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); y Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) o mezcla de cadenas (Patente de EE. UU. N.º 5.565.332).

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se utilizarán en la elaboración de los anticuerpos humanizados es para reducir la antigenicidad. Según el método denominado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se compara con toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana más cercana a la del roedor se acepta entonces como el marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Molécula. Biol., 196:901(1987)). Otro método utiliza un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (véase, por ejemplo, Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)). En algunas realizaciones, la región marco, por ejemplo, las cuatro regiones marco, de la región variable de la cadena pesada se derivan de una secuencia de línea germinal VH4_4-59. En una realización, la región marco conservada puede comprender una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, del aminoácido en la secuencia murina correspondiente. En una realización, la región marco conservada, por ejemplo, las cuatro regiones marco conservadas de la región variable de cadena ligera proceden de una secuencia de línea germinal VK3_1.25. En una realización, la región marco conservada puede comprender una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, del aminoácido en la secuencia murina correspondiente.

En algunos aspectos, la porción de una composición de CAR de la invención que comprende un fragmento de anticuerpo se humaniza con retención de alta afinidad por el antígeno diana y otras propiedades biológicas favorables. De acuerdo con un aspecto de la invención, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles habitualmente y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas exposiciones permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, por ejemplo, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al antígeno diana. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir del receptor y las secuencias de importación de modo que se logre la característica del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el antígeno diana. En general, los residuos de CDR están directa y más sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno.

Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo humanizado puede retener una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original, p. ej., en la presente invención, la capacidad de unirse a CD22 humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo puede tener una afinidad y/o especificidad de unión mejoradas al CD22 humano.

En un aspecto, el dominio de unión es un fragmento, por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv). En un aspecto, el dominio de unión es un Fv, un Fab, un (Fab')2 o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico) (por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la invención se unen a una proteína CD22 con afinidad de tipo salvaje o potenciada.

En algunos casos, los scFv se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879- 5883). Las moléculas ScFv se pueden producir uniendo las regiones VH y VL entre sí mediante enlaces polipeptídicos flexibles. Las moléculas scFv comprenden un enlazador (por ejemplo, un enlazador Ser-Gly) con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizada. La longitud del enlazador puede afectar en gran medida la forma en que las regiones variables de un scFv se pliegan e interactúan. De hecho, si se emplea un enlace polipeptídico corto (por ejemplo, entre 5 y 10 aminoácidos) se evita el plegamiento intracadena. También se requiere el plegamiento entre cadenas para unir las dos regiones variables y formar un sitio de unión del epítopo funcional. Para ver ejemplos de orientación y tamaño de enlazadores, véase, por ejemplo, Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. *U.S.A.* 90:6444-6448, publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. números 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794 y publicaciones PCT números WO2006/020258 y WO2007/024715.

Un scFv puede comprender un enlazador de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos de aminoácidos entre sus regiones VL y VH. La secuencia de enlace puede comprender cualquier aminoácido natural. En algunas realizaciones, la secuencia de enlace comprende los aminoácidos glicina y serina. En otra realización, la secuencia enlazadora comprende conjuntos de repeticiones de glicina y serina tales como $(Gly_4Ser)n$, en el que n es un entero positivo igual o mayor que 1 (SEQ ID NO:18). En una realización, el enlazador puede ser $(Gly_4Ser)_4$ (SEQ ID NO:106) o $(Gly_4Ser)_3$(SEQ ID NO:107). La variación en la longitud del enlazador puede retener o mejorar la actividad, dando lugar a una eficacia superior en los estudios de actividad.

En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a antígeno u otras porciones o el CAR completo se pueden modificar, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos descrita en este documento se puede modificar, por ejemplo, mediante una sustitución conservadora. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Porcentaje de identidad en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, si se refiere a dos o más secuencias que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos aminoácidos o nucleótidos que son iguales (p. ej., 60 % de identidad, opcionalmente 70 %, 71 %. 72%. 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad a lo largo de una región específica o, cuando no se especifica, a lo largo de toda la secuencia), cuando se compara y se alinea para obtener la correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada como medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual

e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe a lo largo de una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) o a lo largo de una región que tiene una longitud de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos).

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Se pueden utilizar parámetros de programa predeterminados o se pueden designar parámetros alternativos. Luego, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, según los parámetros del programa. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, (1970) Adv. Appl. *Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; y Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En un aspecto, la presente invención contempla modificaciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento (p. ej., scFv) de partida que generan moléculas funcionalmente equivalentes. En términos más generales, el VH o VL de un dominio de unión a antígeno de células B, a CD22, por ejemplo, scFv, comprendido en el CAR, se puede modificar para conservar al menos aproximadamente 70%, 71%. 72%. 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%,81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de la región marco VH o VL inicial del dominio de unión a antígeno, por ejemplo, scFv. La presente invención contempla modificaciones de la construcción de CAR completa, p. ej., modificaciones en una o más secuencias de aminoácidos de los diversos dominios de la construcción de CAR con el fin de generar moléculas funcionalmente equivalentes. La construcción CAR se puede modificar para conservar al menos aproximadamente 70%, 71%. 72%. 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%,81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de la construcción CAR inicial.

CAR BIESPECÍFICOS

En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad para no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, el primer y el segundo epítopos están en el mismo antígeno, por ejemplo, la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). En una realización, el primer y el segundo epítopos se superponen. En una realización, el primer y el segundo epítopos no se superponen. En una realización, el primer y el segundo epítopos están en antígenos diferentes, por ejemplo, proteínas diferentes (o subunidades diferentes de una proteína multimérica). En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un primer epítopo y una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un medio anticuerpo que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y un medio anticuerpo que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende medio anticuerpo, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítopo y medio anticuerpo, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un scFv, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer

epítopo y un scFv, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítopo. En una realización, el primer epítopo se encuentra en CD19 y el segundo epítopo se encuentra en CD22.

En ciertas realizaciones, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica (por ejemplo, biespecífica o triespecífica). En la técnica se conocen protocolos para generar moléculas de anticuerpos biespecíficos o heterodímeros; incluyendo, entre otros, por ejemplo, el enfoque de "perilla en un agujero" descrito en, por ejemplo, US 5731168; el emparejamiento de Fc con dirección electrostática como se describe en, por ejemplo, WO 09/089004, WO 06/106905 y WO 2010/129304; la formación de heterodímeros de dominios de ingeniería de intercambio de hebras (SEED) como se describe en, por ejemplo, WO 07/110205; el intercambio de brazos Fab como se describe en, por ejemplo, WO 08/119353, WO 2011/131746 y WO 2013/060867; conjugado de anticuerpo doble, por ejemplo, mediante reticulación de anticuerpos para generar una estructura biespecífica utilizando un reactivo heterobifuncional que tiene un grupo reactivo a amina y un grupo reactivo a sulfhidrilo como se describe, por ejemplo, en US 4433059; determinantes de anticuerpos biespecíficos generados mediante la recombinación de anticuerpos medios (pares de cadena pesada-ligera o Fab) de diferentes anticuerpos a través del ciclo de reducción y oxidación de enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas, como se describe, por ejemplo, en US 4444878; anticuerpos trifuncionales, por ejemplo, tres fragmentos Fab' reticulados a través de grupos reactivos a sulfhidrilo, como se describe, por ejemplo, en US5273743; proteínas de unión biosintéticas, por ejemplo, par de scFv reticulados a través de colas C-terminales, preferiblemente a través de reticulación química reactiva a disulfuro o amina, como se describe, por ejemplo, en US5534254; anticuerpos bifuncionales, por ejemplo, fragmentos Fab con diferentes especificidades de unión dimerizadas a través de cremalleras de leucina (por ejemplo, c-fos y c-jun) que han reemplazado el dominio constante, como se describe en, por ejemplo, US5582996; receptores mono y oligovalentes biespecíficos y oligoespecíficos, por ejemplo, regiones VH-CH1 de dos anticuerpos (dos fragmentos Fab) unidos a través de un espaciador polipeptídico entre la región CH1 de un anticuerpo y la región VH del otro anticuerpo típicamente con cadenas ligeras asociadas, como se describe en, por ejemplo, US5591828; conjugados ADN-anticuerpo biespecíficos, por ejemplo, reticulación de anticuerpos o fragmentos Fab a través de una pieza de ADN bicatenario, como se describe en, por ejemplo, US5635602; proteínas de fusión biespecíficas, por ejemplo, una construcción de expresión que contiene dos scFv con un enlazador peptídico helicoidal hidrofílico entre ellos y una región constante completa, como se describe en, por ejemplo, US5637481; proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas, por ejemplo, dímeros de polipéptidos que tienen un primer dominio con una región de unión de la región variable de la cadena pesada de Ig y un segundo dominio con una región de unión de la región variable de la cadena ligera de Ig, generalmente denominados diacuerpos (también se incluyen estructuras de orden superior que crean moléculas biespecíficas, triespecíficas o tetraespecíficas, como se describe, por ejemplo, en US5837242; construcciones de minicuerpos con cadenas VL y VH unidas además conectadas con espaciadores peptídicos a una región de bisagra de anticuerpo y una región CH3, que se pueden dimerizar para formar moléculas biespecíficas/multivalentes, como se describe, por ejemplo, en US5837821; dominios VH y VL unidos con un enlazador peptídico corto (por ejemplo, 5 o 10 aminoácidos) o sin enlazador en absoluto en ninguna orientación, que pueden formar dímeros para formar diacuerpos biespecíficos; trímeros y tetrámeros, como se describe, por ejemplo, en US5844094; Cadena de dominios VH (o dominios VL en miembros de la familia) conectados por enlaces peptídicos con grupos reticulables en el extremo C asociados además con dominios VL para formar una serie de FV (o scFv), como se describe, por ejemplo, en US5864019; y polipéptidos de unión de cadena sencilla con un dominio VH y un dominio VL unidos a través de un enlazador peptídico se combinan en estructuras multivalentes a través de reticulación no covalente o química para formar, por ejemplo, estructuras homobivalentes, heterobivalentes, trivalentes y tetravalentes utilizando tanto el formato de tipo scFV como el de tipo diacuerpo, como se describe, por ejemplo, en US5869620. Moléculas multiespecíficas y biespecíficas ejemplares adicionales y métodos para prepararlas se encuentran, por ejemplo, en los documentos US5910573, US5932448, US5959083, US5989830, US6005079, US6239259, US6294353, US6333396, US6476198, US6511663, US6670453, US6743896, US6809185, US6833441, US7129330, US7183076, US7521056, US7527787, US7534866, US7612181, US2002004587A1, US2002076406A1, US2002103345A1, US2003207346A1, US2003211078A1, US2004219643A1, US2004220388A1, US2004242847A1, US2005003403A1, US2005004352A1, US2005069552A1, US2005079170A1, US2005100543A1, US2005136049A1, US2005136051A1, US2005163782A1, US2005266425A1, US2006083747A1, US2006120960A1, US2006204493A1, US2006263367A1, US2007004909A1, US2007087381A1, US2007128150A1, US2007141049A1, US2007154901A1, US2007274985A1, US2008050370A1, US2008069820A1, US2008152645A1, US2008171855A1, US2008241884A1, US2008254512A1, US2008260738A1, US2009130106A1, US2009148905A1, US2009155275A1, US2009162359A1, US2009162360A1, US2009175851A1, US2009175867A1, US2009232811A1, US2009234105A1, US2009263392A1, US2009274649A1, EP346087A2, WO0006605A2, WO02072635A2, WO04081051A1, WO06020258A2, WO2007044887A2, WO2007095338A2, WO2007137760A2, WO2008119353A1, WO2009021754A2, WO2009068630A1, WO9103493A1, WO9323537A1, WO9409131A1, WO9412625A2, WO9509917A1, WO9637621A2, WO9964460A1.

Dentro de cada anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, scFv) de una molécula de anticuerpo biespecífico, el VH puede estar en dirección 5' o en dirección 3' del VL. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aguas arriba (p. ej., scFv) está dispuesto con su VH (VHi) aguas arriba de su VL (VLi) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aguas abajo (p. ej., scFv) está dispuesto con su VL (VL_2) aguas arriba de su VH (VL_2), de modo que la molécula de anticuerpo biespecífico global tiene la disposición VH_1-VL_1-VL_2-VH_2. En

otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo corriente arriba (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VL (VLi) en dirección 5' de su VH (VHi) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo corriente abajo (por ejemplo, scFv) está dispuesto con su VH (VHz) en dirección 5' de su VL (VL_2), de modo que la molécula de anticuerpo biespecífico general tiene la disposición VL_1-VH_1-VH_2-VL_2. Opcionalmente, un enlazador está dispuesto entre los dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., scFvs), p. ej., entre VLi y VL_2 si la construcción está dispuesta como VH_1-VL_1-VL_2-VH_2, o entre VHi y VH_2 si la construcción está dispuesta como VL_1-VH_1-VH_2-VL_2. El conector puede ser un conector como se describe en el presente documento, p. ej., un conector $(Gly_4\text{-}Ser)n$, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, p. ej., 4 (SEQ ID NO: 53). En general, el enlazador entre los dos scFv debe ser lo suficientemente largo para evitar errores de emparejamiento entre los dominios de los dos scFv. Opcionalmente, se dispone un enlazador entre VL y VH del primer scFv. Opcionalmente, se dispone un enlazador entre VL y VH del segundo scFv. En construcciones que tienen múltiples enlazadores, dos o más de ellos pueden ser iguales o diferentes. En consecuencia, en algunas realizaciones, un CAR biespecífico comprende VL, VH y, opcionalmente, uno o más enlazadores en una disposición como se describe en este documento.

En ciertas realizaciones, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo biespecífico que tiene una primera especificidad de unión para un primer epítopo de células B y una segunda especificidad de unión para otro antígeno de células B. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo biespecífico tiene una primera especificidad de unión por CD19 y una segunda especificidad de unión por CD22.

TCR quimérico

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en este documento (por ejemplo, aquellos dirigidos contra CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a) se pueden injertar en uno o más dominios constantes de una cadena de receptor de células T ("TCR"), por ejemplo, una cadena TCR alfa o TCR beta, para crear un TCR quimérico que se una específicamente a un antígeno asociado al cáncer. Sin limitarse a la teoría, se cree que los TCR quiméricos enviarán señales a través del complejo TCR al unirse al antígeno. Por ejemplo, un scFv tal como se divulga en el presente documento, puede injertarse en el dominio constante, p. ej., al menos una porción del dominio constante extracelular, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático, de una cadena de TCR, por ejemplo, la cadena alfa de TCR y/o la cadena beta de TCR. Como otro ejemplo, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un dominio VL como se describe en el presente documento, puede injertarse al dominio constante de una cadena alfa de TCR, y un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un dominio VH como se describe en el presente documento, puede injertarse al dominio constante de una cadena beta de TCR (o, como alternativa, un dominio VL puede injertarse en el dominio constante de la cadena beta de TCR y un dominio VH puede injertarse en una cadena alfa de TCR). Como otro ejemplo, las CDR de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, p. ej., las CDR de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como se describe en cualquiera de las tablas del presente documento se pueden injertar en una cadena alfa y/o beta de TCR para crear un TCR quimérico que se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer. Por ejemplo, los CDR LC desvelados en el presente documento pueden injertarse en el dominio variable de una cadena alfa del TCR y los CDR HC desvelados en el presente documento pueden injertarse en el dominio variable de una cadena beta del TCR, o viceversa. Tales TCR quiméricos se pueden producir mediante cualquier método adecuado (por ejemplo, Willemsen RA *et al., Gene Therapy* 2000; 7: 1369-1377; Zhang T *et al, Cancer Gene Ther* 2004; 11: 487-496; Aggen *et al, Gene Ther.* abril de 2012;19(4):365-74).

Armazones que no son de anticuerpos

En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende un armazón que no es de anticuerpo, p. ej., una fibronectina, anquirina, anticuerpo de dominio, lipocalina, inmunofármaco modular pequeño, maxicuerpo, Proteína A o affilin. El armazón que no es de anticuerpo tiene la capacidad de unirse al antígeno diana en una célula. En las realizaciones, el dominio de unión al antígeno es un polipéptido o fragmento de este de una proteína de origen natural expresada en una célula. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un armazón que no es de anticuerpo. Puede emplearse una amplia diversidad de armazones que no son de anticuerpos siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente al antígeno diana en una célula diana.

Los armazones que no son de anticuerpos incluyen: fibronectina (Novartis, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zúrich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), agentes inmunofármacos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), Proteína A (Affibody AG, Suecia) y affilin (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

Los armazones de fibronectina se basan en el dominio de fibronectina tipo III (p. ej., el décimo módulo de la fibronectina tipo III (dominio ^{10} Fn3)). El dominio de fibronectina de tipo III tiene 7 u 8 cadenas beta que están distribuidas entre dos láminas beta, que se empaquetan entre sí para formar el núcleo de la proteína, y además contienen bucles (análogos a las CDR) que conectan las cadenas beta entre sí y están expuestos a los disolventes. Hay al menos tres de estos bucles en cada borde del sándwich de lámina beta, en los que el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las cadenas beta (véase US 6.818.418). Debido a esta estructura, este

armazón que no es de anticuerpo imita propiedades de unión a antígeno que son de naturaleza y afinidad similar a las de los anticuerpos. Estos armazones se pueden utilizar en una estrategia de aleatorización de bucle y reordenamiento aleatorio *in vitro* que es similar al proceso de maduración por afinidad de anticuerpos *in vivo*.

La tecnología de anquirina se basa en el uso de proteínas con módulos de repetición derivados de anquirina como armazones para llevar regiones variables que puedan usarse para la unión a diferentes dianas. El módulo de repetición de ankirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consiste en dos hélices α antiparalelas y un giro β. La unión de las regiones variables se optimiza principalmente utilizando la presentación de ribosomas.

Los avímeros derivan de proteínas que contienen dominio A natural tales como HER3. Estos dominios se usan por naturaleza para interacciones proteína-proteína y en seres humanos más de 250 proteínas se basan estructuralmente en dominios A. Los avímeros consisten en un determinado número de monómeros de "dominio A" diferentes (2-10) unidos a través de enlazadores de aminoácidos. Pueden crearse avímeros que se pueden unir al antígeno diana utilizando la metodología descrita, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20040175756; 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

Los ligandos de afinidad de aficuerpos son proteínas pequeñas y sencillas compuestas por un haz de tres hélices basado en el armazón de uno de los dominios de unión a IgG de la Proteína A. La Proteína A es una proteína de superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de armazón consiste en 58 aminoácidos, 13 de los cuales se aleatorizan para generar bibliotecas de Affibody con una gran cantidad de variantes de ligando (véase, p. ej., el documento US 5.831.012). Las moléculas de Affibody imitan a los anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de las moléculas aficuerpo es similar al de un anticuerpo.

Los miméticos de epítopos de proteínas (PEM) son moléculas cíclicas de tamaño mediano, similares a péptidos (peso molecular 1-2 kDa) que imitan las estructuras secundarias de horquilla beta de las proteínas, la principal estructura secundaria involucrada en las interacciones proteína-proteína. Los dominios de unión a antígeno, p. ej., los que comprenden scFv, anticuerpos de un solo dominio o anticuerpos de camélido, pueden dirigirse a cualquier receptor/ligando diana descrito en el presente documento, p. ej., los receptores PD1, PD-L1 o PD-L2.

En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende el dominio extracelular, o un fragmento de unión a contraligando de este, de la molécula que se une a un contraligando en la superficie de una célula diana.

Un dominio de unión a antígeno puede comprender el dominio extracelular de un receptor inhibidor. La interacción con un contraligando de la molécula coinhibidora se redirige a una optimización de la respuesta efectora inmunitaria.

Un dominio de unión a antígeno puede comprender el dominio extracelular de una molécula coestimulante, denominada dominio ECD coestimulante. La interacción con un contraligando de la molécula coestimulante da lugar a la optimización de la respuesta efectora inmunitaria.

Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, en diversas realizaciones, un CAR puede diseñarse para comprender un dominio transmembrana que está unido al dominio extracelular del CAR. Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales adyacentes a la región transmembrana, por ejemplo, uno o más aminoácidos asociados con la región extracelular de la proteína de la que se derivó la transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la que deriva la proteína transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). En un aspecto, el dominio transmembrana es uno que está asociado con uno de los otros dominios del CAR, p. ej., en una realización, el dominio transmembrana puede ser de la misma proteína de la que procede el dominio de señalización, el dominio coestimulante o el dominio bisagra. En otro aspecto, el dominio transmembrana no procede de la misma proteína de la que procede cualquier otro dominio del CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dominios de este tipo a los dominios transmembrana de las proteínas de membrana de superficie iguales o diferentes, p. ej., para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. En un aspecto, el dominio transmembrana tiene capacidad de homodimerización con otro CAR en la superficie celular de una célula que expresa CAR. En un aspecto diferente, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana puede modificarse o sustituirse con el fin de minimizar las interacciones con los dominios de unión del participante en la unión nativo presente en la misma célula que expresa el CAR.

El dominio transmembrana puede proceder de una fuente natural o recombinante. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de enviar señales a los dominios intracelulares siempre que el CAR se haya unido a una diana. Un dominio transmembrana de uso particular en esta invención puede incluir al menos la o las regiones transmembrana de, p. ej., la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. En algunas

realizaciones, un dominio transmembrana puede incluir al menos la(s) región(es) transmembrana(s) de, por ejemplo, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD 150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C, o CD19.

En algunos casos, el dominio transmembrana se puede unir a la región extracelular del CAR, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno del CAR, a través de una bisagra, por ejemplo, una bisagra de una proteína humana. Por ejemplo, en una realización, la bisagra puede ser una bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana, p. ej., una bisagra de IgG4, una bisagra de IgD, un conector GS (p. ej., un conector GS descrito en el presente documento), una bisagra de KIR2DS2 o una bisagra de CD8a. En una realización, la bisagra o espaciador comprende (p. ej., consiste en) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En un aspecto, el dominio transmembrana comprende (por ejemplo, consiste en) un dominio transmembrana de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de IgG4. Por ejemplo, en una realización, el espaciador o la bisagra comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGKM (SEQ ID NO:45). En algunas realizaciones, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra codificada por la secuencia de nucleótidos de

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGC
GGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC
CGGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGA
GGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA
AGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAA
CAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC
CTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC
TGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAA
GAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCC
TGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ
ID NO:46).

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de IgD. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos
RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEE
RETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAG
KVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMAL REP
AAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGF
APARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYV TDH (SEQ ID NO:47). En algunas realizaciones, la bisagra o espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCC
CAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAA
TACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAG
GAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGG
CGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCAC
CTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGA
GGTTGCCGGAAAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCC
ATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCCTTCCGAGATCCCTGT
GGAACGCCGGGACCTCTGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCCAC
AGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGC
CTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGC
GAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAG
CGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCCACCCCAGCCGGG
TTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCACCTAGCCC
CCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCT
AAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT (SEQ ID
NO:48).

En un aspecto, el dominio transmembrana puede ser recombinante, en cuyo caso comprenderá predominantemente residuos hidrófobos como leucina y valina. En un aspecto, se puede encontrar un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana recombinante.

Opcionalmente, un enlace oligo- o polipeptídico corto, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y la región citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlace particularmente adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:49). En algunas realizaciones, el conector está codificado por una secuencia de nucleótidos de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 50).

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de KIR2DS2.

Dominio citoplasmático

El dominio o región citoplásmica del CAR incluye un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular es generalmente responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha introducido el CAR.

Los ejemplos de dominios de señalización intracelulares para su uso en el CAR de la invención incluyen las secuencias citoplásmicas del receptor de linfocitos T (TCR) y correceptores que actúan concertados para iniciar la transducción de señales después de la activación del receptor del antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia recombinante que tenga la misma capacidad funcional.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR por sí solas son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria y/o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de las células T está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmática: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (dominios de señalización intracelular primarios) y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (dominio citoplasmático secundario, por ejemplo, un dominio coestimulador).

Un dominio de señalización primaria regula la activación primaria del complejo TCR ya sea de forma estimuladora o inhibidora. Los dominios de señalización intracelular primaria que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización conocidos como motivos de activación basados en tirosina del inmunorreceptor o ITAM.

Los ejemplos de dominios de señalización intracelular primarios que contiene ITAM que son de uso particular en la invención incluyen los de CD3 zeta, FcR gamma común (FCER1G), Fc gamma RIIa, FcR beta (Fc épsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD79a, CD79b, CD278 (también conocido como "ICOS") FcεRI, DAP10, DAP12 y CD66d. En una realización, un CAR de la invención comprende un dominio de señalización intracelular, p. ej., dominio de señalización primario of CD3-zeta.

En una realización, un dominio de señalización primario comprende un dominio ITAM modificado, por ejemplo, un dominio ITAM mutado que tiene una actividad alterada (por ejemplo, aumentada o disminuida) en comparación con el dominio ITAM nativo. En una realización, un dominio de señalización primario comprende un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM modificado, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM optimizado y/o truncado. En una realización, un dominio de señalización primario comprende uno, dos, tres, cuatro o más motivos ITAM.

Otros ejemplos de moléculas que contienen un dominio de señalización intracelular primario que son de uso particular en la invención incluyen aquellos de DAP 10, DAP12 y CD32.

Dominio de señalización coestimulante

El dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o puede combinarse con cualquier otro dominio o dominios de señalización intracelulares deseados útiles en el contexto de un CAR de la invención. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender una porción de cadena de CD3 zeta y un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. En una realización, el dominio intracelular está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio intracelular está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de ICOS.

Una molécula coestimulante puede ser una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficiente de los linfocitos a un antígeno. Los ejemplos de moléculas de este tipo incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares. Por ejemplo, se ha demostrado que la coestimulación de CD27 potencia la expansión, la función efectora y la supervivencia de células CART humanas in vitro y aumenta la persistencia de las células T humanas y la actividad antitumoral in vivo (Song et al. *Blood*. 2012; 119(3):696-706). Otros ejemplos de tales moléculas coestimulantes incluyen la molécula del MHC de clase I, proteínas receptoras de TNF, proteínas de tipo inmunoglobulina, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores de linfocitos NK activadores, BTLA, un receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se une específicamente con CD83.

Las secuencias de señalización intracelular dentro de la porción citoplásmica del CAR de la invención pueden unirse entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un enlace oligo- o polipeptídico corto, por ejemplo, de entre 2 y 10 aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) de longitud puede formar el enlace entre la secuencia de señalización intracelular. En una realización, se puede utilizar un doblete de glicina-serina como un enlazador adecuado. En una realización, se puede utilizar un solo aminoácido, por ejemplo, una alanina o una glicina, como un enlazador adecuado.

En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más, dominios de señalización coestimuladores. En una realización, los dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más dominios de señalización coestimuladores, están separados por una molécula de enlace, por ejemplo, una molécula de enlace descrita en este documento. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende dos dominios de señalización coestimuladores. En algunas realizaciones, la molécula enlazadora es un residuo de glicina. En algunas realizaciones, el enlazador es un residuo de alanina.

En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En un aspecto, el dominio de señalización de 4-1BB es un dominio de señalización de la SEQ ID NO: 16. En un aspecto, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización de la SEQ ID NO: 17.

En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 comprende una secuencia de aminoácidos de QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO:51). En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 está codificado por una secuencia de ácido nucleico de

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG

CCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTT

CGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:52).

CAR de receptores de linfocitos citolíticos naturales (NKR)

En una realización, una molécula CAR de acuerdo con las reivindicaciones comprende uno o más componentes de un receptor de células asesinas naturales (NKR), formando así un NKR-CAR. El componente NKR puede ser un dominio transmembrana, un dominio bisagra o un dominio citoplasmático de cualquiera de los siguientes receptores de linfocitos citolíticos naturales: receptor de tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos (KIR, por sus siglas en inglés), p. ej., KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, DIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 y KIR3DP1; receptor de citotoxicidad natural (NCR, por sus siglas en inglés), p. ej., NKp30, NKp44, NKp46; familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización (SLAM) de receptores de células inmunitarias, p. ej., CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME y CD2F-10; receptor de Fc (FcR), p. ej., CD16 y CD64; y receptores Ly49, p. ej., LY49A, LY49C. Las moléculas NKR-CAR descritas en este documento pueden interactuar con una molécula adaptadora o un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, DAP12. En la Publicación Internacional N.º WO2014/145252 se describen configuraciones y secuencias ejemplares de moléculas CAR que comprenden componentes NKR.

Estrategias para regular los receptores antigénicos quiméricos

En algunas realizaciones, un CAR regulable (RCAR) en el que la actividad CAR se puede controlar es deseable para optimizar la seguridad y eficacia de una terapia con CAR. Hay muchas formas de regular las actividades de CAR. Por ejemplo, inducir la apoptosis utilizando, por ejemplo, una caspasa fusionada a un dominio de dimerización (véase, por ejemplo, Di et al., N Engl. J. Med. 3 de noviembre de 2011; 365(18):1673-1683), se puede utilizar como un interruptor de seguridad en la terapia de CAR de la presente invención. En una realización, las células (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) que expresan un CAR de la presente invención comprenden además un interruptor de apoptosis inducible, en donde una caspasa humana (p. ej., caspasa 9) o una versión modificada se fusiona con una modificación de la Proteína FKB humana que permite la dimerización condicional. En presencia de una molécula pequeña, tal como un rapálogo (p. ej., AP 1903, AP20187), la caspasa inducible (p. ej., caspasa 9) se activa y conduce a la rápida apoptosis y muerte de las células (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) que expresan un CAR de la presente invención. Se han descrito ejemplos de un interruptor de la apoptosis inducible basado en caspasa (o uno o más aspectos de dicho interruptor), p. ej., en los documentos US2004040047; US20110286980; US20140255360; WO1997031899; WO2014151960; WO2014164348; WO2014197638; WO2014197638.

En otro ejemplo, las células que expresan CAR también pueden expresar una molécula de Caspasa-9 inducible (iCaspasa-9) que, tras la administración de un fármaco dimerizador (por ejemplo, rimiducid (también llamado AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) o AP20187 (Ariad)) conduce a la activación de la Caspasa-9 y a la apoptosis de las células. La molécula iCaspasa-9 contiene un dominio de unión al inductor químico de dimerización (CID) que media la dimerización en presencia de un CID. Esto da como resultado un agotamiento inducible y selectivo de las células que expresan CAR. En algunos casos, la molécula iCaspasa-9 está codificada por una molécula de ácido nucleico separada del vector o vectores que codifican CAR. En algunos casos, la molécula iCaspasa-9 está codificada por la misma molécula de ácido nucleico que el vector codificador CAR. La iCaspasa-9 puede proporcionar un interruptor de seguridad para evitar cualquier toxicidad de las células que expresan CAR. Véase, p. ej., Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. Nº NCT02107963; y Di Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673- 83.

Estrategias alternativas para regular la terapia con CAR de la presente invención incluyen utilizar moléculas de bajo peso molecular o anticuerpos que desactivan o deshabilitan la actividad CAR, p. ej., mediante la depleción de células que expresan CAR, p. ej., mediante inducción de la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en la presente también pueden expresar un antígeno que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, por ejemplo, ADCC o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en este documento también pueden expresar un receptor capaz de ser dianizado por un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los ejemplos de tales receptores incluyen EpCAM, VEGFR, integrinas (p. ej., integrinas αvβ3, α4, αI¾β3, α4β7, α5β1, αvβ3, αv), miembros de la superfamilia de receptor de TNF (p. ej., TRAIL-R1, TRAIL-R2), receptor de PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, receptor de IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD1 1, CD1 1a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2,

CD19, CD20, CD22, CD23/receptor de IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41 , CD44, CD51 , CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7, y EGFR, y versiones truncadas de estos (p. ej., versiones que conservan uno o más epítopos extracelulares pero que carecen de una o más regiones dentro del dominio citoplasmático).

Por ejemplo, una célula que expresa CAR descrita en la presente también puede expresar un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) truncado que carece de capacidad de señalización pero mantiene el epítopo que es reconocido por moléculas capaces de inducir ADCC, por ejemplo, cetuximab (ERBITUX®), de modo que la administración de cetuximab induce ADCC y la posterior disminución de células que expresan CAR (véase, p. ej., el documento WO2011/056894, y Jonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860). Otra estrategia incluye la expresión de un gen marcador/suicida altamente compacto que combina epítopos diana de los antígenos CD32 y CD20 en las células que expresan CAR descritas en este documento, que se une a rituximab, lo que da como resultado un agotamiento selectivo de las células que expresan CAR, por ejemplo, mediante ADCC (véase, por ejemplo, Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287). Otros métodos para agotar las células que expresan CAR descritos en este documento incluyen la administración de CAMPATH, un anticuerpo monoclonal anti-CD52 que se une y se dirige selectivamente a los linfocitos maduros, por ejemplo, células que expresan CAR, para su destrucción, por ejemplo, induciendo ADCC. En otras realizaciones, la célula que expresa CAR se dianizar selectivamente usando un ligando de CAR, p. ej., un anticuerpo anti-idiotípico. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiidiotípico puede causar actividad de células efectoras, p. ej., actividades de ADCC o ADC, y reducir de este modo el número de células que expresan CAR. En otras realizaciones, el ligando de CAR, p. ej., el anticuerpo antidiotípico, se puede acoplar a un agente que induce la muerte celular, p. ej., una toxina, y reducir de este modo el número de células que expresan CAR. Como alternativa, las propias moléculas CAR se pueden configurar de manera que la actividad se pueda regular, p. ej., activar y desactivar, como se describe más adelante.

En otras realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones también puede expresar una proteína diana reconocida por el agente de agotamiento de células T. En una realización, la proteína diana es CD20 y el agente de depleción de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD20, p. ej., rituximab. En dicha realización, el agente de depleción de linfocitos T se administra una vez que es deseable reducir o eliminar la célula que expresa CAR, p. ej., para mitigar la toxicidad inducida por CAR. En otras realizaciones, el agente de depleción de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD52, p. ej., alemtuzumab.

En un aspecto, un RCAR comprende un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en las realizaciones más simples, en los que los componentes de un CAR estándar de acuerdo con las reivindicaciones, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular, se dividen en polipéptidos o miembros separados. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos incluye un conmutador de la dimerización que, tras la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, p. ej., puede acoplar un dominio de unión al antígeno a un dominio de señalización intracelular. En una realización, un CAR de la presente invención utiliza un interruptor de dimerización como los descritos, por ejemplo, en el documento WO2014127261. Se proporcionan una descripción y configuraciones ilustrativas adicionales de tales CAR regulables en el presente documento y en la Publicación Internacional n.º WO 2015/090229.

En algunas realizaciones, un RCAR implica un dominio de conmutación, p. ej., un dominio de conmutación de FKBP, como se recoge en la SEQ ID NO: 122, o comprende un fragmento de FKBP que tiene la capacidad de unirse con FRB, p. ej., como se recoge en la SEQ ID NO: 123. En algunas realizaciones, el RCAR implica un dominio de conmutación que comprende una secuencia de FBR, p. ej., como se recoge en la SEQ ID NO: 124, o una secuencia de FRB mutante, por ejemplo, como se establece en cualquiera de las SEQ ID Nos. 125-130.DVPDYAS LGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHY TGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQ MSVGQRAKLTISPDY A YGA TGHPGIIPPHA TL VFDVELLKL ETSY (SEQ ID NO: 122)

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDS

SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP

DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETS (SEQ ID NO: 123)

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER

GPQTLKETSF NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFRR

ISK (SEQ ID NO: 124)

Tabla 1. FRB mutante ilustrativo que tiene afinidad incrementada por una molécula de dimerización.

Mutante de FRB	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Mutante E2032I	TLWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	125
Mutante E2032L	TLWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	126
Mutante T2098L	TLWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	127
Mutante E2032, T2098	TLWHEMWHEGLXEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLXQAWDLYYHVFRRISKTS	128
Mutante E2032I, T2098L	TLWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	129
Mutante E2032L, T2098L	TLWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	130

CAR dividido

En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR utiliza un CAR dividido. El enfoque CAR dividido se describe con más detalle en las publicaciones WO2014/055442 y WO2014/055657. Brevemente, un sistema CAR dividido comprende una célula que expresa un primer CAR que tiene un primer dominio de unión a antígeno y un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB), y la célula también expresa un segundo CAR que tiene un segundo dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, CD3 zeta). Cuando la célula encuentra el primer antígeno, se activa el dominio coestimulador y la célula prolifera. Cuando la célula encuentra el segundo antígeno, se activa el dominio de señalización intracelular y comienza la actividad de destrucción celular. Por lo tanto, la célula que expresa CAR solo se activa completamente en presencia de ambos antígenos.

Transfección de ARN

En el presente documento se describen métodos para producir un CAR de ARN transcrito in vitro. La presente invención también incluye (entre otras cosas) una construcción de ARN que codifica un CAR que se puede utilizar directamente para transfectar una célula. Un método para generar ARNm para su uso en la transfección puede implicar la transcripción *in vitro* (IVT, por sus siglas en inglés) de un molde con cebadores diseñados especialmente, seguida de la adición de poliA, para producir una construcción que contiene la secuencia no traducida 3' y 5' ("UTR"), una caperuza 5' y/o un Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés), el ácido nucleico que se va a expresar y una cola de poliA, normalmente de una longitud de 50 a 2000 bases (SEQ ID NO: 118). El ARN producido de esta manera se puede utilizar para transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En un aspecto, el molde incluye secuencias para el CAR.

En un aspecto, el CAR es codificado por un ARN mensajero (ARNm). En un aspecto, el ARNm que codifica el CAR se introduce en una célula efectora inmunitaria, p. ej., un linfocito T o un linfocito NK, para la producción de una célula que expresa CAR, p. ej., un linfocito CART o un linfocito CAR NK.

En una realización, el ARN de CAR transcrito *in vitro* se puede introducir en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN se produce por transcripción *in vitro* utilizando un molde generado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente se puede convertir directamente mediante PCR en una plantilla para la síntesis de ARNm in vitro utilizando cebadores y ARN polimerasa adecuados. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. Una plantilla deseada para la transcripción in vitro es un CAR de la presente invención. Por ejemplo, el molde para el ARN de CAR comprende una región extracelular que comprende un dominio variable monocatenario de un anticuerpo antitumoral; una región de bisagra, un dominio transmembrana (p. ej., un dominio transmembrana de CD8a); y una región citoplasmática que incluye un dominio de señalización intracelular, p. ej., que comprende el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB.

En una realización, el ADN que se ha de utilizar para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede ser de una secuencia de ADN de origen natural del genoma de un organismo. En una realización, el ácido nucleico puede incluir algunas o todas las regiones no traducidas (UTR) en 5' y/o 3'. El ácido nucleico puede incluir exones e intrones. En una realización, el ADN que se va a usar para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humano. En otra realización, el ADN que se va a usar para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humano que incluye las UTR en 5' y 3'. El ADN también puede ser una secuencia de ADN artificial que normalmente no se expresa en un organismo natural. Una secuencia de ADN artificial ejemplar es aquella que contiene porciones de genes que están ligados entre sí para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que están ligadas entre sí pueden ser de un solo organismo o de más de un organismo.

La PCR se utiliza para generar una plantilla para la transcripción in vitro del ARNm que se utiliza para la transfección. Los métodos para realizar PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para uso en PCR están diseñados para tener regiones que sean sustancialmente complementarias a las regiones del ADN que se utilizarán como plantilla para la PCR. "Sustancialmente complementario", como se utiliza en este documento, se refiere a secuencias de nucleótidos donde la mayoría o la totalidad de las bases en la secuencia del cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias o no coinciden. Las secuencias sustancialmente complementarias pueden aparearse o hibridarse con la diana de ADN previsto en las condiciones de apareamiento utilizadas para la PCR. Los cebadores pueden diseñarse para ser sustancialmente complementarios a cualquier porción de la plantilla de ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse para amplificar la porción de un ácido nucleico que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluidos los UTR 5' y 3'. Los cebadores también se pueden diseñar para amplificar una porción de un ácido nucleico que codifica un dominio particular de interés. En una realización, los cebadores están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluyendo la totalidad o porciones de las UTRs en 5' y 3'. Los cebadores útiles para PCR se pueden generar mediante métodos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. Los "cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos de la plantilla de ADN que se encuentran en dirección 5' de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "En dirección 5'" se utiliza aquí para referirse a una ubicación 5, de la secuencia de ADN que se va a amplificar con respecto a la cadena codificante. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a una plantilla de ADN de doble cadena que se encuentran en dirección 3' de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "En dirección 3'" se utiliza en este documento para referirse a una ubicación 3' con respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar con respecto a la cadena codificante.

Cualquier ADN polimerasa útil para PCR se puede utilizar en los métodos descritos en este documento. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente en varias fuentes.

También se pueden utilizar estructuras químicas con la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficiencia de la traducción. El ARN, en algunas realizaciones, tiene UTR 5' y 3'. En una realización, la UTR en 5' tiene una longitud de entre uno y 3000 nucleótidos. La longitud de las secuencias UTR 5' y 3' que se agregarán a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, incluido, entre otros, el diseño de cebadores para PCR que se asocien a diferentes regiones de las UTR. Utilizando este enfoque, un experto en la técnica puede modificar las longitudes UTR 5' y 3' necesarias para lograr una eficiencia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

Las UTR 5' y 3' pueden ser los UTR 5' y 3' endógenos naturales del ácido nucleico de interés. Alternativamente, se pueden agregar secuencias UTR que no sean endógenas al ácido nucleico de interés incorporando las secuencias UTR en los cebadores directos e inversos o mediante cualquier otra modificación de la plantilla. El uso de secuencias UTR que no sean endógenas al ácido nucleico de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficiencia de la traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en secuencias 3' UTR pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, las UTR 3' se pueden seleccionar o diseñar para

aumentar la estabilidad del ARN transcrito basándose en propiedades de los UTR que son bien conocidas en la técnica.

En una realización, la UTR en 5' puede contener la secuencia de Kozak del ácido nucleico endógeno. Alternativamente, cuando se agrega una 5' UTR que no es endógena al ácido nucleico de interés mediante PCR como se describió anteriormente, se puede rediseñar una secuencia Kozak de consenso agregando la secuencia 5' UTR. Las secuencias Kozak pueden aumentar la eficiencia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parece ser necesario para todos los ARN para permitir una traducción eficiente. El requisito de secuencias Kozak para muchos ARNm es conocido en la técnica. En otras realizaciones, la UTR en 5' puede ser una UTR en 5' de un virus de ARN, cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras realizaciones, se pueden usar diversos análogos de nucleótidos en la UTR en 3' o 5' para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

Para permitir la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN sin la necesidad de clonación génica, se debe unir un promotor de la transcripción al molde de ADN en dirección 5' respecto a la secuencia que se va a transcribir. Cuando una secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa se añade al extremo 5' del cebador directo, el promotor de ARN polimerasa se incorpora al producto de PCR en dirección 5' respecto al marco de lectura abierto que se va a transcribir. En una realización, el promotor es un promotor de la polimerasa T7, como se describe en otra parte del presente documento. Otros promotores útiles incluyen, entre otros, los promotores de la ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias nucleotídicas de consenso para promotores T7, T3 y SP6 se conocen en la técnica.

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

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

El método convencional de integración de tramos poliA/T en un molde de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede provocar inestabilidad del plásmido, razón por la cual los moldes de ADN plasmídico obtenidos de células bacterianas están a menudo muy contaminados con deleciones y otras aberraciones. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean laboriosos y prolongados, sino que a menudo no sean fiables. Es por eso que un método que permite la construcción de moldes de ADN con un tramo de poliA/T 3' sin clonación resulta sumamente deseable.

El segmento poliA/T de la plantilla de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR utilizando un cebador inverso que contenga una cola poliT, como la cola 100T (SEQ ID NO: 29) (el tamaño puede ser 50-5000 T (SEQ ID NO: 30)), o después de PCR por cualquier otro método, incluyendo, pero no limitado a, ligadura de ADN o recombinación in vitro. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas (SEQ ID NO: 57).

Las colas poli(A) de los ARN se pueden extender aún más después de la transcripción in vitro con el uso de una polimerasa poli(A), como la polimerasa poliA de E. coli (E-PAP). En una realización, aumentar la longitud de una cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos (SEQ ID NO: 104) da lugar a un aumento de aproximadamente dos veces en la eficiencia de traducción del ARN. Adicionalmente, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Una unión de este tipo puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP se pueden incorporar en la cola de poli(A) usando una poli(A) polimerasa. Los análogos de ATP pueden aumentar además la estabilidad del ARN.

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

Los ARN producidos mediante los métodos descritos en esta memoria también pueden contener una secuencia de sitio de entrada al ribosoma interno (IRES). La secuencia de IRES puede ser cualquier secuencia viral, cromosómica o diseñada artificialmente que inicie la unión del ribosoma independiente del casquete al ARNm y facilite el inicio de la traducción. Puede incluirse cualquier soluto adecuado para la electroporación celular, que

pueda contener factores que faciliten la permeabilidad y la viabilidad celular, tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

El ARN se puede introducir en las células diana utilizando cualquiera de un cierto número de métodos diferentes, por ejemplo, métodos disponibles comercialmente que incluyen, pero no se limitan a electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colorado), Multiporator (Eppendort, Hamburgo Alemania), transfección mediada por liposomas catiónicos utilizando lipofección, encapsulación de polímeros, transfección mediada por péptidos o sistemas de suministro de partículas biolísticos, tales como "pistolas de genes" (véase, p. ej., Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12 (8): 861-70 (2001).

Métodos de suministro no virales

En algunos aspectos, se pueden utilizar métodos no virales para suministrar un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en esta memoria en una célula, o tejido o un sujeto.

En algunas realizaciones, el método no vírico incluye el uso de un transposón (también denominado elemento transponible). En algunas realizaciones, un transposón es un trozo de ADN que puede insertarse por sí mismo en una ubicación de un genoma, por ejemplo, un trozo de ADN que es capaz de autorreplicarse e insertar su copia en un genoma o un trozo de ADN que se puede cortar de un ácido nucleico más largo e insertarse en otro lugar de un genoma. Por ejemplo, un transposón comprende una secuencia de ADN formada por repeticiones invertidas que flanquean genes para la transposición.

Los métodos de ejemplo de suministro de ácidos nucleicos utilizando un transposón incluyen un sistema de transposón Bella Durmiente (SBTS, por sus siglas en inglés) y un sistema de transposón piggyBac (PB). Véase, p. ej., Aronovich *et al*. Hum. Mol. Genet. 20.R1(2011):R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang et al. Mol. Ther. 16(2008):580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al *Blood.* 122.21 (2013): 166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65; y Ding et al. Cell. 122.3(2005):473-83.

El SBTS incluye dos componentes: 1) un transposón que contiene un transgén y 2) una fuente de enzima transposasa. La transposasa puede transponer el transposón de un plásmido portador (u otro ADN donante) a un ADN diana, como un cromosoma/genoma de una célula huésped. Por ejemplo, la transposasa se une al plásmido portador/ADN donante, corta el transposón (incluido el o los transgenes) del plásmido y lo inserta en el genoma de la célula huésped. Véase, p. ej., Aronovich *et al.*

Los transposones ilustrativos incluyen un transposón basado en pT2. Véase, p. ej., Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47; y Singh et al. Cancer Res. 68.8(2008): 2961-2971. Las transposasas ejemplares incluyen una transposasa de tipo Tc1/mariner, por ejemplo, la transposasa SB10 o la transposasa SB11 (una transposasa hiperactiva que puede expresarse, por ejemplo, a partir de un promotor de citomegalovirus). Remítase, p. ej., Aronovich *et al.*; Kebriaei *et al.*; y Grabundzija *et al.*.

El uso del SBTS permite la integración y expresión eficientes de un transgén, p. ej., un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento. En este documento se proporcionan métodos para generar una célula, por ejemplo, una célula T o una célula NK, que expresa de forma estable un CAR descrito en este documento, por ejemplo, utilizando un sistema de transposón tal como SBTS.

De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, en algunas realizaciones, se suministran a una célula (p. ej., linfocito T o NK) uno o más ácidos nucleicos, p. ej., plásmidos, que contienen los componentes de SBTS. Por ejemplo, el ácido o los ácidos nucleicos se suministran mediante métodos estándar de suministro de ácidos nucleicos (p. ej., ADN plasmídico), p. ej., métodos descritos en el presente documento, p. ej., electroporación, transfección o lipofección. En algunas realizaciones, el ácido nucleico contiene un transposón que comprende un transgén, p. ej., un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el ácido nucleico contiene un transposón que comprende un transgén (p. ej., un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento), así como una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima transposasa. En otras realizaciones, se proporciona un sistema con dos ácidos nucleicos, p. ej., un sistema de plásmido doble, p. ej., donde un primer plásmido contiene un transposón que comprende un transgén y un segundo plásmido contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima transposasa. Por ejemplo, el primer y el segundo ácidos nucleicos se suministran conjuntamente a una célula hospedadora.

En algunas realizaciones, se generan células, p. ej., linfocitos T o NK, que expresan un CAR descrito en el presente documento utilizando una combinación de inserción de genes utilizando el SBTS y edición genética utilizando una nucleasa (p. ej., nucleasas con dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), el sistema CRISPR/Cas o endonucleasas de asentamiento modificadas de nuevo con meganucleasas modificadas).

En algunas realizaciones, el uso de un método no vírico de suministro permite la reprogramación de células, p. ej., linfocitos T o NK, e infusión directa de las células en un sujeto. Las ventajas de los vectores no virales incluyen, entre otras, la facilidad y el costo relativamente bajo de producir cantidades suficientes necesarias para satisfacer una población de pacientes, la estabilidad durante el almacenamiento y la falta de inmunogenicidad.

Construcciones de ácidos nucleicos que codifican un CAR

En este documento se describen moléculas de ácido nucleico que codifican una o más construcciones CAR descritas en este documento, por ejemplo, CD19 CAR, CD20 CAR o CD22 CAR. Las moléculas de ácido nucleico de la invención codifican una molécula CAR como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como un transcrito de ARN mensajero. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como un constructo de ADN.

En consecuencia, en un aspecto, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en la que el CAR comprende un dominio de unión de acuerdo con las reivindicaciones, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulador, por ejemplo, un dominio de señalización coestimulador y/o un dominio de señalización primario, por ejemplo, cadena zeta.

En un caso de la divulgación, el ácido nucleico comprende un ácido nucleico que codifica CD22 establecido en la Tabla 6A o una secuencia con una identidad del 95-99% del mismo. En un caso, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las **tablas 6A-10B** o una secuencia con 95-99 % de identidad con la misma. La invención proporcionar un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones.

En una realización, el dominio transmembrana es el dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En una realización, el dominio transmembrana comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con la misma. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana por una región de bisagra, p. ej., una región de bisagra descrita en esta memoria. En una realización, la región de bisagra comprende la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:47 o SEQ ID NO:49, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende, además, una secuencia que codifica un dominio coestimulante. En una realización, el dominio coestimulante es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). En una realización, el dominio coestimulante es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la molécula del MHC de clase I, proteínas receptoras de TNF, proteínas de tipo inmunoglobulina, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), que activan receptores de linfocitos NK, BTLA, receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se une específicamente con CD83. En una realización, el dominio coestimulante comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 16, o una secuencia con 95-99 % de identidad con la misma. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 51, o una secuencia con 95-99 % de identidad con las mismas y la secuencia de la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 43, o una secuencia con una identidad de un 95-99 % con las mismas, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una cadena polipeptídica única.

En otro aspecto, la divulgación pertenece a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una construcción CAR que comprende una secuencia conductora de SEQ ID NO: 13, un dominio scFv que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 59, (o una secuencia con una identidad de un 95-99 % con las mismas), una región de bisagra de la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49 (o una secuencia con una identidad de un 95-99 % con las mismas), un dominio transmembrana que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 15 (o una secuencia con un 95-99 % de identidad con la misma), un dominio coestimulante 4-1BB que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 16 o un dominio coestimulante CD27 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 51

(o una secuencia con un 95-99 % de identidad con la misma), y un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 43 (o una secuencia con un 95-99 % de identidad con las mismas).

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de polipéptido aislada codificada por la molécula de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión anti-CD19, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulador, y en la que dicho dominio de unión anti-CD19 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 59, o una secuencia con una identidad del 95-99% de la misma.

La invención proporciona una molécula CAR de acuerdo con las reivindicaciones. En una realización, la molécula CAR codificada comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador. En una realización, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 4-1BB (CD137). En una realización, el dominio coestimulador comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En una realización, el dominio transmembrana comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 15. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y un dominio de señalización funcional de zeta. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 16 y la secuencia de la SEQ ID NO: 17, en la que las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana por una región de bisagra. En una realización, la región de bisagra comprende la SEQ ID NO: 14. En una realización, la región de bisagra comprende la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49.

En otro aspecto, la divulgación pertenece a una molécula de CAR codificada que comprende una secuencia conductora de SEQ ID NO: 13, un dominio scFv que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 59, o una secuencia con una identidad de un 95-99 % con las mismas, una región de bisagra de la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49, un dominio transmembrana que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 15, un dominio coestimulante 4-1BB que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 16 o un dominio coestimulante CD27 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 51, y un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 43. En un caso, la molécula CAR codificada comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42 y SEQ ID NO:59, o una secuencia con una identidad del 95-99% de la misma.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que lo incluye o aislándolo directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el gen de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

La presente invención también proporciona vectores en los que se inserta un ADN de la presente invención. Los vectores procedentes de retrovirus tales como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células descendientes. Los vectores lentivíricos tienen la ventaja añadida frente a los vectores procedentes de oncorretrovirus, tales como los virus de la leucemia murina, de que pueden transducir células no proliferantes, tales como los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de una baja inmunogenicidad. Un vector retroviral también puede ser, por ejemplo, un vector gammaretroviral. Un vector gammaretroviral puede incluir, por ejemplo, un promotor, una señal de empaquetamiento (ψ), un sitio de unión del cebador (PBS), una o más (por ejemplo, dos) repeticiones terminales largas (LTR) y un transgén de interés, por ejemplo, un gen que codifica un CAR. Un vector gammarretrovírico puede carecer de genes estructurales víricos tales como gag, pol y env. Los vectores gammaretrovirales ejemplares incluyen el virus de la leucemia murina (MLV), el virus formador de focos en el bazo (SFFV) y el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), y los vectores derivados de ellos. Se describen otros vectores gammaretrovirales, por ejemplo, en Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. junio de 2011; 3(6): 677-713.

En otra realización, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el CAR deseado de la invención es un vector adenovírico (A5/35). En otra realización, la expresión de los ácidos nucleicos que codifican CAR se puede

lograr utilizando transposones tales como sleeping beauty, crispr, CAS9 y nucleasas de dedos de zinc. Véase,más adelante June et al. *2009Nature Reviews Immunology* 9.10: 704-716.

Un vector también puede incluir, p. ej., una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de la transcripción (p. ej., gen de la Hormona de Crecimiento Bovina (BGH, por sus siglas en inglés)), un elemento que permite la replicación episómica y la replicación en procariotas (p. ej., origen de VS40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y/o elementos para permitir la selección (p. ej., gen de resistencia a la ampicilina y/o marcador de zeocina).

En un breve resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican CAR se logra típicamente uniendo operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o porciones del mismo a un promotor e incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e integración de eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de la transcripción y de la traducción, secuencias de iniciación, y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

En algunos aspectos, las construcciones de expresión de la presente invención también se pueden utilizar para la inmunización con ácidos nucleicos y la terapia génica, utilizando protocolos de suministro de genes convencionales. En la técnica, se conocen métodos para el suministro de genes. Véanse, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. N.º 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otra realización, la invención proporciona un vector de terapia génica.

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

Además, el vector de expresión puede proporcionarse a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, sin carácter limitante, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios para endonucleasas de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables (por ejemplo, documentos WO 01/96584; WO 01/29058; y Pat de EE.UU. N.º 6 326 193).

Se ha desarrollado un cierto número de sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de suministro de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales utilizando técnicas conocidas en la técnica. El virus recombinante puede luego aislarse y administrarse a las células del sujeto in vivo o ex vivo. Se conocen en la técnica varios sistemas retrovirales. En algunas realizaciones, se usan vectores adenovíricos. En la técnica se conocen varios vectores adenovíricos. En una realización, se usan vectores lentivíricos.

Elementos promotores adicionales, p. ej., potenciadores, regulan la frecuencia del inicio de la transcripción. Típicamente, estos están ubicados en la región 30-110 pb aguas arriba del sitio de inicio, aunque se ha demostrado que un cierto número de promotores contienen también elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio. El espaciamiento entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor de timidina quinasa (tk), el espaciamiento entre los elementos del promotor se puede incrementar a 50 pb antes de que la actividad comience a declinar. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción. Promotores ejemplares incluyen los promotores del gen IE de CMV, EF-1α, ubiquitina C o fosfogliceroquinasa (PGK). En una realización, el promotor es un promotor de PGK, p. ej., un promotor de PGK truncado como se describe en el presente documento.

Un ejemplo de un promotor que es capaz de expresar un transgén de CAR en un linfocito T de mamífero es el promotor EF1a. El promotor nativo EF1a impulsa la expresión de la subunidad alfa del complejo del factor de elongación-1, que es responsable del suministro enzimático de ARNts aminoacilados al ribosoma. El promotor EF1a se ha utilizado ampliamente en plásmidos de expresión de mamíferos y se ha demostrado que es eficaz para impulsar la expresión de CAR a partir de transgenes clonados en un vector lentiviral. Véase, p. ej., Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). En un aspecto, el promotor EF1a comprende la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 100.

Otro ejemplo de promotor es la secuencia del promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia de polinucleótido unida operativamente a ella. Sin embargo, también se pueden utilizar otras secuencias promotoras constitutivas, incluyendo, pero no limitado a, el promotor temprano del virus de simios

40 (SV40), el promotor del virus del tumor mamario del ratón (MMTV), el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, pero no limitado a, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor del factor de elongación-1α, el promotor de hemoglobina y el promotor de la creatina cinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de conectar la expresión de la secuencia polinucleotídica a la que está ligada operablemente cuando se desea una expresión de este tipo, o desconectar la expresión cuando no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, entre otros, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

Otro ejemplo de promotor es el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK). En algunas realizaciones, puede resultar deseable un promotor de PGK truncado (p. ej., un promotor de PGK con una o más, p. ej., 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300 o 400, deleciones de nucleótidos en comparación con la secuencia del promotor de PGK de tipo natural). Las secuencias de nucleótidos de promotores PGK ejemplares se proporcionan a continuación.

Promotor de WT PGK:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCA
CGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGT
GTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAG
AGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGC
GCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCAC
GCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCT
GAATCCCCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCT
AGGCCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCG
GCGACGCAAAGGGCCTTGGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGT
CCCGACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT (SEQ ID NO:
1323)

Promotores PGK truncados ejemplares:

PGK100:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCA
CGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGT
GTGATGGCGGGGTG (SEQ ID NO: 1324)

PGK200:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCA
CGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGT
GTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAG
AGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGC
GCGACGGTAACG (SEQ ID NO:1325)

PGK300:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCA
CGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGT
GTGATGGCGGGGTGTGGGGCCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAG
AGCCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGC
GCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCAC
GCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCT
GAATCCCCG (SEQ ID NO:1326)

PGK400:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCA
CGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGT
GTGATGGCGGGGTGTGGGGCCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAG
AGCCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGC
GCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCAC
GCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCT
GAATCCCCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCT
AGGCCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG
(SEQ ID NO:1327)

Un vector también puede incluir, p. ej., una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de la transcripción (p. ej., gen de la Hormona de Crecimiento Bovina (BGH, por sus siglas en inglés)), un elemento que permite la replicación episómica y la replicación en procariotas (p. ej., origen de VS40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y/o elementos para permitir la selección (p. ej., gen de resistencia a la ampicilina y/o marcador de zeocina).

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

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

En algunas realizaciones, el vector puede comprender dos o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican un CAR, por ejemplo, un primer CAR que se une a CD19 y un segundo CAR que se une específicamente a CD22. En tales realizaciones, las dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican el CAR están codificadas por una única molécula de ácido nucleico en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica. En este aspecto, los dos o más CAR pueden, p. ej., estar separados por uno o más sitios de escisión peptídica (por ejemplo, un sitio de autoescisión o un sustrato para una proteasa intracelular). Los ejemplos de sitios de escisión peptídica incluyen los siguientes, en donde los residuos GSG son opcionales:

T2A:	(GSG)EGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 1328)
P2A:	(GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 1329)
E2A:	(GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 1330)
F2A:	(GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 1331)

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

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. En la técnica se conocen bien métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Un método adecuado para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped es la transfección con fosfato de calcio.

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más utilizado para insertar genes en células de mamíferos, por ejemplo, humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. núms. 5.350.674 y 5.585.362.

Medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para uso como vehículo de administración in vitro e in vivo es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial). Existen otros métodos de administración dirigida de última generación de ácidos nucleicos, como la administración de polinucleótidos con nanopartículas dirigidas u otro sistema de administración adecuado de tamaño submicrométrico.

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

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

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

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

La presente invención proporciona además un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR. En un aspecto, un vector CAR se puede transducir directamente en una célula, p. ej., una célula T. En un aspecto, el vector es un vector de clonación o expresión, por ejemplo, un vector que incluye, pero no se limita a, uno o más plásmidos (por ejemplo, plásmidos de expresión, vectores de clonación, minicírculos, minivectores, cromosomas de doble minuto), construcciones de vectores retrovirales y lentivirales. En un aspecto, el vector es capaz de expresar la construcción CAR en células T de mamíferos. En un aspecto, la célula T de mamífero es una célula T humana.

Células efectoras inmunitarias que expresan un CAR

En otro aspecto, la presente invención proporciona una población de células que expresan CAR. En algunas realizaciones, la población de células que expresan CAR comprende una célula que expresa uno o más CAR de acuerdo con las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la población de células que expresan CAR comprende una mezcla de células que expresan diferentes CAR.

Por ejemplo, en una realización, la población de células CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno a un antígeno tumoral descrito en este documento, por ejemplo, CD19, y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno a CD22.

Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión al antígeno para un antígeno tumoral descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión al antígeno para una diana distinto de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento. En una realización, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización intracelular primario y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario. Cualquiera de las células que expresan CAR, o ambas, pueden tener un promotor de PGK truncado, p. ej., como se describe en el presente documento, unido operativamente al ácido nucleico que codifica el CAR.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una población de células en la que al menos una célula en la población expresa un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno a un antígeno tumoral de acuerdo con las reivindicaciones, y una segunda célula que expresa otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Las células que expresan CAR de la población pueden tener un promotor de PGK truncado, p. ej., como se describe en el presente documento, unido operativamente al ácido nucleico que codifica el CAR. En una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, p. ej., PD-1, pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de organizar una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 or CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFRbeta). En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora tal como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD 160, 2B4 o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos, y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en este documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, CD27, OX40 o CD28, por ejemplo, como se describe en este documento) y/o un dominio de señalización primario (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en este documento). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD-1 o un fragmento de este, y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej., un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento).

Coexpresión de CAR con otras moléculas o agentes

Coexpresión de un segundo CAR

En un aspecto, la célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones puede comprender además un segundo CAR, por ejemplo, un segundo CAR que incluye un dominio de unión a antígeno diferente. En una realización, el segundo CAR incluye un dominio de unión a antígeno a una diana expresada en células de leucemia mieloide aguda, tales como, por ejemplo, CD20, CD22, ROR1, CD10, CD33, CLL-1, CD34, CD123, FLT3, CD79b, CD179b y CD79a. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que se dirige a un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que se dirige a un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario pero no un dominio de señalización coestimulador. Si bien no se pretende estar limitado por la teoría, la colocación de un dominio de señalización coestimulador, por ejemplo, 4-1BB, CD28, CD27 u OX-40, en el primer CAR, y el dominio de señalización primario, por ejemplo, CD3 zeta, en el segundo CAR puede limitar la actividad del CAR a las células en las que se expresan ambas dianas. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR CD 19 que incluye un dominio de unión a CD 19, un dominio transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que se dirige a CD22 e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario. En otra realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR CD19 que incluye un dominio de unión a CD19, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario y un segundo CAR que se dirige a CD22 e incluye un dominio de unión a antígeno al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización coestimulador.

En un aspecto, la célula que expresa CAR descrita en este documento puede comprender además un segundo CAR. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que se dirige a un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que se dirige a un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario pero no un dominio de señalización coestimulador. La colocación de un dominio de señalización coestimulante, p. ej., 4-1BB, CD28, CD27, OX-40 o ICOS, en el primer CAR, y el dominio de señalización primario, p. ej., CD3 zeta, en el segundo CAR puede limitar la actividad de CAR a las células en donde se expresan ambas dianas. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que fija como objetivo otro antígeno e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización primario. En otra realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización primario y un segundo CAR que fija como objetivo otro antígeno e incluye un dominio de unión al antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización coestimulador.

En una realización, la célula que expresa CAR comprende un XCAR de acuerdo con las reivindicaciones y un CAR inhibidor. En una realización, el CAR inhibidor comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno que se encuentra en células normales pero no en células cancerosas, por ejemplo, células normales que también expresan CD19. En una realización, el CAR inhibidor comprende el dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula inhibidora. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR inhibidor puede ser un dominio intracelular PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFR beta).

En una realización, cuando la célula que expresa CAR comprende dos o más CAR diferentes, los dominios de unión al antígeno de los diferentes CAR pueden ser tales que los dominios de unión al antígeno no interactúen entre sí. Por ejemplo, una célula que expresa un primer y un segundo CAR puede tener un dominio de unión al antígeno del primer CAR, p. ej., como un fragmento, p. ej., un scFv, que no forma una asociación con el dominio de unión al antígeno del segundo CAR, p. ej., el dominio de unión al antígeno del segundo CAR es un VHH.

Coexpresión de un agente que potencia la actividad del CAR

En otro aspecto, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede expresar, además, otro agente, p. ej., un agente que potencia la actividad o idoneidad de una célula que expresa CAR.

Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de linfocitos T. En algunas realizaciones, la molécula que modula o regula la función de linfocitos T es una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, p. ej., PD1, pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de organizar una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFR beta).

En una realización, un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ARNbc, p. ej., un ARNip o ARNhc, grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR), una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) o una endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), p. ej., como se describe en el presente documento, puede utilizarse para inhibir la expresión de una molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T en la célula que expresa CAR. En una realización, el agente es un ARNhc, p. ej., un ARNhc descrito en el presente documento. En una realización, el agente que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T es inhibido dentro de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de una molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T está ligada al ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes, del CAR.

En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, p. ej., de una molécula inhibidora tal como PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina o TGFR (p. ej., TGFR beta), o un fragmento de cualquiera de estos (p. ej., al menos una parte de un dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej., que comprende un dominio coestimulante (p. ej., 41BB, CD27 o CD28, p. ej., como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (p. ej., un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento de este (p. ej., al menos una porción de un dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej. un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento). PD1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en células B activadas, células T y células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Se ha demostrado que dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 regulan a la baja la activación de células T al unirse a PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). La inmunosupresión se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD1 con PD-L1.

En una realización, el agente comprende el dominio extracelular (ECD) de una molécula inhibidora, por ejemplo, Muerte Programada 1 (PD1), puede fusionarse a un dominio transmembrana y dominios de señalización intracelular tales como 41BB y CD3 zeta (también denominados en este documento como un CAR PD 1). El CAR PD1, cuando se utiliza en combinación con un CAR CD 19 descrito en este documento, puede mejorar la persistencia de la célula T. En una realización, el CAR es un CAR PD1 que comprende el dominio extracelular de PD1 indicado como subrayado en la SEQ ID NO: 121. En una realización, el CAR PD1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:121.

Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdk
laafpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagq
fqtlvttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfm
rpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqegl
ynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr (SEQ ID NO:121)

En una realización, el CAR PD1 comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada a continuación (SEQ ID NO: 119).

pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcrfrvt
qlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpaggfqtlvttpaprpptpaptia
sqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpee
eeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig
mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr (SEQ ID NO:119).

En una realización, el agente comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el PD1 CAR, por ejemplo, el PD1 CAR descrito en este documento. En una realización, la secuencia de ácido nucleico para el PD1 CAR se muestra a continuación, con el ECD PD1 subrayado a continuación en la SEQ ID NO: 120

atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctcgcactcctgctccacgccgctagaccacccggatggtttctggact
ctccggatcgccccttggaatccccccaaccttctcaccgtgcactcttggttctgactgaggtgcgtaatgcgaccttcacgtgctcgtt
ctccaacacctccgaatcattcgtgctgaactggtaccgcatgagcccgtcaaaccagaccgacaagctcgccgccgtttccggaaag
atcggtcgcaaccgggacaggattgtcgtttccgcgtgactcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgct
aggcgaaacgactccgggacctacctgtgcggagccatctcgctggccctaagccccaaatcaaagagagcttgagggtccgaa
ctgagagtgaccgagcgcttcgagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgccttcgccttcgtggtcacgttttcagaccctagg
tcacgaccactccggcgccgccgccccaccgactccggccccaactatcgcgagccagccccttgtcgctgaggccggaagcatgc
cgccctgccgccggaggtgctgtgcatacccggggatttggacttcgcatgcgacatctacatttgggctcctctcgccggaacttgt
ggcgtgctccttctgtccctggtcatcaccctgtactgcaagcgggggtcggaaaaagcttctgtacatttcaagcagccctttcatgag
gccccgtgcaaaccacccaggaggaggacggttgctcctgccggttccccgaagaggaagaaggaggttgcgagctgcgcgtga
agttctcccggagcgccgacgcccccgcctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcgggaa
gagtacgatgtgctggacaagcggcgcggccgggaccccgaaatgggcgggaagcctagaagaaagaaccctcaggaaggcc
tgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgaggcctactccgaaattgggatgaaggggagcggcggaggggaaagggg
gcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccgccaccaaggacacatacgatgccctgcacatgcaggccctccccctcgc

(SEQ ID NO: 120).

En otro ejemplo, en una realización, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR puede ser una molécula coestimuladora o un ligando de molécula coestimuladora. Los ejemplos de moléculas coestimulantes incluyen la molécula del MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll, así como OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). Otros ejemplos de dichas moléculas coestimulantes incluyen CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8alpha, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alpha, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD 19a, y un ligando que se une específicamente con CD83, por ejemplo, como se describe en este documento. Los ejemplos de ligandos de moléculas coestimuladoras incluyen CD80, CD86, CD40L, ICOSL, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL y LIGHT. En algunas realizaciones, el ligando de la molécula coestimuladora es un ligando para una molécula coestimuladora diferente del dominio de la molécula coestimuladora del CAR. En algunas realizaciones, el ligando de la molécula coestimuladora es un ligando para una molécula coestimuladora que es el mismo que el dominio de la molécula coestimuladora del CAR. En una realización, el ligando de la molécula coestimuladora es 4-1BBL. En una realización, el ligando coestimulador es CD80 o CD86. En una realización, el ligando de la molécula coestimuladora es CD70. En realizaciones, una célula efectora inmunitaria que expresa CAR descrita en el presente documento se puede modificar adicionalmente para expresar una o más moléculas coestimuladoras adicionales o ligandos de moléculas coestimuladoras.

Coexpresión de CAR con un receptor de quimiocinas

En realizaciones, la célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones comprende además una molécula de receptor de quimiocina. La expresión transgénica de los receptores de quimiocinas CCR2b o CXCR2 en células T mejora el tráfico hacia tumores sólidos secretores de CCL2 o CXCL1, incluidos el melanoma y el neuroblastoma (Craddock et al., J Immunother. Octubre de 2010; 33(8):780-8 y Kershaw et al., Hum Gene Ther. 1 de noviembre de 2002; 13(16): 1971-80). Por lo tanto, sin desear quedar ligados a la teoría, se cree que los receptores de quimiocinas expresados en células que expresan CAR que reconocen quimiocinas secretadas por tumores, p. ej., tumores sólidos, pueden mejorar la migración dirigida de la célula que expresa CAR al tumor, facilitar la infiltración de la célula que expresa CAR en el tumor y potenciar la eficacia antitumoral de la célula que expresa CAR. La molécula receptora de quimiocinas puede comprender un receptor de quimiocinas de origen natural o recombinante o un fragmento de unión a quimiocinas de este. Una molécula receptora de quimiocinas adecuada para la expresión en una célula que expresa CAR descrita en el presente documento incluye un receptor de quimiocinas CXC (p. ej., CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 o CXCR7), un receptor de quimiocinas CC (p. ej., CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 o CCR11), un

receptor de quimiocinas CX3C (p. ej., CX3CR1), un receptor de quimiocinas XC (p. ej., XCR1), o un fragmento de unión a quimiocinas de estos. En una realización, la molécula del receptor de quimiocina que se expresará con un CAR se selecciona en función de la(s) quimiocina(s) secretada(s) por el tumor. En una realización, la célula que expresa CAR comprende además, por ejemplo, expresa, un receptor CCR2b o un receptor CXCR2. En una realización, el CAR y la molécula del receptor de quimiocina están en el mismo vector o están en dos vectores diferentes. En realizaciones en las que el CAR y la molécula del receptor de quimiocina están en el mismo vector, el CAR y la molécula del receptor de quimiocina están cada uno bajo el control de dos promotores diferentes o están bajo el control del mismo promotor.

Expresión condicional de agentes potenciadores de la respuesta inmunitaria

También se describen en este documento composiciones y métodos para expresar condicionalmente un agente que mejora la respuesta o actividad inmune de una célula que expresa CAR descrita en este documento.

En un aspecto, la presente divulgación presenta una célula efectora inmunitaria que está genomodificada para expresar constitutivamente un CAR, también denominado en el presente documento CAR no condicional. En una realización, un CAR no condicional como se describe en este documento comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD22. En realizaciones, la célula efectora inmunitaria que expresa CAR no condicional comprende además un agente expresado condicionalmente que mejora la eficacia terapéutica, por ejemplo, la respuesta inmunitaria, de la célula efectora inmunitaria que expresa CAR. En tales realizaciones, la expresión del agente expresado condicionalmente ocurre tras la activación de la célula efectora inmune que expresa CAR no condicional, por ejemplo, tras la unión de la molécula CAR no condicional a su diana.

Los agentes potenciadores de la respuesta inmunitaria como se describe en el presente documento pueden caracterizarse por uno o más de lo siguiente: 1) se dirige o se une a un antígeno asociado al cáncer diferente al objetivo del CAR no condicional; 2) inhibe la expresión o actividad de un punto de control inmunitario o molécula inhibidora; y/o 3) activa la expresión y/o secreción de un componente que potencia la respuesta inmunitaria o la activación de una célula efectora inmunitaria. El agente potenciador de la respuesta inmunitaria puede ser un polipéptido o un ácido nucleico, p. ej., un ácido nucleico que codifica un polipéptido que potencia la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de agentes expresados condicionalmente que potencian la respuesta inmunitaria incluyen, pero sin limitación, un CAR adicional (denominado CAR condicional); una molécula basada en TCR (p. ej., un TCR-CAR); un inhibidor de un punto de control inmunitario o una molécula inhibidora; y/o una citocina. En realizaciones, el CAR condicional se une a un antígeno asociado a cáncer diferente al que se dirige el CAR no condicional. En realizaciones, el inhibidor de un punto de control inmunitario o molécula inhibidora descrito en este documento es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, un ARNi o ARNhc), o una molécula pequeña que inhibe o disminuye la actividad de un punto de control inmunitario o molécula inhibidora seleccionada de PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (e.g., CEACAM-1, CEACAM-3 and/or CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 or CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina, o TGFR beta. En algunas realizaciones, la citocina comprende IL-2, IL-7, IL-15 o IL-21, o fragmentos funcionales o derivados de las mismas.

En algunas realizaciones, la célula efectora inmunitaria comprende un CAR no condicional y uno o más CAR condicionales, en la que el CAR condicional se une a un antígeno asociado al cáncer diferente al que se dirige el CAR no condicional. A modo de ejemplo, en una realización, una célula efectora inmune comprende un CAR no condicional que se une a CD19 y uno o más CAR condicionales que se unen a CD22. En otra realización, una célula efectora inmune comprende un CAR no condicional que se une a CD22 y un CAR condicional que se une a CD 19.

La expresión condicional del agente que potencia la respuesta inmunitaria tras la activación de la célula efectora inmunitaria que expresa CAR se logra uniendo operativamente una región de control condicional de activación al agente que potencia la respuesta inmunitaria (p. ej., a una secuencia de ácido nucleico que codifica tal agente). En una realización, la región de control condicional de activación comprende una secuencia promotora que inicia la expresión, por ejemplo, la transcripción, del agente potenciador de la respuesta inmunitaria unido operativamente tras la activación de la célula efectora inmunitaria. En una realización, la región de control condicional de activación comprende una o más secuencias reguladoras (por ejemplo, una secuencia o sitio de unión de un factor de transcripción) que facilitan el inicio de la expresión tras la activación de la célula efectora inmunitaria. En algunas realizaciones, la región de control condicional de activación comprende una secuencia promotora y/o una o más secuencias de unión a factores de transcripción de una secuencia promotora o reguladora de un gen que se regula positivamente tras uno o más de los siguientes: activación de células efectoras inmunitarias (por ejemplo, células T), diferenciación de células T, polarización de células T o desarrollo de células T auxiliares. Los ejemplos de dichos genes incluyen, pero sin limitación, NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados), ATF2 (factor de transcripción activador 2), NF-κB (factor nuclear-κB), IL-2, receptor de IL-2 (IL-2R), IL-3, GM-CSF, IL-4, IL-10 e IFN-γ.

En una realización, la región de control condicional de activación comprende una o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más, secuencias o sitios de unión de NFAT. En algunas realizaciones, la secuencia de unión a NFAT en el promotor comprende (5'-GGAAA-3') (SEQ ID NO: 1312), situada opcionalmente en una secuencia consenso más larga de 5' (A/T)GGAAA(A/N)(A/T/C)N 3' (SEQ ID NO: 1313). En algunas realizaciones, la secuencia de unión de NFAT es una secuencia similar a xb, como GGGACT (SEQ ID NO: 1314). (Véase, Gibson et al., The Journal of Immunology, 2007, 179: 3831-3840.)

En una realización, la región de control condicional de activación comprende además un promotor de IL-2 (o un promotor de IL-2 mínimo), un promotor de IL-2R, un promotor de ATF2 o un promotor de NF-κB, o cualquier fragmento funcional o derivado del mismo. En una realización, la región de control condicional de activación comprende una o más secuencias de unión a NFAT, por ejemplo, 3 o 6 secuencias de unión a NFAT, y un promotor de IL-2, por ejemplo, un promotor mínimo de IL-2. En una realización, la región de control condicional de activación comprende la secuencia de

AGCTTGGATCCAAGAGGAAAATTTGTTTCATACAGAAGGCGTTAAGAGGAAAA

TTTGTTTCATACAGAAGGCGTTAAGAGGAAAATTTGTTTCATACAGAAGGCGTT

CAAGCTTGTCGAC (SEQ ID NO: 1315).

Fuentes de Células

Antes de la expansión y modificación genética u otra modificación, puede obtenerse de un sujeto una fuente de células, p. ej., células T o células asesinas naturales (NK). Ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, monos, chimpancés, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de estos. Las células T pueden obtenerse de varias fuentes, incluidas células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, las células efectoras inmunes, por ejemplo, las células T, se pueden obtener a partir de una unidad de sangre extraída de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la técnica, como la separación con Ficoll™. En un aspecto, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis contiene típicamente linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y, opcionalmente, colocar las células en un tampón o medio apropiado para los pasos de procesamiento posteriores. En una realización, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, los cationes divalentes.

Las etapas de activación iniciales en ausencia de calcio pueden conducir a una activación magnificada. Como los expertos apreciarán fácilmente, se puede realizar una etapa de lavado mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, como por ejemplo utilizando una centrífuga de "flujo continuo" semiautomatizada (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saver 5) según las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, como, por ejemplo, PBS sin Ca, sin Mg, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Alternativamente, se pueden eliminar los componentes indeseables de la muestra de aféresis y resuspender las células directamente en el medio de cultivo.

Se reconoce que los métodos de aplicación pueden utilizar condiciones de medios de cultivo que comprenden un 5 % o menos, por ejemplo, un 2 %, de suero AB humano, y pueden emplear condiciones y composiciones de medios de cultivo conocidas, por ejemplo, las descritas en Smith *et al.*, "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" *Clinical & Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi:. 10.1038/cti.2014.31.

En un aspecto, las células T se aíslan de los linfocitos de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y el agotamiento de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente de PERCOLLTM o mediante elutriación centrífuga a contraflujo.

Los métodos descritos en este documento pueden incluir, por ejemplo, la selección de una subpoblación específica de células efectoras inmunes, por ejemplo, células T, que son una población agotada de células reguladoras T, células agotadas de CD25+, utilizando, por ejemplo, una técnica de selección negativa, por ejemplo, descrita en este documento. En algunas realizaciones, la población de células T reguladoras agotadas contiene menos del 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de células CD25+.

En una realización, las células T reguladoras, por ejemplo, las células T CD25+, se eliminan de la población utilizando un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, IL-2. En una realización, el anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o el ligando de unión a CD25 se conjuga con un sustrato, por ejemplo, una perla, o se recubre de otro modo sobre un sustrato, por ejemplo, una perla. En una realización, el anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, se conjuga con un sustrato como se describe en este documento.

En una realización, las células T reguladoras, por ejemplo, las células T CD25+, se eliminan de la población utilizando el reactivo de depleción de CD25 de Miltenyi™. En una realización, la relación de células con respecto al reactivo de depleción de CD25 es de 1e7 células por 20 ul, o de 1e7 células por 15 ul, o de 1e7 células por 10 ul, o de 1e7 células por 5 ul, o de 1e7 células por 2,5 ul, o de 1e7 células por 1,25 ul. En una realización, por ejemplo, para células T reguladoras, por ejemplo, depleción de CD25+, se utilizan más de 500 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 600, 700, 800 o 900 millones de células/ml.

En una realización, la población de células efectoras inmunes que se va a agotar incluye aproximadamente 6 × 10^9 células T CD25+. En otros aspectos, la población de células efectoras inmunes que se agotarán incluye aproximadamente entre 1 × 10^9 y 1 × 10^{10} células T CD25+ y cualquier valor entero intermedio. En una realización, la población resultante de células con agotamiento de linfocitos T tiene 2 x 10^9 linfocitos T reguladores, por ejemplo, células CD25+, o menos (por ejemplo, 1 x 10^9, 5 x 10^8, 1 x 10^8, 5 x 10^7, 1 x 10^7 o menos células CD25+).

En una realización, los linfocitos T reguladores, por ejemplo, células CD25+, se eliminan de la población usando el sistema CliniMAC con un conjunto de tubos de agotamiento tales como, por ejemplo, los tubos 162-01. En una realización, el sistema CliniMAC se ejecuta en una configuración de agotamiento tal como, por ejemplo, DEPLETION2.1.

Sin desear ceñirse a una teoría en particular, la disminución del nivel de reguladores negativos de las células inmunitarias (p. ej., disminución del número de células inmunitarias no deseadas, p. ej., linfocitos T_{REG}) en un sujeto antes de la aféresis o durante la fabricación de un producto de tipo célula que expresa CAR reduce significativamente el riesgo de recaídas del sujeto. Por ejemplo, en la técnica existe constancia de métodos para la depleción de los linfocitos T_{REG}. Los métodos para disminuir los linfocitos T_{REG} incluyen, pero sin limitación, ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR (un anticuerpo anti-GITR descrito en el presente documento), agotamiento de CD25, inhibidor de mTOR y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los métodos de fabricación comprenden reducir el número de (por ejemplo, agotar) células T_{REG} antes de la fabricación de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los métodos de fabricación comprenden poner en contacto la muestra, por ejemplo, la muestra de aféresis, con un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-CD25 (o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25), por ejemplo, para agotar las células T_{REG} antes de la fabricación del producto celular que expresa CAR (por ejemplo, célula T, célula NK).

Sin desear quedar ligados a una teoría en particular, la disminución del nivel de reguladores negativos de las células inmunitarias (p. ej., disminución del número de células inmunitarias no deseadas, p. ej., linfocitos T_{REG}) en un sujeto antes de la aféresis o durante la producción de un producto de tipo célula que expresa CAR puede reducir el riesgo de una recaída de T_{REG}. En una realización, un sujeto recibe un tratamiento previo con una o más terapias que reducen las células TREG antes de la recolección de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, lo que reduce el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR. En una realización, los métodos para disminuir las células T_{REG} incluyen, entre otros, la administración al sujeto de uno o más de los siguientes: ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25 o una combinación de los mismos. En una realización, los métodos para disminuir las células T_{REG} incluyen, entre otros, la administración al sujeto de uno o más de los siguientes: ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25, inhibidor de mTOR o una combinación de los mismos. La administración de uno o más de los siguientes compuestos: ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, anticuerpo de depleción de CD25 o una combinación de estos, puede ocurrir antes, durante o después de una infusión del producto celular que expresa CAR. La administración de uno o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, agotamiento de CD25, inhibidor de mTOR, o una combinación de los mismos, puede realizarse antes, durante o después de una infusión del producto de tipo célula que expresa CAR.

En algunas realizaciones, los métodos de fabricación comprenden reducir el número de (por ejemplo, agotar) células T_{REG} antes de la fabricación de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los métodos de fabricación comprenden poner en contacto la muestra, por ejemplo, la muestra de aféresis, con un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-CD25 (o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25), por ejemplo, para agotar las células T_{REG} antes de la fabricación del producto celular que expresa CAR (por ejemplo, célula T, célula NK).

En una realización, un sujeto recibe un tratamiento previo con una o más terapias que reducen las células T_{REG} antes de la recolección de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, lo que reduce el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR. En una realización, los métodos para disminuir las células T_{REG} incluyen, entre otros, la administración al sujeto de uno o más de los siguientes: ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25 o una combinación de los mismos. La administración de

uno o más de los siguientes compuestos: ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, anticuerpo de depleción de CD25 o una combinación de estos, puede ocurrir antes, durante o después de una infusión del producto celular que expresa CAR.

En una realización, un sujeto recibe un tratamiento previo con ciclofosfamida antes de la recolección de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, lo que reduce el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR. En una realización, un sujeto recibe un tratamiento previo con un anticuerpo anti-GITR antes de la recolección de células para la fabricación de un producto celular que expresa CAR, lo que reduce el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR.

En una realización, la población de células que se va a eliminar no son células T reguladoras ni células tumorales, sino células que de otro modo afectan negativamente la expansión y/o función de las células CART, por ejemplo, células que expresan CD14, CD11b, CD33, CD15 u otros marcadores expresados por células potencialmente inmunosupresoras. En una realización, se prevé que dichas células se eliminen simultáneamente con las células T reguladoras y/o las células tumorales, o después de dicho agotamiento, o en otro orden.

Los métodos descritos en este documento pueden incluir más de una etapa de selección, por ejemplo, más de una etapa de agotamiento. El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr, por ejemplo, con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales puede incluir anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

Los métodos descritos en este documento pueden incluir además la eliminación de células de la población que expresan un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral que no comprende CD25, por ejemplo, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 o CD11b, para proporcionar de este modo una población de células T reguladoras agotadas, por ejemplo, agotadas de CD25+, y células agotadas de antígeno tumoral que son adecuadas para la expresión de un CAR, por ejemplo, un CAR descrito en este documento. En una realización, las células que expresan antígenos tumorales se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, p. ej., células CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, y un anticuerpo anti-antígeno tumoral, o un fragmento del mismo, se pueden unir al mismo sustrato, por ejemplo, una perla, que se puede utilizar para eliminar las células, o un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o el anticuerpo anti-antígeno tumoral, o un fragmento del mismo, se pueden unir a perlas separadas, una mezcla de las cuales se puede utilizar para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de células T reguladoras, por ejemplo, células CD25+, y la eliminación de las células que expresan antígeno tumoral es secuencial y puede ocurrir, por ejemplo, en cualquier orden.

También se proporcionan métodos que incluyen eliminar células de la población que expresan un inhibidor de puntos de control, por ejemplo, un inhibidor de puntos de control descrito en esta memoria, por ejemplo, una o más células PD1+, células LAG3+ y células TIM3+, para proporcionar de esta manera una población de células con agotamiento de linfocitos T reguladores, p. ej., células con agotamiento de CD25+, y células con agotamiento de inhibidores de puntos de control, p. ej., células con agotamiento de PD1+, LAG3+ y/o TIM3+. Los inhibidores de puntos de control ilustrativos incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFRbeta), p. ej., como los descritos en el presente documento. En una realización, las células que expresan inhibidores de puntos de control se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, por ejemplo, las células CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, y un anticuerpo anti-inhibidor del punto de control, o fragmento del mismo, pueden unirse a la misma perla que se puede utilizar para eliminar las células, o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, y el anticuerpo anti-inhibidor del punto de control, o fragmento del mismo, pueden unirse a perlas separadas, una mezcla de las cuales puede utilizarse para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de células T reguladoras, por ejemplo, células CD25+, y la eliminación de las células que expresan el inhibidor del punto de control es secuencial y puede ocurrir, por ejemplo, en cualquier orden.

Los métodos descritos en este documento pueden incluir una etapa de selección positiva. Por ejemplo, las células T se pueden aislar mediante incubación con perlas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (por ejemplo, 3x28), como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En un aspecto, el periodo de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En un aspecto adicional, el periodo de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto adicional, el periodo de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En aún otro aspecto, el periodo de tiempo es de 10 a 24 horas. En un aspecto, el periodo de tiempo de incubación es de 24 horas. Se pueden utilizar tiempos de incubación más largos para aislar linfocitos T en cualquier situación en la que haya pocos linfocitos T en comparación con otros tipos de células, tal como en el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) del

tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más prolongados puede aumentar la eficiencia de captura de linfocitos T CD8+. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo en que se permite que los linfocitos T se unan a las perlas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de perlas con respecto a linfocitos T (como se describe más adelante en el presente documento), se puede seleccionar preferentemente subpoblaciones de linfocitos T a favor o en contra en el inicio del cultivo o en otros puntos temporales durante el proceso. Adicionalmente, al aumentar o disminuir la relación de anticuerpos anti CD3 y/o anti CD28 en las perlas u otra superficie, se puede seleccionar preferentemente a favor o en contra de las subpoblaciones de linfocitos T en el inicio del cultivo o en otros puntos temporales deseados.

En una realización, se puede seleccionar una población de linfocitos T que exprese uno o más de IFN-γ, TNFα, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B y perforina u otras moléculas apropiadas, por ejemplo, otras citocinas. Se pueden determinar métodos para el cribado de la expresión celular, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la Publicación PCT N.º: WO 2013/126712.

Para aislar una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y de la superficie (por ejemplo, partículas como perlas). En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (por ejemplo, aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las perlas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de aproximadamente 10 mil millones de células/ml, 9 mil millones/ml, 8 mil millones/ml, 7 mil millones/ml, 6 mil millones/ml o 5 mil millones/ml. En un aspecto, se utiliza una concentración de mil millones de células/ml. En un aspecto, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En otros aspectos, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml.

El uso de altas concentraciones puede resultar en un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos de interés, como las células T CD28-negativas, o de muestras en las que hay muchas células tumorales presentes (por ejemplo, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Estas poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una concentración elevada de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

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

En otros aspectos, las células pueden incubarse en un rotador durante distintos períodos de tiempo y a distintas velocidades, ya sea a 2-10 ºC o a temperatura ambiente.

Las células T para estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. Sin querer limitarnos a la teoría, la etapa de congelación y posterior descongelación proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien se conocen en la técnica muchas soluciones y parámetros de congelación que serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contiene 20% de DMSO y 8% de albúmina sérica humana, o medios de cultivo que contienen 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% de albúmina sérica humana y 7,5% de DMSO, o 31,25% de Plasmalyte-A, 31,25% de dextrosa al 5%, 0,45% de NaCl, 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% de albúmina sérica humana y 7,5% de DMSO u otros medios de congelación de células adecuados que contienen, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A; luego, las células se congelan a -80 ºC a una velocidad de 1º por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlada además de la congelación no controlada inmediatamente a -20 ºC o en nitrógeno líquido.

En ciertos aspectos, las células criopreservadas se descongelan y se lavan como se describe en este documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación utilizando los métodos de la presente divulgación.

También se contempla en el contexto de la invención la recolección de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior a cuando las células expandidas como se describe en este documento podrían ser necesarias. Como tal, la fuente de las células que se va a expandir se puede recoger en cualquier momento necesario y las células deseadas, tales como células T, se pueden aislar y congelar para su uso posterior en la terapia con células efectoras inmunitarias para cualquiera de un cierto número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia con células efectoras inmunitarias, tales como las descritas en esta

memoria. En un aspecto, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En ciertos aspectos, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y se congelan para su uso posterior. En ciertos aspectos, las células T pueden expandirse, congelarse y utilizarse en un momento posterior. En ciertos aspectos, se recogen muestras de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular como se describe en este documento, pero antes de cualquier tratamiento. En un aspecto adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, entre otras, el tratamiento con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación.

En un aspecto adicional de la presente invención, las células T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento que deja al sujeto con células T funcionales. En este sentido, se ha observado que después de ciertos tratamientos contra el cáncer, en particular tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunológico, poco después del tratamiento durante el período en el que los pacientes normalmente se estarían recuperando del tratamiento, la calidad de las células T obtenidas puede ser óptima o mejorada por su capacidad de expandirse ex vivo. Asimismo, después de la manipulación ex vivo utilizando los métodos descritos en este documento, estas células pueden estar en un estado preferido para un mejor injerto y expansión in vivo. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente invención recoger células de la sangre, incluidos linfocitos T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en determinados aspectos, la movilización (por ejemplo, la movilización con GM-CSF) y las pautas de acondicionamiento se pueden utilizar para crear una condición en un sujeto en donde se favorezca la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos de células particulares, especialmente durante una ventana de tiempo definida después de la terapia. Los tipos de células ilustrativos incluyendo células T, células B, células dendríticas, y otras células del sistema inmune.

En una realización, las células efectoras inmunes que expresan una molécula CAR se obtienen de un sujeto que ha recibido una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora la inmunidad. En una realización, la población de células efectoras inmunes, por ejemplo, células T, que se van a diseñar para expresar un CAR, se recolectan después de un tiempo suficiente, o después de una dosificación suficiente de la dosis baja que mejora la inmunidad de un inhibidor de mTOR, de modo que el nivel de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T, o la proporción de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T/células efectoras inmunes PD1 positivas, por ejemplo, células T, en el sujeto o recolectadas del sujeto se ha incrementado, al menos transitoriamente.

En otras realizaciones, la población de células efectoras inmunes, por ejemplo, células T, que tienen o serán diseñadas para expresar un CAR, se pueden tratar ex vivo mediante el contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T, o aumenta la proporción de células efectoras inmunes PD1 negativas, por ejemplo, células T/células efectoras inmunes PD1 positivas, por ejemplo, células T.

En una realización, una población de linfocitos T es deficiente en diacilglicerol cinasa (DGK). Las células deficientes en DGK incluyen células que no expresan ARN o proteína de DGK, o que tienen una actividad de DGK reducida o inhibida. Las células deficientes en DGK se pueden generar mediante enfoques genéticos, p. ej., administrando agentes de interferencia por ARN, p. ej., ARNip, ARNhc, miARN, para reducir o evitar la expresión de DGK. Como alternativa, las células deficientes en DGK se pueden generar mediante tratamiento con los inhibidores de DGK descritos en esta memoria.

En una realización, una población de células T es deficiente en Ikaros. Las células deficientes en Ikaros incluyen células que no expresan ARN o proteína de Ikaros, o tienen una reducción o inhibición de la actividad de Ikaros, las células deficientes en Ikaros se pueden generar mediante estrategias genéticas, p. ej., administrando agentes de interferencia por ARN, p. ej., ARNip, ARNhc, miARN, para reducir o evitar la expresión de Ikaros. Como alternativa, las células deficientes en Ikaros se pueden generar mediante tratamiento con inhibidores de Ikaros, p. ej., lenalidomida.

En realizaciones, una población de células T es deficiente en DGK y deficiente en Ikaros, p. ej., no expresa DGK ni Ikaros, o tiene una reducción o inhibición de la actividad de DGK e Ikaros. Células deficientes en DGK e Ikaros de este tipo se pueden generar mediante cualquiera de los métodos descritos en esta memoria.

En una realización, las células NK se obtienen del sujeto. En otra realización, las células NK son una línea celular NK, p. ej., la línea celular NK-92 (Conkwest).

CAR alogénico

En algunas realizaciones, la célula efectora inmune puede ser una célula efectora inmune alogénica, por ejemplo, una célula T o una célula NK. Por ejemplo, la célula puede ser una célula T alogénica, por ejemplo, una célula T alogénica que carece de expresión de un receptor de células T funcional (TCR) y/o antígeno leucocitario humano (HLA), por ejemplo, HLA clase I y/o HLA clase II.

Una linfocito T que carece de un TCR funcional puede diseñarse, por ejemplo, de manera que no exprese ningún TCR funcional en su superficie, diseñarse de tal manera que no exprese una o más subunidades que comprendan un TCR funcional (p. ej., diseñarse de tal manera que no exprese (o muestre una expresión reducida) de TCR alfa, TCR beta, TCR gamma, TCR delta, TCR épsilon y/o TCR zeta) o diseñado de tal manera que produzca muy poco TCR funcional en su superficie (p. ej., diseñado de tal manera que no exprese (o muestre una expresión reducida) de TCR alfa, TCR beta, TCR gamma, TCR delta, TCR épsilon y/o TCR zeta). Alternativamente, la célula T puede expresar un TCR sustancialmente deteriorado, por ejemplo, mediante la expresión de formas mutadas o truncadas de una o más de las subunidades del TCR. El término "TCR sustancialmente deteriorado" significa que este TCR no provocará una reacción inmunitaria adversa en un huésped.

La célula AT descrita en este documento puede, por ejemplo, diseñarse de manera que no exprese un HLA funcional en su superficie. Por ejemplo, una célula T descrita en este documento puede diseñarse de manera tal que la expresión de HLA en la superficie celular, por ejemplo, HLA clase 1 y/o HLA clase II, se regule negativamente. En algunas realizaciones, la disminución regulada de HLA se puede lograr reduciendo o eliminando la expresión de microglobulina beta-2 (B2M).

En algunas realizaciones, el linfocito T puede carecer de un TCR funcional y un HLA funcional, p. ej., HLA de clase I y/o HLA de clase II.

Las células T modificadas que carecen de expresión de un TCR y/o HLA funcional se pueden obtener por cualquier medio adecuado, incluida la eliminación o supresión de una o más subunidades de TCR o HLA. Por ejemplo, la célula T puede incluir una eliminación de TCR y/o HLA utilizando siRNA, shRNA, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), nucleasa efectora tipo activador de la transcripción (TALEN) o endonucleasa de dedo de zinc (ZFN).

En algunas realizaciones, la célula alogénica puede ser una célula que no expresa o expresa en niveles bajos una molécula inhibidora, p. ej., una célula modificada por cualquier método descrito en el presente documento. Por ejemplo, la célula puede ser una célula que no expresa o expresa en niveles bajos una molécula inhibidora, por ejemplo, que puede disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR para montar una respuesta efectora inmune. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFR beta). La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, mediante inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar el rendimiento de una célula que expresa CAR. En algunas realizaciones, se puede utilizar un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un dsRNA, por ejemplo, un siRNA o shRNA, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN) o una endonucleasa de dedo de zinc (ZFN), por ejemplo, como se describe en este documento.

ARNip y ARNhc para inhibir TCR o HLA

En algunas realizaciones, se puede inhibir la expresión de TCR y/o la expresión de HLA utilizando ARNip o ARNhc que tiene como diana un ácido nucleico que codifica un TCR y/o HLA, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta), en un linfocito T.

Se describen sistemas de expresión para ARNip y ARNhc, y ARNhc de ejemplo, p. ej., en los párrafos 649 y 650 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

CRISPR para inhibir TCR o HLA

Tal como se utilizan en el presente documento, «CRISPR» o «CRISPR con respecto a TCR y/o HLA» o «CRISPR para inhibir TCR y/o HLA» se refieren a un conjunto de grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares, o un sistema que comprende un conjunto de repeticiones de este tipo. "Cas", como se usa en este documento, se refiere a una proteína asociada a CRISPR. Un sistema "CRISPR/Cas" se refiere a un sistema derivado de CRISPR y Cas que se puede utilizar para silenciar o mutar un gen TCR y/o HLA, y/o una molécula inhibidora descrita en este documento (por ejemplo, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (e.g., CEACAM-1, CEACAM-3 and/or CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276),

B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 or CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina, y TGFR beta).

El sistema CRISPR/Cas y usos del mismo se describen, p. ej., en los párrafos 651-658 de la Solicitud internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

ARNip y ARNhc para inhibir TCR y/o HLA

La expresión "TALEN" o "TALEN contra HLA y/o TCR" o "TALEN para inhibir HLA y/o TCR" se refiere a una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción, una nucleasa artificial que se puede utilizar para editar el gen de HLA y/o TCR, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta).

Los TALEN, TALE y usos de los mismos se describen, p. ej., en los párrafos 659-665 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

Nucleasa con dedos de cinc para inhibir HLA y/o TCR

La expresión "ZFN" o "Nucleasa con dedos de zinc" o "ZFN contra HLA y/o TCR" o "ZFN para inhibir HLA y/o TCR" se refiere a una nucleasa con dedos de zinc, una nucleasa artificial que se puede utilizar para editar el gen de HLA y/o TCR, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta).

Las ZFN y usos de estas se describen, p. ej., en los párrafos 666-671 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

Expresión de telomerasa

Si bien no se desea estar limitado por ninguna teoría en particular, en algunas realizaciones, una célula T terapéutica tiene persistencia a corto plazo en un paciente, debido a telómeros acortados en la célula T; en consecuencia, la transfección con un gen de telomerasa puede alargar los telómeros de la célula T y mejorar la persistencia de la célula T en el paciente. Véase Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117: 1466-1476 (2007). Por tanto, en una realización, una célula efectora inmune, por ejemplo, una célula T, expresa ectópicamente una subunidad de la telomerasa, por ejemplo, la subunidad catalítica de la telomerasa, por ejemplo, TERT, por ejemplo, hTERT. En algunos aspectos, esta divulgación proporciona un método para producir una célula que expresa CAR, que comprende poner en contacto una célula con un ácido nucleico que codifica una subunidad de la telomerasa, por ejemplo, la subunidad catalítica de la telomerasa, por ejemplo, TERT, por ejemplo, hTERT. La célula puede entrar en contacto con el ácido nucleico antes, simultáneamente o después de entrar en contacto con un constructo que codifica un CAR.

En un aspecto, la divulgación presenta un método para preparar una población de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK). En un caso, el método comprende: proporcionar una población de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK), poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica un CAR; y poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT, en condiciones que permitan la expresión de CAR y telomerasa.

En una realización, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa es ADN. En una realización, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa comprende un promotor capaz de impulsar la expresión de la subunidad de telomerasa.

En una realización, la hTERT tiene la secuencia de aminoácidos de ID de proteína de GenBank AAC51724.1 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell volumen 90, número 4, 22 de agosto de 1997, páginas 785-795) de la siguiente manera:

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRAL
VAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLD
GARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFV
LVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLG
LPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFC
VVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAET
KHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRY
WQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEE
DTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERRFLRNTKKFISL
GKHAKLSLQELTWKMSVRGCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSV
YVVELLRSFFYVTETTFQKNRLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQ
HREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVL
NYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIP
QDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQF
VAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQ
GSILSTLLCSLCYGDMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRG
VPEYGCVVNLRKTVVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSD
YSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGVLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNI
YKILLLQAYRFHACVLQLPFHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLG
AKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLT
ALEAAANPALPSDFKTILD (SEQ ID NO: 1332)

En una realización, la hTERT tiene una secuencia al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 1332. En una realización, la hTERT tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 1332. En una realización, la hTERT comprende una deleción (p. ej., de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el extremo N, el extremo C o ambos. En una realización, la hTERT comprende una secuencia de aminoácidos transgénica (p. ej., de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el extremo N, el extremo C o ambos.

En una realización, la hTERT está codificada por la secuencia de ácido nucleico de GenBank N.º de acceso AF018167 (Meyerson et al., «hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization» Cell volumen 90, número 4, 22 de agosto de 1997, páginas 785-795):



1561 agctctcgct gcaggagctg acgtggaagg tgaggcgtgcg gggctgcgct tggctgcgca
1621 ggaggccagg ggttggctgg grtccggccg cagaggaccg tctgcgtgag gagatcctgg
1681 ccaagttcct gcactgggtg argagtgtgt acgtcgtcga gatgctcagg tctttctttt
1741 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctctttct ctaccggaag agtgtctgga
1801 gcaagttgcc aagcattgga atcaggaccagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt
1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggccccgc cctgctgacg tccagaactcc
1921 gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag
1981 ccagaacgtt ccgcagagaa aagaggggcg agcgtctcac ctcgaggtyg aaggcactgt
2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccaggcct cctgcgcgcc tctgtgctgg
2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttcgtgct gcgtgtgcgg gccccaggacc
2161 cgccgccctgx gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatccccc
2221 aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccaggaacag tactgcgtgc
2281 gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgccc atgggcacgt ccgcaaggcc ttcaagagcc
2341 acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgacc gttcgtggct cacctgcagg
2401 agaccagccc gctgaggyat gcvgtcgtcc tcgaggcagw ctcctccctg aatgaggccc
2461 gcagtggcct cttcgacgtc ttcctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg cgcatcaggg
2521 gcaagtccta cgtccagtgc caggggatcc cgcaggggcc catcctctcc acgctgctct
2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggaggacc agctgcttgc ggggattcgg cgggacgggc
2641 tyctcctgcg tttggtggat gatttcctgt tggtgacacc tcacctcacc cacgcgaaaa
2701 cctccatcag gacctggytc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtggtg aacttgcgga
2761 agacagtggt gaactccct gtagaagacg aggccctggg tggcacggct tttgttcaga
2821 tgccggccca cggcctattc cactggtgcg gcctgctgct ggatcccagg acccttggacg
2881 tgccaggcga ctacttccagc tatgaccggg cctccatgag agccagctcc accttcaacc
2941 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tgggctctg cggctgaagt
3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc atcaacatct
3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctccccattc
3121 atcagccagt ttggaagaac ccaacacttt tcctgcgcgt catctctgac acggcctccc
3181 tctgctacta catctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc aaggcgccg
3241 ccggcgcctct gcctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc
3301 tgactcgaca cgtgtcacc tacgtgccac tcctgggctc actcaggaca gcccagacgc
3361 agctgagtcg gaagctccg gtgacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaaccgg
3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc accgccgcac agccaggccg
3481 agagcagacx ccagcagccc tgtcacgccg ggctctacgc cccaggtagg gaggtgtggc
3541 ccacacccag gcccgcaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct
3601 gcactgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc
3661 tgagtgtcca gcaccactgc cgtcttccct tccrcaccagg ctggcgctcg gctcccccc
3721 aggccccagct tttcctcacc aggagccctgg cttccactcc ccaccatagga atagtccata
3781 cccagcattcg ccattgttca ccccctgccc tgccctcctt tgccttccac ccccaccatc
3841 caggtggaga cctgagaagg gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaaggtgt
3901 gccctgtaca caggcgagga cctgccacct ggatgggggt cactgtggct caaattgggg
3961 ggaggtgctg tggyagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagtcttga aaaaaaaaaa
4021 aaaaaaa (SEQ ID NO: 1333)

En una realización, la hTERT está codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 1333. En una realización, la hTERT está codificada por un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1333.

Activación y expansión de células efectoras inmunitarias (p. ej., célula T)

Las células efectoras inmunes tales como células T se pueden activar y expandir generalmente usando métodos como se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. 20060121005.

El procedimiento para la expansión *ex vivo* de células progenitoras y células madre hematopoyéticas se describe en la patente de los EE. UU. Nº 5.199.942 se puede aplicar a las células de la presente invención. En la técnica existe constancia de otros métodos adecuados, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún método particular de expansión *ex vivo* de las células. En resumen, el cultivo *ex vivo* y la expansión de linfocitos T pueden comprender: (1) recolectar células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero a partir de sangre periférica o explantos de médula ósea; y (2) expandir dichas células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la Patente de EE. UU. No. 5.199.942, otros factores como flt3-L, IL-1, IL-3 y el ligando c-kit, se pueden utilizar para el cultivo y expansión de las células.

Generalmente, una población de células efectoras inmunitarias puede expandirse por contacto con una superficie que tiene unido a ella un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimulante en la superficie de las células T. En particular, poblaciones de células T pueden estimularse como se describe en esta memoria, tal como mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o mediante contacto con un activador de proteína quinasa C (p. ej., briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+, se pueden utilizar un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Se pueden utilizar ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 que incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Francia), al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

En algunas realizaciones, las células efectoras inmunes (como PBMC o células T) se expanden y estimulan poniendo en contacto las células con uno o ambos de un anticuerpo anti-CD3 e IL-2. En algunas realizaciones, las células se expanden sin perlas anti-CD3 o anti-CD28.

En ciertos aspectos, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para la célula T pueden proporcionarse mediante protocolos diferentes. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada una de las señales pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden acoplarse a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Como alternativa, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En un aspecto, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinados aspectos, ambos agentes pueden estar en solución. En un aspecto, los agentes pueden estar en forma soluble y luego reticularse a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. números 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de células T en la presente invención.

En un aspecto, los dos agentes están inmovilizados en perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o en perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; y ambos agentes están coinmovilizados en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un aspecto, se utiliza una proporción de 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la expansión de células T CD4+ y el crecimiento de células T. En determinados aspectos, se utiliza una relación de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas de manera que se observa un aumento en la expansión de linfocitos T en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto, la relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros intermedios. En un aspecto, más anticuerpo anti-CD28 está unido a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación CD3:CD28 es menor que uno. En ciertos aspectos, la proporción de anticuerpo anti CD28 a anticuerpo anti CD3 unido a las perlas es mayor que 2:1. En un aspecto particular, se utiliza una relación de 1:100 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una proporción de 1:75 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto adicional, se utiliza una proporción de 1:50 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una proporción de 1:30 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una proporción de 1:10 CD3:CD28 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una proporción de 1:3 CD3:CD28 de anticuerpo unido a las perlas. En otro aspecto, se utiliza una proporción de 3:1 CD3:CD28 de anticuerpo unido a las perlas.

Se pueden utilizar proporciones de partículas a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio para estimular las células T u otras células diana. Como aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica pueden apreciar fácilmente, la relación entre partículas y células puede depender del tamaño de partícula con respecto a la célula diana. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño solo podrían unir unas pocas células, mientras que las

perlas de tamaño más grande podrían unir muchas. En ciertos aspectos, la relación de células a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero intermedio y, en otros aspectos, la relación comprende de 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero intermedio; también se puede utilizar para estimular las células T. La proporción de partículas acopladas a anti-CD3 y anti-CD28 con respecto a las células T que dan como resultado la estimulación de las células T puede variar como se indicó anteriormente, sin embargo ciertos valores adecuados incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1, siendo una proporción adecuada al menos 1:1 partículas por célula T. En un aspecto, se usa una relación de partículas a células de 1:1 o menos. En un aspecto particular, una relación adecuada de partículas:células es 1:5. En aspectos adicionales, la relación de partículas con respecto a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, en un aspecto, la relación de partículas a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se agregan partículas adicionales a las células todos los días o cada dos días a partir de entonces durante hasta 10 días, en relaciones finales de 1:1 a 1:10 (según los recuentos de células el día de la adición). En un aspecto particular, la relación de partículas a células es de 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una proporción final de 1:1 el primer día y de 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En un aspecto, la relación de partículas a células es de 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una proporción final de 1:1 el primer día y 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la técnica apreciará que una variedad de otras proporciones pueden ser adecuadas para su uso en la presente invención. En particular, las proporciones variarán dependiendo del tamaño de las partículas y del tamaño y tipo de célula. En un aspecto, las proporciones de uso más habituales están en torno a 1:1, 2:1 y 3:1 el primer día.

En aspectos adicionales de la presente invención, las células, tales como los células T, se combinan con perlas recubiertas con agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y entonces se cultivan las células. En un aspecto alternativo, antes del cultivo, las perlas recubiertas con agente y las células no se separan, sino que se cultivan juntas. En un aspecto adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, lo que da como resultado una mayor ligadura de los marcadores de la superficie celular, induciendo así la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular se pueden ligar permitiendo que perlas paramagnéticas a las que están adheridos anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3x28) entren en contacto con las células T. En un aspecto, las células (por ejemplo, 10^4 a 10^9 células T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, por ejemplo PBS (sin cationes divalentes como calcio y magnesio). Nuevamente, aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica pueden apreciar fácilmente que se puede utilizar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo el 0,01 % de la muestra o la muestra completa (es decir, el 100 %) puede comprender la célula diana de interés. Por consiguiente, cualquier número de célula está dentro del contexto de la presente invención. En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las partículas y las células (es decir, aumentar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de las células y las partículas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de 10 mil millones de células/ml, 9 mil millones/ml, 8 mil millones/ml, 7 mil millones/ml, 6 mil millones/ml, 5 mil millones/ml o 2 mil millones/ml. En un aspecto, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otro aspecto, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En otros aspectos, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede resultar en un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos de interés, como las células T CD28-negativas. Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico, y podría ser deseable obtenerlas en ciertos aspectos. Por ejemplo, el uso de una concentración elevada de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En una realización, las células transducidas con un ácido nucleico que codifica un CAR se expanden, por ejemplo, mediante un método descrito en este documento. En una realización, las células se expanden en cultivo durante un período de varias horas (por ejemplo, aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 horas) a aproximadamente 14 días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días). En una realización, las células se expanden durante un período de 4 a 9 días. En una realización, las células se expanden durante un período de 8 días o menos, p. ej., 7, 6 o 5 días. En una realización, las células se expanden en cultivo durante 5 días y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. La potencia se puede definir, por ejemplo, por diversas funciones de las células T, por ejemplo, proliferación, muerte de células diana, producción de citocinas, activación, migración o combinaciones de las mismas. En una realización, las células expandidas durante 5 días muestran al menos un aumento de una, dos, tres o cuatro veces en la duplicación de células tras la estimulación con antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las células se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes exhiben una mayor producción de citocinas proinflamatorias, por ejemplo, niveles de IFN-γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las

células expandidas durante 5 días muestran un aumento de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, diez veces o más en pg/ml de producción de citocinas proinflamatorias, por ejemplo, niveles de IFN-γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

En un aspecto de la presente invención, la mezcla se puede cultivar durante de varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero por hora entre ellos. En un aspecto, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. En un aspecto de la invención, las perlas y los células T se cultivan juntas durante aproximadamente ocho días. En un aspecto, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante 2-3 días.

También pueden desearse varios ciclos de estimulación de modo que el tiempo de cultivo de las células T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o X-vivo 15 (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluido suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ y TNF-α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el técnico experto. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, entre otros, surfactante, plasmanato y agentes reductores como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero. o suplementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de las células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomicina, se incluyen sólo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para sustentar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (por ejemplo, 37 ºC) y una atmósfera adecuada (por ejemplo, aire más 5% de CO_2).

En una realización, las células se expanden en un medio apropiado (por ejemplo, el medio descrito en este documento) que incluye una o más interleucinas que dan como resultado un aumento de al menos 200 veces (por ejemplo, 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces) en las células durante un período de expansión de 14 días, por ejemplo, medido mediante un método descrito en este documento, como la citometría de flujo. En una realización, las células se expanden en presencia de IL-15 y/o IL-7 (p. ej., IL-15 e IL-7).

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones (por ejemplo, una célula T como una célula T CD4+ o una célula T CD8+) se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido de interleucina-15 (IL-15), un polipéptido del receptor de interleucina-15 alfa (IL-15Ra) o una combinación de un polipéptido IL-15 y un polipéptido IL-15Ra, por ejemplo, hetIL-15, durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR se pone en contacto con una composición que comprende una combinación de un polipéptido IL-15 y un polipéptido IL-15 Ra durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo. En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR se pone en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, por ejemplo, ex vivo.

En una realización, la célula que expresa CAR (por ejemplo, una célula T o una célula NK) se pone en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la expansión ex vivo. En una realización, la célula que expresa CAR se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 durante la expansión ex vivo. En una realización, la célula que expresa CAR se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 y un polipéptido IL-15Ra durante la expansión ex vivo. En una realización, la puesta en contacto da como resultado la supervivencia y proliferación de una subpoblación de linfocitos, p. ej., células T CD8+.

En un caso, el método de producción desvelado en el presente documento comprende además poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT. El ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa puede ser ADN.

Las células T que han estado expuestas a distintos tiempos de estimulación pueden exhibir características diferentes. Por ejemplo, los productos típicos de sangre o de células mononucleares de sangre periférica aféresis tienen una población de células T auxiliares (TH, CD4+) que es mayor que la población de células T citotóxicas o supresoras (TC, CD8+). La expansión ex vivo de células T mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en células TH, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de células T comprende una población cada vez mayor de células TC. En consecuencia, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajoso infundir a un sujeto una población de células T que comprende predominantemente células TH. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto de células TC específico de antígeno, puede ser beneficioso ampliar este subconjunto en mayor grado.

Además, además de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de manera reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, dicha reproducibilidad permite adaptar un producto de células T activadas para propósitos específicos.

Una vez que se construye un CAR, p. ej., CAR CD19, se pueden utilizar diversos ensayos para evaluar la actividad de la molécula, tales como, pero sin limitación, la capacidad de expandir linfocitos T después de la estimulación del antígeno, mantener la expansión de los linfocitos T en ausencia de re-estimulación y actividades antineoplásicas en modelos in vitro y en animales apropiados. Los ensayos para evaluar los efectos de un CAR, p. ej., CAR CD19, se describen con más detalle a continuación

El análisis de transferencia Western de la expresión de CAR en linfocitos T primarios puede usarse para detectar la presencia de monómeros y dímeros, p. ej., como se describe en el párrafo 695 de la solicitud internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

La expansión *in vitro* de células T CAR^+ después de la estimulación con antígeno se puede medir mediante citometría de flujo. Por ejemplo, una mezcla de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ se estimula con perlas αCD3/αCD28, seguido de la transducción con vectores lentivíricos que expresan GFP bajo el control de los promotores que se van a analizar. Promotores ejemplares incluyen los promotores del gen IE de CMV, EF-1α, ubiquitina C o fosfogliceroquinasa (PGK). La fluorescencia de GFP se evalúa el día 6 de cultivo en los subconjuntos de linfocitos T $CD4^+$ y/o $CD8^+$ mediante citometría de flujo. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Como alternativa, una mezcla de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ se estimula con perlas magnéticas recubiertas de αCD3/αCD28 el día 0 y se transducen con CAR el día 1 utilizando un vector lentiviral bicistrónico que expresa CAR junto con eGFP utilizando una secuencia de omisión ribosómica 2A. Los cultivos se vuelven a estimular con células K562 $CD19^+$ (K562-CD19), células K562 de tipo silvestre (K562 de tipo silvestre) o células K562 que expresan hCD32 y 4-1BBL en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (K562-BBL-3/28) después del lavado. Se añade IL-2 exógena a los cultivos cada dos días a razón de 100 UI/ml. Las células T GFP^+ se enumeran mediante citometría de flujo utilizando un recuento basado en perlas. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

También se puede medir la expansión sostenida de células T CAR^+ en ausencia de reestimulación. Véase, por ejemplo, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). En resumen, el volumen medio de linfocitos T (fl) se mide el día 8 de cultivo usando un contador de partículas Coulter Multisizer, un Nexcelom Cellometer Vision o Millipore Scepter, tras la estimulación con perlas magnéticas recubiertas de αCD3 /αCD28 el día 0 y la transducción con el CAR indicado el día 1.

También se pueden usar modelos animales para medir una actividad de células que expresan CAR, p. ej., como se describe en el párrafo 698 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

Se puede evaluar la respuesta al tratamiento con CAR dependiente de la dosis, p. ej., como se describe en el párrafo 699 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. La evaluación de la proliferación celular y la producción de citocinas se ha descrito previamente, p. ej., como se describe en el párrafo 700 de la solicitud internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. La citotoxicidad se puede evaluar mediante un ensayo convencional de liberación de ^{51}Cr, p. ej., como se describe en el párrafo 701 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. Las tecnologías de imágenes se pueden utilizar para evaluar el tráfico específico y la proliferación de CAR en modelos animales portadores de tumores, por ejemplo, como se describe en el párrafo 702 de la solicitud internacional WO2015/142675.

También se pueden utilizar otros ensayos, incluidos los descritos en la sección de Ejemplos aquí, así como aquellos que se conocen en la técnica, para evaluar los CAR descritos aquí.

Como alternativa, o en combinación con los métodos desvelados en el presente documento, métodos y composiciones para uno o más de detección y/o cuantificación de células que expresan CAR (p. ej., *in vitro* o *in vivo* (p. ej., monitorización clínica)); expansión y/o activación de células inmunitarias; y/o selección específica para el CAR, que implica el uso de un ligando de CAR. En una realización de ejemplo, el ligando de CAR es un anticuerpo que se une a la molécula CAR, p. ej., se une al dominio de unión al antígeno extracelular de CAR (p. ej., un anticuerpo que se une al dominio de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo antidiotípico; o un anticuerpo que se une a una región constante del dominio de unión extracelular). En otros casos, el ligando de CAR es una molécula para antigénica para el CAR (p. ej., una molécula antigénica para el CAR como se describe en la presente).

En un aspecto, se divulga un método para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR. Por ejemplo, el ligando de CAR puede utilizarse para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR in vitro o in vivo (p. ej., monitorización clínica de células que expresan CAR en un paciente o administración a un paciente). El método incluye:

proporcionar el ligando CAR (opcionalmente, un ligando CAR marcado, por ejemplo, un ligando CAR que incluye una etiqueta, una perla, una etiqueta radiactiva o fluorescente);

adquirir la célula que expresa CAR (por ejemplo, adquirir una muestra que contenga células que expresan CAR, como una muestra de fabricación o una muestra clínica);

poner en contacto la célula que expresa CAR con el ligando CAR en condiciones en las que se produce la unión, detectando así el nivel (por ejemplo, la cantidad) de células que expresan CAR presentes. La unión de la célula que expresa CAR con el ligando CAR se puede detectar utilizando técnicas estándar como FACS, ELISA y similares.

En otro aspecto, se describe un método para expandir y/o activar células (por ejemplo, células efectoras inmunes). El método incluye:

proporcionar una célula que exprese CAR (por ejemplo, una primera célula que exprese CAR o una célula que exprese CAR transitoriamente);

poner en contacto dicha célula que expresa CAR con un ligando CAR, por ejemplo, un ligando CAR como se describe en este documento), en condiciones en las que se produce la expansión y/o proliferación de células inmunes, produciendo de este modo la población de células activadas y/o expandidas.

En ciertas realizaciones, el ligando CAR está presente en (por ejemplo, está inmovilizado o unido a un sustrato, por ejemplo, un sustrato que no se encuentra en la naturaleza). En algunos casos, el sustrato es un sustrato no celular. El sustrato no celular puede ser un soporte sólido elegido entre, p. ej., una placa (p. ej., una placa de microtitulación), una membrana (p. ej., una membrana de nitrocelulosa), una matriz, un chip o una perla. En las realizaciones, el ligando de CAR está presente en el sustrato (p. ej., en la superficie del sustrato). El ligando de CAR se puede inmovilizar, unir o asociar covalente o no covalentemente (p. ej., entrecruzar) al sustrato. En un caso, el ligando de CAR se une (p. ej., se une covalentemente) a una perla. En las realizaciones mencionadas anteriormente, la población de células inmunitarias se puede expandir *in vitro* o *ex vivo*. El método puede incluir además cultivar la población de células inmunitarias en presencia del ligando de la molécula CAR, p. ej., utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En otros casos, el método para expandir y/o activar las células comprende además la adición de una segunda molécula estimuladora, p. ej., CD28. Por ejemplo, el ligando de CAR y la segunda molécula estimuladora se pueden inmovilizar en un sustrato, p. ej., una o más perlas, y proporcionar de esta manera un incremento de la expansión y/o activación celulares.

En otras realizaciones, se proporciona un método para seleccionar o enriquecer una célula que CAR expresa CAR. El método incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando CAR como se describe en este documento; y seleccionar la célula sobre la base de la unión del ligando CAR.

En otras realizaciones más, se proporciona un método para agotar (por ejemplo, reducir y/o matar) una célula que expresa CAR. El método incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando de CAR como se describe en el presente documento; y dirigirse a la célula en función de la unión del ligando de CAR, reduciendo de este modo el número y/o destruyendo la célula que expresa CAR. En una realización, el ligando de CAR se acopla a un agente tóxico (p. ej., una toxina o un fármaco citoablativo). En otra realización, el anticuerpo antidiotípico puede provocar la actividad de células efectoras, p. ej., actividad ADCC o ADC.

Los anticuerpos anti-CAR de ejemplo que se pueden utilizar en los métodos divulgados en el presente documento se describen, p. ej., en el documento WO 2014/190273 y en Jena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS marzo de 2013 8:3 e57838. En algunos aspectos y realizaciones, las composiciones y métodos en este documento se optimizan para un subconjunto específico de células T, p. ej., como se describe en la Serie de EE. UU. No. PCT/US2015/043219, presentada el 31 de julio, 2015. En algunas realizaciones, los subconjuntos optimizados de linfocitos T muestran una persistencia mejorada en comparación con un linfocito T de control, p. ej., un linfocito T de un tipo diferente (p. ej., CD8+ o CD4+) que expresa el mismo constructo.

En algunas realizaciones, una célula T CD4+ comprende un CAR de acuerdo con las reivindicaciones, CAR que comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (por ejemplo, optimizado para, por ejemplo, que conduce a una persistencia mejorada en) una célula T CD4+, por ejemplo, un dominio ICOS. En algunas realizaciones, una célula T CD8+ comprende un CAR de acuerdo con las reivindicaciones, CAR que comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (por ejemplo, optimizado para, por ejemplo, que conduce a una persistencia mejorada de) una célula T CD8+, por ejemplo, un dominio 4-1BB, un dominio CD28 u otro dominio coestimulador distinto de un dominio ICOS.

También se describe aquí un método para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer. El método incluye administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de:

1) un linfocito T CD4+ que comprende un CAR (el CAR CD4+), que comprende:

un dominio de unión al antígeno, p. ej., un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un primer dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio ICOS; y

2) un linfocito T CD8+ que comprende un CAR (el CAR CD8+), que comprende:

un dominio de unión al antígeno, p. ej., un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un segundo dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio 4-1BB, un dominio CD28 u otro dominio coestimulador distinto de un dominio ICOS;

en donde el CAR CD4+ y el CAR CD8+ difieren entre sí.

Opcionalmente, el método incluye, además, administrar:

3) un segundo linfocito T CD8+ que comprende un CAR (el segundo CAR CD8+) que comprende:

un dominio de unión al antígeno, p. ej., un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, en donde el segundo CAR CD8+ comprende un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización coestimulador, no presente en el CAR CD8+ y, opcionalmente, no comprende un dominio de señalización ICOS.

Métodos de fabricación/producción

En algunas realizaciones, los métodos divulgados en este documento incluyen además administrar un agente de reducción de células T después del tratamiento con la célula (por ejemplo, una célula efectora inmunitaria como se describe en este documento, por ejemplo, una célula efectora inmunitaria que expresa CAR impulsada por un promotor PGK1 truncado), reduciendo así (por ejemplo, agotando) las células que expresan CAR. Tales agentes agotadores de células T se pueden usar para agotar eficazmente células que expresan CAR para mitigar la toxicidad. En algunas realizaciones, las células que expresan CAR se fabricaron según un método del presente documento, p. ej., se sometieron a ensayo (p. ej., antes o después de la transfección o transducción) según un método del presente documento.

En algunas realizaciones, el agente de depleción de linfocitos T se administra una, dos, tres, cuatro o cinco semanas después de la administración de la célula, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias, descrita en el presente documento.

En una realización, el agente de depleción de linfocitos T es un agente que provoca la depleción de las células que expresan CAR, p. ej., induciendo citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un antígeno (p. ej., un antígeno diana) que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, p. ej., ADCC o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en este documento también pueden expresar una proteína diana (por ejemplo, un receptor) capaz de ser la diana de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Los ejemplos de tales proteínas diana incluyen, entre otros, EpCAM, VEGFR, integrinas (p. ej., integrinas αvβ3, α4, αI3/4β3, α4β7, α5β1, αvβ3, αv), miembros de la superfamilia de receptor de TNF (p. ej., TRAIL-R1, TRAIL-R2), receptor de PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, receptor de IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11 , CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/receptor de IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41 , CD44, CD51 , CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 y EGFR, y versiones truncadas

de estos (p. ej., versiones que conservan uno o más epítopos extracelulares pero que carecen de una o más regiones dentro del dominio citoplasmático).

En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR coexpresa el CAR y la proteína diana, p. ej., expresa de manera natural la proteína diana o se modifica para que exprese la proteína diana. Por ejemplo, la célula, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias, puede incluir un ácido nucleico (p. ej., vector) que comprende el ácido nucleico de CAR (p. ej., un ácido nucleico de CAR tal como se describe en el presente documento) y un ácido nucleico que codifica la proteína diana.

En una realización, el agente de depleción de linfocitos T es un inhibidor de CD52, p. ej., una molécula de tipo anticuerpo anti-CD52, p. ej., alemtuzumab.

En otras realizaciones, la célula, por ejemplo, la población de células efectoras inmunes, expresa una molécula CAR de acuerdo con las reivindicaciones y la proteína diana es reconocida por el agente de agotamiento de células T. En un caso, la proteína diana es CD20. En realizaciones, cuando la proteína diana es CD20, el agente de depleción de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD20, p. ej., rituximab.

En realizaciones adicionales de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, los métodos incluyen además trasplantar una célula, p. ej., una célula madre hematopoyética, o médula ósea, al mamífero.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método de acondicionamiento de un mamífero antes del trasplante de células. El método incluye administrar al mamífero una cantidad eficaz de la célula que comprende un ácido nucleico o polipéptido de CAR, p. ej., un ácido nucleico o polipéptido de CAR CD19. El algunos casos, el transplante de células es un transplante de células madre, p. ej., un transplante de células madre hematopoyéticas, o un un transplante de médula ósea. En otros casos, acondicionar a un sujeto antes del trasplante de células incluye reducir el número de células que expresan la diana en un sujeto, p. ej., células normales que expresan CD19 o células cancerosas que expresan CD19.

Métodos de suministro de biopolímeros

En algunas realizaciones, una o más células que expresan CAR divulgadas en el presente documento se pueden administrar o suministrar al sujeto mediante un armazón biopolimérico, p. ej., un implante biopolimérico. Los andamios de biopolímeros pueden apoyar o mejorar la administración, expansión y/o dispersión de las células que expresan CAR descritas en este documento. Un andamio de biopolímero comprende un polímero biocompatible (por ejemplo, no induce sustancialmente una respuesta inflamatoria o inmunitaria) y/o biodegradable que puede ser de origen natural o sintético. Se describen biopolímeros ilustrativos, p. ej., en los párrafos 1004-1006 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

Aplicaciones terapéuticas

Enfermedades y/o trastornos asociados con CD19

En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD19. En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos para tratar una enfermedad en la que parte del cáncer es negativo para CD 19 y parte del cáncer es positivo para CD19. Por ejemplo, las composiciones de la invención son útiles para tratar sujetos que se han sometido a un tratamiento para una enfermedad asociada con la expresión de CD19, en el que el sujeto que se ha sometido a un tratamiento relacionado con la expresión de CD19, por ejemplo, tratamiento con un CAR CD19, presenta una enfermedad asociada con la expresión de CD19.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos para tratar una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B, por ejemplo, uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos para tratar una enfermedad en la que parte del tumor es negativo para el antígeno de células B y parte del tumor es positivo para el antígeno de células B. Por ejemplo, las composiciones y métodos de la invención son útiles para tratar sujetos que se han sometido a un tratamiento para una enfermedad asociada con la expresión del antígeno de células B, en donde el sujeto que se ha sometido a un tratamiento está relacionado con la expresión de un antígeno de células B, por ejemplo, el tratamiento con un CAR dirigido a un antígeno de células B, presenta una enfermedad asociada con la expresión del antígeno de células B. En un tercer aspecto, la divulgación se refiere a métodos para tratar una enfermedad asociada con la expresión del antígeno de células B, por ejemplo, asociada con la expresión de CD19 y uno o más de otros antígenos de células B. La invención proporciona una célula o población de células de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un vector que comprende CD19 CAR unido operativamente a un promotor para su expresión en células de mamíferos, por ejemplo, células T o células NK. En un aspecto, la divulgación proporciona una célula recombinante, por ejemplo, una célula T o una célula NK, que expresa el CD 19 CAR para su uso en el tratamiento de cánceres que expresan CD 19, en la que la célula T recombinante que expresa el CD19

CAR se denomina CD19 CART. En un aspecto, el CART CD19 descrito en el presente documento es capaz de poner en contacto una célula cancerosa con al menos un CAR CD19 expresado en su superficie, de manera que el CART se dirige a la célula tumoral y se inhibe el crecimiento del cáncer.

En un aspecto, la invención se refiere a un inhibidor de CD22 que es un CART CD22 de acuerdo con las reivindicaciones, por ejemplo, una célula T que expresa el CAR CD22 para su uso en el tratamiento de tumores que expresan CD22 en combinación con CARTS CD19, en donde la célula T recombinante que expresa el CAR CD22 se denomina CART CD22. En un aspecto, el CART CD22 descrito en el presente documento es capaz de ponerse en contacto con una célula tumoral con al menos un CAR CD22 expresado en su superficie de manera que el CART CD22 se dirige a la célula tumoral y se inhibe el crecimiento del tumor.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa que expresa CD 19, que comprende poner en contacto la célula cancerosa con una célula que expresa CAR CD19, por ejemplo, una célula CART CD19, descrita, y una o más células que expresan CAR diferentes. células, por ejemplo, como se describe en este documento, de modo que el CART se activa en respuesta al antígeno y se dirige a la célula cancerosa, en la que se inhibe el crecimiento del cáncer. La célula que expresa CAR CD19, p. ej., linfocito T, se administra en combinación con un inhibidor de linfocitos B, p. ej., un inhibidor de linfocitos B descrito en el presente documento.

En algunos casos, el inhibidor de CD 19 (por ejemplo, una o más células que expresan una molécula CAR que se une a CD19, por ejemplo, una molécula CAR que se une a CD19 descrita en este documento) y el inhibidor de células B (por ejemplo, uno o más inhibidores de CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1, por ejemplo, como se describe en este documento) se administran simultáneamente. En algunos casos, el inhibidor de CD19 y el inhibidor de linfocitos B se infunden en un sujeto simultáneamente, p. ej., se mezclan en el mismo volumen de infusión. En otros casos, la administración simultánea comprende la administración separada del inhibidor de CD 19 y del inhibidor de células B, por ejemplo, la administración de cada uno se inicia dentro de un intervalo de tiempo predeterminado (por ejemplo, dentro de 15, 30 o 45 minutos entre sí).

En algunos casos, el inicio del suministro del inhibidor de CD19 y el inicio del suministro del inhibidor de linfocitos B están en un intervalo de 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18 o 24 horas entre sí, o en un intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80 o 100 días entre sí. En algunos casos, el final del suministro del inhibidor de CD19 y el final del suministro del inhibidor de linfocitos B están en un intervalo de 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18 o 24 horas, o en un intervalo de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80 o 100 días entre sí. En algunos casos, el solapamiento con respecto a la administración entre el suministro del inhibidor de CD19 (p. ej., infusión) y el final del suministro del inhibidor de linfocitos B (p. ej., infusión) es de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 45 minutos.

En algunos casos, el inhibidor de linfocitos B se administra mientras están presentes una o más células que expresan una molécula de CAR que se une a CD19 (p. ej., que experimenta expansión) en el sujeto. En algunos casos, el inhibidor de CD19 se administra mientras están presentes una o más células que expresan una molécula de CAR que se une a uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3, ROR1, CD79b, CD179b o CD79a (p. ej., que experimenta expansión) en el sujeto.

La invención incluye (entre otros) un tipo de terapia celular en la que las células T se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula T CAR se infunde a un receptor que la necesita. La célula infundida es capaz de matar las células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, los linfocitos T modificados con CAR pueden replicarse in vivo, lo que da lugar a una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control tumoral sostenido. En diversos aspectos, los linfocitos T administrados al paciente, o su descendencia, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración del linfocito T al paciente.

La invención también incluye un tipo de terapia celular en la que las células efectoras inmunes, por ejemplo, células NK o células T se modifican, por ejemplo, mediante ARN transcrito *in vitro*, para expresar transitoriamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula que expresa CAR (por ejemplo, CAR T) se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede destruir las células cancerosas en el receptor. Por tanto, en diversos aspectos, las células que expresan CAR, p. ej., linfocitos T, administradas al paciente están presentes durante menos de un mes, p. ej., tres semanas, dos semanas, una semana, después de la administración de la célula que expresa CAR, p. ej., linfocito T, al paciente.

Sin desear estar ligado a teoría particular alguna, la respuesta inmunitaria antineoplásica provocada por los linfocitos T modificados con CAR puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva o, como alternativa, puede deberse a una respuesta inmunitaria directa frente a una respuesta inmunitaria indirecta. En un aspecto, las células T transducidas con CAR exhiben una secreción de citocinas proinflamatorias específicas y una potente actividad citolítica en respuesta a las células cancerosas humanas que expresan el antígeno diana, resisten la inhibición del

antígeno diana soluble, median la muerte de los espectadores y median la regresión de un cáncer humano establecido. Por ejemplo, las células cancerosas sin antígeno dentro de un campo heterogéneo de cáncer que expresa el antígeno diana pueden ser susceptibles de destrucción indirecta por los linfocitos T redirigidos al antígeno diana que han reaccionado previamente contra las células cancerosas positivas para el antígeno adyacentes.

En un aspecto, las células modificadas con CAR de la invención, p. ej., linfocitos T con CAR totalmente humanos, pueden ser un tipo de vacuna para inmunización *ex vivo* y/o terapia *in vivo* en un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a la inmunización *ex vivo*, ocurre al menos una de las siguientes *in vitro* antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en las células o iii) crioconservación de las células.

Los procedimientos *ex vivo* son bien conocidos en la técnica y se analizan con más detalle más adelante. En resumen, las células se aíslan de un mamífero (p. ej., un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan in vitro) con un vector que expresa un CAR descrito en esta memoria. La célula modificada con un CAR se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada con un CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Como alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

El procedimiento para la expansión *ex vivo* de células progenitoras y células madre hematopoyéticas se describe en la patente de los EE. UU. Nº 5.199.942 se puede aplicar a las células de la presente invención. En la técnica existe constancia de otros métodos adecuados, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún método particular de expansión *ex vivo* de las células. En resumen, el cultivo *ex vivo* y la expansión de linfocitos T pueden comprender: (1) recolectar células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero a partir de sangre periférica o explantos de médula ósea; y (2) expandir dichas células *ex vivo.* Además de los factores de crecimiento celular descritos en la Patente de EE. UU. No. 5.199.942, otros factores como flt3-L, IL-1, IL-3 y el ligando c-kit, se pueden utilizar para el cultivo y expansión de las células.

Además de utilizar una vacuna basada en células con respecto a inmunización *ex vivo*, también se incluyen en los métodos descritos en el presente documento composiciones y métodos para la inmunización *in vivo* para inducir una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno en un paciente.

Generalmente, las células activadas y expandidas como se describe en esta memoria se pueden utilizar en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos inmunodeprimidos. En particular, las células que expresan CAR descritas en el presente documento se usan en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de uno o más antígenos de linfocitos B. En determinados aspectos, las células se usan en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de uno o más antígenos de linfocitos B. Por lo tanto, la presente divulgación se refiere (entre otras cosas) a métodos para el tratamiento o prevención de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de un antígeno de células B que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células que expresan CAR CD19 descritas en este documento, en combinación con uno o más de los inhibidores de células B descritos en este documento.

La presente divulgación también se refiere a métodos para inhibir la proliferación o reducir una población de células que expresan CD19, comprendiendo los métodos poner en contacto una población de células que comprende una célula que expresa CD19 con una célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en este documento que se une a la célula que expresa CD19, y poner en contacto la población de células que expresan CD19 con uno o más de un inhibidor de células B descrito en este documento. En un aspecto específico, la presente divulgación se refiere a métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD19, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD19 con una célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en este documento que se une a la célula que expresa CD19, y poner en contacto la célula que expresa CD 19 con una o más células B descritas en este documento. En un aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD19, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD19 con una célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en este documento que se une a la célula que expresa CD19 y poner en contacto la célula que expresa CD19 con una o más células B descritas en este documento. En determinados aspectos, la combinación de la célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en el presente documento y uno o más linfocitos B descritos en el presente documento reduce la cantidad, el número, la cantidad o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 65 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % en un sujeto con un modelo animal de cáncer hemático u otro cáncer asociado con células que expresan CD19 en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

La presente divulgación también se refiere a métodos para inhibir la proliferación o reducir una población celular que comprende células que expresan CD19 y células que expresan un segundo antígeno de células B. En un aspecto, CD19 y el segundo antígeno de linfocitos B son expresados por las mismas células dentro de la población. En otro aspecto, CD19 y el segundo antígeno de linfocitos B son expresados por distintos subconjuntos de células dentro de la población. En otro aspecto, CD19 y el segundo antígeno de linfocitos B son expresados por subconjuntos solapantes de células dentro de la población, de modo que algunas células expresan CD19 y el segundo antígeno de linfocitos B, algunas células expresan CD19 y algunas células expresan el segundo antígeno de linfocitos B.

La presente divulgación también se refiere a métodos para inhibir la proliferación o reducir una población de células que expresa CD19 y un segundo antígeno de células B, comprendiendo los métodos (i) poner en contacto una población de células que comprende una célula que expresa CD19 con una célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en este documento que se une a la célula que expresa CD19, y (ii) poner en contacto la segunda célula que expresa antígeno de células B con una segunda célula que expresa CAR descrita en este documento que se une a la segunda célula que expresa antígeno de células B. En un aspecto específico, la presente divulgación se refiere a métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD19 y un segundo antígeno de células B, comprendiendo los métodos (i) poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD19 con una célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en este documento que se une a la célula que expresa CD19, y (ii) poner en contacto la población de células que expresan el segundo antígeno de células B con una segunda célula que expresa CAR descrita en este documento que se une a la célula que expresa el segundo antígeno de células B. En un aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD19 y/o un segundo antígeno de células B, comprendiendo los métodos (i) poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD19 con una célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en este documento que se une a la célula que expresa CD19 y (ii) poner en contacto la población de células que expresan el segundo antígeno de células B con una segunda célula que expresa CAR descrita en este documento que se une a la célula que expresa el segundo antígeno de células B. En ciertos aspectos, la combinación de la célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en el presente documento y la segunda célula que expresa CAR descrita en el presente documento reduce la cantidad, el número, el volumen o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 65 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % en un sujeto con un modelo animal de cáncer hemático u otro cáncer asociado con CD19 y/o células que expresan el segundo antígeno de linfocitos B en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

La presente divulgación también se refiere a métodos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con células que expresan CD19 (por ejemplo, un cáncer hematológico o un cáncer atípico que expresa CD19), comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una célula que expresa CAR anti-CD19 que se une a la célula que expresa CD19 y administrar uno o más inhibidores de células B descritos en este documento. En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Los ejemplos no limitantes de trastornos asociados con células que expresan CD19 incluyen trastornos autoinmunitarios (tales como el lupus), trastornos inflamatorios (tales como alergias y asma) y cánceres (tales como cánceres hemáticos o cánceres atípicos que expresan CD19).

La presente divulgación también se refiere a métodos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con CD19 y/o células que expresan un segundo antígeno de células B (por ejemplo, un cáncer hematológico o un cáncer atípico que expresa CD19 y/o un segundo antígeno de células B), comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una célula que expresa CAR anti-CD19 que se une a la célula que expresa CD19 y un inhibidor de células B.

La presente divulgación también se refiere a métodos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con células que expresan CD19, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una célula CART anti-CD19 de la divulgación que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

La presente divulgación también se refiere a métodos para prevenir la recaída del cáncer asociado con células que expresan CD19, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una célula CART anti-CD19 de la divulgación que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un linfocito CART anti-CD19 descrito en el presente documento que se une a la célula que expresa CD19 en combinación con una cantidad eficaz de otra terapia.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una célula que expresa CAR CD19, p. ej., un linfocito T, descrito en el presente documento, en combinación con un inhibidor de linfocitos B, de modo que se trate el cáncer en el sujeto. Un ejemplo de un cáncer que se puede tratar mediante los métodos descritos en el presente documento es un cáncer asociado con la expresión de CD19. En un caso, la enfermedad es un tumor sólido o líquido. En ciertos casos, la enfermedad es un cáncer hemático, p. ej., como se describe en el presente documento.

Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de CD19 incluyen, entre otras, p. ej., enfermedad autoinmunitaria (p. ej., lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes.

En algunos casos, un cáncer que puede tratarse con la combinación descrita en el presente documento es mieloma múltiple. El mieloma múltiple es un cáncer de la sangre que se caracteriza por la acumulación de un clon de células plasmáticas en la médula ósea. Las terapias actuales para el mieloma múltiple incluyen, pero sin limitación, tratamiento con lenalidomida, que es un análogo de la talidomida. La lenalidomida tiene actividades que incluyen actividad antitumoral, inhibición de la angiogénesis e inmunomodulación. En algunos casos, un CAR CD19, p. ej., como se describe en el presente documento, puede utilizarse para dirigirse a células de mieloma. En algunos casos, la combinación descrita en el presente documento se puede utilizar con una o más terapias adicionales, p. ej., tratamiento con lenalidomida.

Las células que expresan CAR descritas en el presente documento pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes, tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares.

Cánceres hemáticos

Afecciones de cáncer hemático son los tipos de cáncer tales como leucemia, linfoma y afecciones linfoproliferativas malignas que afectan a la sangre, la médula ósea y el sistema linfático.

En una realización, el cáncer hemático es leucemia. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en una o más leucemias agudas incluidas, sin limitación, leucemia linfoide aguda de linfocitos B (LLAB), leucemia linfoide aguda de linfocitos T (LLAT), leucemia linfocítica de células pequeñas (LLCP), leucemia linfoide aguda (LLA); una o más leucemias crónicas incluidas, pero sin limitación, leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC); cánceres hemáticos adicionales o afecciones hemáticas incluidas, pero sin limitación, linfoma de células del manto (LCM), leucemia prolinfocítica de linfocitos B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, tricoleucemia, leucemia de células pequeñas o un linfoma folicular de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmablástico, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom y "preleucemia" que son un conjunto diverso de afecciones hemáticas unidas por una producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides. Las enfermedades asociadas con la expresión de CD19, CD20 o CD22 incluyen, pero sin limitación, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan CD19, CD20 o CD22; y cualquier combinación de los mismos.

La leucemia se puede clasificar como leucemia aguda y leucemia crónica. La leucemia aguda puede clasificarse además como leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia linfoide aguda (ALL). La leucemia crónica incluye la leucemia mielógena crónica (CML) y la leucemia linfoide crónica (CLL). Otras afecciones relacionadas incluyen los síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como "preleucemia"), que son un conjunto diverso de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y el riesgo de transformación a AML.

El linfoma es un grupo de tumores de células sanguíneas que se desarrollan a partir de los linfocitos. Los linfomas ejemplares incluyen el linfoma no de Hodgkin y el linfoma de Hodgkin.

También se describe en este documento un método para tratar un mamífero que tiene linfoma de Hodgkin, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de células que expresan una molécula CD19 CAR, por ejemplo, una molécula CD19 CAR descrita en este documento y un inhibidor de células B.

En un aspecto, las composiciones y los linfocitos CART o los linfocitos NK que expresan CAR de la presente invención son particularmente útiles para tratar neoplasias malignas de linfocitos B, tales como linfomas no hodgkinianos, p. ej., LDLBG, linfoma folicular o LLC.

El linfoma no hodgkiniano (LNH) es un grupo de cánceres de linfocitos, formados a partir de linfocitos B o T. Los LNH se producen a cualquier edad y con frecuencia se caracterizan por ganglios linfáticos que son más grandes de lo normal, pérdida de peso y fiebre. Los diferentes tipos de LNH se clasifican como tipos agresivos (de crecimiento rápido) e indolentes (de crecimiento lento). Los linfomas no hodgkinianos de linfocitos B incluyen el linfoma de Burkitt, la leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas (LLC/LLCP), el linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), el linfoma folicular, el linfoma inmunoblástico de células grandes, el linfoma linfoblástico B precursor y el linfoma de células del manto. Los ejemplos de linfomas no hodgkinianos de linfocitos T incluyen micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes y linfoma linfoblástico T precursor. Los linfomas que aparecen después de un trasplante de médula ósea o de células madre son normalmente linfomas no hodgkinianos de linfocitos B. Véase, p. ej., Maloney. NEJM. 366,21(2012):2008-16.

El linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG) es una forma de LNH que se desarrolla a partir de los linfocitos B. El LDLBG es un linfoma agresivo que puede surgir en los ganglios linfáticos o fuera del sistema linfático, p. ej., en el tubo digestivo, testículos, tiroides, piel, mama, hueso o cerebro. En el LDLBG se observan habitualmente tres variantes de morfología celular: centroblástica, inmunoblástica y anaplásica. La morfología centroblástica es la más común y tiene la apariencia de linfocitos de tamaño mediano a grande con un citoplasma mínimo. Hay varios subtipos de LDLBG. Por ejemplo, el linfoma primario del sistema nervioso central es un tipo de LDLBG que solo afecta el cerebro y se denomina y trata de manera diferente al LDLBG que afecta a áreas fuera del cerebro. Otro tipo de LDLBG es el linfoma primario de linfocitos B del mediastino, que a menudo aparece en pacientes más jóvenes y crece rápidamente en el tórax. Los síntomas de LDLBG incluyen una inflamación rápida e indolora en el cuello, la axila o la ingle, que es causada por el agrandamiento de los ganglios linfáticos. Para algunos sujetos, la inflamación puede ser dolorosa. Otros síntomas de LDLBG incluyen sudores nocturnos, fiebres inexplicables y pérdida de peso. Aunque la mayoría de los pacientes con LDLBG son adultos, esta enfermedad a veces aparece en niños. El tratamiento para LDLBG incluye quimioterapia (p. ej., ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona, etopósido), anticuerpos (p. ej., Rituxan), radiación o trasplantes de células madre.

El linfoma folicular es un tipo de linfoma no hodgkiniano y es un linfoma de los linfocitos B del centro del folículo (centrocitos y centroblastos), que tiene al menos un patrón folicular parcial. Las células de linfoma folicular expresan los marcadores de linfocitos B CD10, CD19, CD20 y CD22. Las células del linfoma folicular suelen ser negativas para CD5. Desde el punto de vista morfológico, un tumor de linfoma folicular está formado por folículos que contienen una mezcla de centrocitos (también llamados células del centro del folículo escindidas o células pequeñas) y centroblastos (también llamadas células grandes del centro del folículo no escindidas o células grandes). Los folículos están rodeados de células no malignas, en su mayoría linfocitos T. Los folículos contienen predominantemente centrocitos con una minoría de centroblastos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica morfológicamente la enfermedad de la siguiente manera: grado 1 (<5 centroblastos por campo de gran aumento [cga]); grado 2 (6-15 centroblastos/cga); grado 3 (>15 centroblastos/cga). El grado 3 se subdivide adicionalmente en los siguientes grados: grado 3A (centrocitos todavía presentes); grado 3B (los folículos consisten casi en su totalidad en centroblastos). El tratamiento del linfoma folicular incluye quimioterapia, p. ej., agentes alquilantes, análogos de nucleósidos, regímenes que contienen antraciclinas, p. ej., una terapia combinada llamada CHOP-ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona/prednisolona, anticuerpos (p. ej., rituximab), radioinmunoterapia y trasplante de células madre hematopoyéticas.

La LLC es una neoplasia maligna de linfocitos B caracterizada por la proliferación y acumulación de células neoplásicas en la médula ósea, la sangre, los ganglios linfáticos y el bazo. La mediana de edad en el momento del diagnóstico de LLC es de aproximadamente 65 años. Los tratamientos actuales incluyen quimioterapia, radioterapia, terapia biológica o trasplante de médula ósea. A veces, los síntomas se tratan quirúrgicamente (p. ej., esplenectomía, extirpación del bazo agrandado) o mediante radioterapia (p. ej., reducción del volumen de los ganglios linfáticos inflamados). Los agentes quimioterapéuticos para tratar la LLC incluyen, p. ej., fludarabina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), clorambucilo, vincristina, pentostatina, ciclofosfamida, alemtuzumab (Campath-1H), doxorrubicina y prednisona. La terapia biológica para la LLC incluye anticuerpos, p. ej., alemtuzumab, rituximab y ofatumumab; así como terapias con inhibidores de la tirosina cinasa. Se pueden utilizar varios criterios para clasificar la etapa de la LLC, p. ej., el sistema Rai o Binet. El sistema Rai describe que la LLC tiene cinco etapas: etapa 0 donde solo está presente la linfocitosis; etapa I donde está presente la linfadenopatía; etapa II donde están presentes esplenomegalia, linfadenopatía o ambas; etapa III donde están presentes anemia, organomegalia o ambas (la progresión se define por pérdida de peso, fatiga, fiebre, organomegalia masiva y un recuento de linfocitos que aumenta rápidamente); y etapa IV donde están presentes anemia, trombocitopenia, organomegalia o una combinación de las mismas. Según el sistema de estadificación de Binet, hay tres categorías: etapa A, donde está presente la linfocitosis y menos de tres ganglios linfáticos están agrandados (esta etapa incluye a todos los pacientes con etapa 0 de Rai, la mitad de los pacientes en etapa I de Rai y un tercio de pacientes en etapa II de Rai); etapa B donde están implicados tres o más ganglios linfáticos; y etapa C en donde están presentes anemia o trombocitopenia, o ambas. Estos sistemas de clasificación se pueden combinar con medidas de mutación de los genes de inmunoglobulina para proporcionar una caracterización más precisa del estado de la enfermedad. La presencia de genes de inmunoglobulina mutados se correlaciona con un mejor pronóstico.

En otra realización, las células que expresan CAR de la presente invención se utilizan para tratar cánceres o leucemias, p. ej., con células madre leucémicas. Por ejemplo, las células madre leucémicas son células leucémicas $CD34^+/CD38^-$.

Enfermedades y/o Trastornos Asociados a CD20 y CD22

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a composiciones y métodos para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD20 o CD22 o una afección asociada con células que expresan CD20 o CD22 que incluye, por ejemplo, una enfermedad proliferativa tal como un cáncer o una neoplasia maligna o una afección precancerosa; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan CD20 o CD22. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD22 es un cáncer hemático, p. ej., un cáncer hemático descrito en el presente documento. En consecuencia, la invención proporciona una célula o población de células

como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto.

También se pueden incluir indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de CD20 o CD22. Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de CD20 o CD22 incluyen, pero sin limitación, p. ej., enfermedad autoinmunitaria (p. ej., lupus, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, anemia hemolítica autoinmunitaria, aplasia pura de glóbulos rojos, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Evans, vasculitis, trastornos cutáneos ampollosos, diabetes mellitus de tipo 1, síndrome de Sjogren, encefalitis anti-receptor NMDA y enfermedad de Devic, oftalmopatía de Graves y pancreatitis autoinmunitaria), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplante de órganos sólidos o células hematopoyéticas.

Las composiciones y los métodos desvelados en el presente documento se pueden utilizar para tratar enfermedades hemáticas que incluyen, pero sin limitación, mielodisplasia, anemia, hemoglobinuria nocturna paroxística, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos pura adquirida, anemia de Diamon-Blackfan, anemia de Fanconi, citopenia, trombocitopenia amegacariocítica, trastornos mieloproliferativos, policitemia vera, trombocitosis esencial, mielofibrosis, hemoglobinopatías, anemia falciforme, talasemia β mayor, entre otros.

En un aspecto, la invención proporciona células para su uso en métodos para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD22 de acuerdo con las reivindicaciones. En un aspecto, la invención proporciona células para su uso en métodos para tratar una enfermedad en la que parte del tumor es negativo para CD22 y parte del tumor es positivo para CD22. Por ejemplo, el CAR de la invención es útil para tratar sujetos que se han sometido a un tratamiento para una enfermedad asociada con la expresión de CD22, en el que el sujeto que se ha sometido a un tratamiento relacionado con la expresión de CD22 exhibe una enfermedad asociada con la expresión de CD22.

En un aspecto, la invención se refiere a células para su uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa CD22, que comprende poner en contacto la célula tumoral con una célula CAR CD22 (por ejemplo, célula T o célula NK) de la presente invención de modo que la CART se active en respuesta al antígeno y se dirija a la célula cancerosa, en la que se inhibe el crecimiento del tumor.

En un aspecto, la invención se refiere a células para su uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una célula que expresa CD22 CAR (por ejemplo, una célula T o una célula NK) de la presente invención de manera que se trate el cáncer en el sujeto. Un ejemplo de un cáncer que se puede tratar con la célula que expresa CD22 CAR (por ejemplo, célula T o célula NK) de la invención es un cáncer asociado con la expresión de CD22. Un ejemplo de un cáncer que se puede tratar con la célula que expresa CD22 CAR (por ejemplo, célula T o célula NK) de la invención incluye, entre otros, un cáncer hematológico descrito en este documento.

La invención incluye un tipo de terapia celular donde las células (por ejemplo, células T o células NK) se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula que expresa CAR (por ejemplo, célula T o células NK) se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de matar las células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células modificadas con un CAR (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) son capaces de replicarse *in vivo* lo que da como resultado una persistencia a largo plazo que puede conllevar un control sostenido del tumor. En diversos aspectos, las células (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) administrados al paciente, o su descendencia, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración del linfocito T al paciente.

La invención también incluye un tipo de terapia celular en la que las células efectoras inmunes, por ejemplo, células NK o células T se modifican, por ejemplo, mediante ARN transcrito in vitro, para expresar transitoriamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula que expresa CAR (por ejemplo, CART o célula NK que expresa CAR) se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede destruir las células cancerosas en el receptor. Por tanto, en diversos aspectos, las células que expresan CAR, p. ej., linfocitos T o linfocitos NK, que se administran al paciente están presentes durante menos de un mes, p. ej., tres semanas, dos semanas, una semana, después de la administración de la célula que expresa CAR, p. ej., linfocito T o linfocito NK, al paciente.

Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, la respuesta inmunitaria antitumoral inducida por las células modificadas con CAR (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva, o, como alternativa puede deberse a una reacción inmunitaria directa frente a indirecta. En un aspecto, las células transducidas con CAR (por ejemplo, células T o células NK) exhiben una secreción de citocinas proinflamatorias específicas y una potente actividad citolítica en respuesta a células cancerosas humanas que expresan CD22, resisten la inhibición soluble de CD22, median la muerte de células presentes y median la regresión de un tumor humano establecido. Por ejemplo, las células tumorales sin antígeno dentro de un campo heterogéneo de tumor que expresa CD22 pueden ser susceptibles a la destrucción indirecta por células T redirigidas por CD22 que previamente han reaccionado contra células cancerosas adyacentes positivas al antígeno.

En un aspecto, las células modificadas con CAR (por ejemplo, células T o células NK) de la invención, por ejemplo, células que expresan CAR completamente humanas, pueden ser un tipo de vacuna para inmunización ex vivo y/o terapia in vivo en un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a la inmunización *ex vivo*, ocurre al menos una de las siguientes *in vitro* antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en las células o iii) crioconservación de las células.

Procedimientos ex vivo son bien conocidos en la técnica y se comentan más detalladamente en lo que sigue. En resumen, las células se aíslan de un mamífero (p. ej., un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan in vitro) con un vector que expresa un CAR descrito en esta memoria. La célula modificada con un CAR se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada con un CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Como alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

El procedimiento para la expansión *ex vivo* de células progenitoras y células madre hematopoyéticas se describe en la patente de los EE. UU. Nº 5.199.942 se puede aplicar a las células de la presente invención. En la técnica existe constancia de otros métodos adecuados, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún método particular de expansión *ex vivo* de las células. En resumen, el cultivo y la expansión ex vivo de células T comprende: (1) recolectar células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero a partir de sangre periférica o explantos de médula ósea; y (2) expandir dichas células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la Patente de EE. UU. No. 5.199.942, otros factores como flt3-L, IL-1, IL-3 y el ligando c-kit, se pueden utilizar para el cultivo y expansión de las células.

Además de utilizar una vacuna basada en células en lo que se refiere a la inmunización *ex vivo*, la presente divulgación también proporciona composiciones y métodos para la inmunización *in vivo* para inducir una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno en un paciente.

Generalmente, las células activadas y expandidas como se describe en esta memoria se pueden utilizar en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos inmunodeprimidos. En particular, las células modificadas con CAR (por ejemplo, células T o células NK) de la invención se utilizan en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de CD22. En ciertos aspectos, las células de la invención se utilizan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de CD22. Por lo tanto, la presente invención proporciona células para su uso en métodos para el tratamiento o prevención de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de CD22 que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células modificadas con CAR (por ejemplo, células T o células NK) de la invención.

En un aspecto, las células que expresan CAR de la divulgación se pueden utilizar para tratar una enfermedad proliferativa tal como un cáncer o neoplasia maligna o es una afección precancerosa. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD22 es un cáncer hematológico, preleucemia, trastorno hiperproliferativo, hiperplasia o displasia, que se caracteriza por un crecimiento anormal de células.

Las células modificadas con CAR de la presente invención pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares.

La presente invención también proporciona células para su uso en métodos para inhibir la proliferación o reducir una población de células que expresan CD22, comprendiendo los métodos poner en contacto una población de células que comprende una célula que expresa CD22 con una célula que expresa CD22 CAR de la invención que se une a la célula que expresa CD22. En un aspecto específico, la presente invención proporciona células para su uso en métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD22, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD22 con una célula que expresa CD22 CAR de la invención que se une a la célula que expresa CD22. En un aspecto, la presente invención proporciona células para su uso en métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD22, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD22 con un CART CD22 de la invención que se une a la célula que expresa CD22. En ciertos aspectos, la célula que expresa CD22 CAR de la invención reduce la cantidad, número, importe o porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 65%, al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 95% o al menos un 99% en un sujeto con o en un modelo animal de malignidad de células B u otro cáncer asociado con células que expresan CD22 con respecto a un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

La presente invención proporciona células para su uso en métodos para prevenir la recaída del cáncer asociado con células que expresan CD22, comprendiendo los métodos la administración a un sujeto que lo necesita de una

célula que expresa CD22 CAR de la invención que se une a la célula que expresa CD22. En un aspecto, los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una célula que expresa CD22 CAR descrita en este documento que se une a la célula que expresa CD22 en combinación con una cantidad efectiva de otra terapia.

En algunas realizaciones, la célula que expresa CD22 expresa CD19, CD123, FLT-3, ROR-1, CD79b, CD179b, CD79a, CD10, CD34 y/o CD20. En determinadas realizaciones, la célula que expresa CD22 expresa CD19. En algunas realizaciones, la célula que expresa CD22 no expresa CD19. En algunos casos, la célula que expresa CD20 expresa CD19, CD123, FLT-3, ROR-1, CD79b, CD179b, CD79a, CD 10, CD34 y/o CD22. En determinados casos, la célula que expresa CD20 expresa CD19. En algunos casos, la célula que expresa CD20 no expresa CD19.

En algunas realizaciones, el sujeto no responde a la terapia con CAR CD19. En algunas realizaciones, el sujeto responde de forma parcial a la terapia con CAR CD19. En algunas realizaciones, el sujeto responde completamente a la terapia con CAR CD19. En algunas realizaciones, el sujeto no es recidivante a la terapia con CAR CD19. En algunas realizaciones, el sujeto es parcialmente recidivante a la terapia con CAR CD19. En algunas realizaciones, el sujeto es completamente recidivante a la terapia con CAR CD19.

En algunas realizaciones, un cáncer u otra afección que respondía previamente al tratamiento con células que expresan CAR CD19 no expresa CD19. En algunas realizaciones, un cáncer u otra afección que anteriormente respondía al tratamiento con células que expresaban CAR CD19 tiene una reducción del 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más en los niveles de expresión de CD19 con respecto a cuando el cáncer u otra afección respondía al tratamiento con células que expresaban CAR CD19. En algunas realizaciones, un cáncer u otra afección que respondía previamente al tratamiento con células que expresan CAR CD19 expresa CD20, CD22, CD123 o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR CD22 de la invención se administra después de una recaída de un cáncer u otra afección tratada previamente con una célula que expresa CAR CD19. En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR CD19 y una célula que expresa CAR CD22 se administran simultáneamente, como se describe en este documento.

Ablación de médula ósea

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones y métodos para la ablación de médula ósea. Por ejemplo, en un aspecto, la divulgación se refiere a composiciones y métodos para la erradicación de al menos una porción de la médula ósea existente en un sujeto. Se ha descrito en el presente documento que, en determinados casos, la célula que expresa CD19, C20 o CD22 que comprende un CAR de la presente divulgación erradica células progenitoras mieloides de médula ósea positivas para CD19, C20 o CD22.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método de ablación de médula ósea, que comprende administrar una célula CAR que expresa CD19, C20, o CD22 (p. ej., célula T o célula NK) de la divulgación a un sujeto que necesita de la ablación de médula ósea. Por ejemplo, el presente método se puede utilizar para erradicar parte o la totalidad de la médula ósea de un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en el que el trasplante de médula ósea o reacondicionamiento de médula ósea es una estrategia de tratamiento beneficiosa. En un aspecto, el método de ablación de médula ósea de la divulgación, que comprende la administración de una célula CAR que expresa CD19, C20 o CD22 (p. ej., linfocito T o linfocito NK) descrita en otra parte del presente documento, se realiza en un sujeto antes del trasplante de médula ósea. Por tanto, en un aspecto, el método de la divulgación proporciona una pauta de acondicionamiento celular antes del trasplante de médula ósea o de células madre. En un aspecto, el trasplante de médula ósea comprende el trasplante de una célula madre. El trasplante de médula ósea puede comprender trasplante de células autólogas o alogénicas.

La presente divulgación se refiere a un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende administrar una célula CAR que expresa CD19, C20 o CD22 (por ejemplo, una célula T o una célula NK) de la divulgación para erradicar al menos una parte de la médula ósea existente. El método se puede utilizar como al menos una porción de una pauta de tratamiento para tratar cualquier enfermedad o trastorno donde el trasplante de médula ósea es beneficioso. Es decir, el método de la presente se puede utilizar en cualquier sujeto que necesite un trasplante de médula ósea. En un aspecto, la ablación de la médula ósea que comprende la administración de una célula CAR que expresa CD19, C20 o CD22 (p. ej., linfocito T o linfocito NK) es útil en el tratamiento de la LMA. En determinados aspectos, la ablación de médula ósea según el presente método es útil para tratar un cáncer hemático, un tumor sólido, una enfermedad hemática, un trastorno metabólico, VIH, HTLV, un trastorno por almacenamiento lisosomal y una inmunodeficiencia. La invención proporciona una célula o población de células para uso en un método para tratar un cáncer hematológico en un sujeto, de acuerdo con las reivindicaciones.

Las composiciones y los métodos desvelados en el presente documento se pueden usar para erradicar al menos una parte de la médula ósea existente para tratar cánceres hemáticos que incluyen, entre otros, los cánceres

descritos en el presente documento, p. ej., leucemia, linfoma, mieloma, LLA, LMA, LLC, LMC, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano (p. ej., LDLBG o linfoma folicular) y mieloma múltiple.

En un aspecto, la presente invención proporciona células para su uso en un método de tratamiento del cáncer que comprende el acondicionamiento de la médula ósea, en el que al menos una porción de la médula ósea del sujeto es erradicada por la célula CD22 CAR (por ejemplo, célula T o célula NK) de la invención. Por ejemplo, en determinados casos, la médula ósea del sujeto comprende una célula precursora maligna que puede ser seleccionada y eliminada por la actividad de la célula CAR C20 o CD22 (p. ej., linfocito T o linfocito NK). En un aspecto, una terapia de acondicionamiento de la médula ósea comprende administrar un trasplante de médula ósea o células madre al sujeto tras la erradicación de la médula ósea nativa. En un aspecto, la terapia de reacondicionamiento de la médula ósea se combina con una o más de otras terapias contra el cáncer que incluyen, sin carácter limitante, terapias CAR antitumorales, quimioterapia, radiación y similares.

En un aspecto, puede requerirse la erradicación de las células que expresan CAR CD19, CD20 o CD22 administradas antes de la infusión de médula ósea o trasplante de células madre. La erradicación de la célula CAR que expresa CD19, CD20 o CD22 (por ejemplo, célula T o célula NK) se puede lograr utilizando cualquier estrategia o tratamiento adecuado, incluido, entre otros, el uso de un gen suicida, la persistencia limitada de CAR utilizando CAR codificados por ARN, o modalidades anti-células T que incluyen anticuerpos o quimioterapia.

Terapias de combinación

La combinación de un CAR como se describe en el presente documento (p. ej., un CAR CD20, un CAR CD22 o una célula que expresa CAR CD19 descrita en el presente documento, p. ej., y uno o más inhibidores de linfocitos B, p. ej., como se describe en el presente documento) puede usarse en combinación con otros agentes y terapias conocidas. Los tratamientos de la invención utilizan una célula o población de células que comprenden una molécula de CAR CD22 o una molécula de ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

La célula que expresa CAR, opcionalmente los uno o más inhibidores de células B y/o el al menos un agente terapéutico adicional se pueden administrar simultáneamente, en la misma composición o en composiciones separadas, o secuencialmente. Para la administración secuencial, la célula que expresa CAR se puede administrar primero y el agente adicional se puede administrar en segundo lugar, o se puede invertir el orden de administración.

La terapia con CAR y/u otros agentes (tales como una segunda terapia con CAR), procedimientos o modalidades terapéuticos se pueden administrar durante periodos de trastorno activo o durante un periodo de remisión o enfermedad menos activa. La terapia con CAR se puede administrar antes del otro tratamiento, a la vez que el tratamiento, después del tratamiento o durante la remisión del trastorno.

Por ejemplo, se puede administrar una terapia CAR a un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD19, CD20 o CD22, por ejemplo, un cáncer. La invención proporciona una célula o población de células como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto. El sujeto puede someterse a ensayo en busca de indicadores de capacidad de respuesta o recaída. En algunos casos, cuando el sujeto muestra uno o más signos de recaída, p. ej., un cambio de marco y/o un codón de terminación prematuro en CD19, se administra una terapia adicional. En algunos casos, la terapia adicional es un inhibidor de linfocitos B. La terapia con CD19, cuando se utiliza, puede continuarse (por ejemplo, cuando todavía hay algunas células cancerosas que expresan CD19 detectables en el sujeto) o puede suspenderse (por ejemplo, cuando un análisis de riesgo-beneficio favorece la suspensión de la terapia).

Cuando se administran combinados, la terapia con CAR y el agente adicional (p. ej., segundo o tercer agente), o todos, se pueden administrar en una cantidad o dosis que es superior, inferior o igual a la cantidad o dosificación de cada agente que se utiliza de manera individual, p. ej., como una monoterapia. En determinadas realizaciones, la cantidad o dosificación administrada de la terapia con CAR, el agente adicional (p. ej., segundo o tercer agente), o todos, es inferior (p. ej., al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 % o al menos un 50 %) a la cantidad o dosificación de cada agente utilizado de manera individual, p. ej., como una monoterapia. En otras realizaciones, la cantidad o dosificación de la terapia con CAR, el agente adicional (p. ej., segundo o tercer agente), o todos, que da como resultado un efecto deseado (p. ej., el tratamiento del cáncer) es inferior (p. ej., al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 % o al menos un 50 % inferior) a la cantidad o dosificación de cada agente utilizado de manera individual, p. ej., como una monoterapia, requerida para lograr el mismo efecto terapéutico.

En algunas realizaciones, uno o más de los agentes terapéuticos en la terapia de combinación es una molécula de anticuerpo. Los antígenos del cáncer pueden ser diana de la terapia con anticuerpos monoclonales. Se ha demostrado que la terapia con anticuerpos monoclonales (mAb) ejerce poderosos efectos antitumorales a través de múltiples mecanismos, incluida la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la inhibición celular directa o los efectos inductores de la apoptosis en las células tumorales que sobreexpresan las moléculas diana.

En otros aspectos, la célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones puede usarse en un régimen de tratamiento en combinación con cirugía, quimioterapia, radiación, un inhibidor de la vía mTOR, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación, vacuna peptídica, tal como la descrita en Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

En una realización, la célula que expresa CAR CD22 (por ejemplo, y uno o más inhibidores de células B) se puede utilizar en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos ilustrativos incluyen una antraciclina (p. ej., doxorrubicina (p. ej., doxorrubicina liposomal)); un alcaloide de la vinca (p. ej., vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina); un agente alquilante (p. ej., ciclofosfamida, descarbazina, melfalán, ifosfamida, temozolomida); un anticuerpo de células inmunitarias (p. ej., alemtuzamab, gemtuzumab, rituximab, tositumomab); un antimetabolito (que incluye, p. ej., antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa (p. ej., fludarabina)); un agonista de la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides TNFR (GITR); un inhibidor del proteasoma (p. ej., aclacinomicina A, gliotoxina o bortezomib); un inmunomodulador tal como talidomida o un derivado de talidomida (p. ej., lenalidomida).

Los agentes quimioterapéuticos generales considerados para su uso en terapias combinadas incluyen (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfán (Myleran®), inyección de busulfán (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonli-5-deoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucilo (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytoxan® o Neosar®), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar-U®), inyección de liposomas de citarabina (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (Actinomicina D, Cosmegan), hidrocloruro de daunorrubicina (Cerubidine®), inyección de liposomas de citrato de daunorrubicina (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), hidrocloruro de doxorrubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Adrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitibina, gemcitabina (difluorodesoxicitidina), hidroxiurea (Hydrea®), idarrubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecán (Camptosar®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina cálcica, melfalán (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), mylotarg, paclitaxel (Taxol®), nab-paclitaxel (Abraxane®), phoenix (Yttrium90/MX-DTPA), pentostatina, implante de carmustina con polifeprosan 20 (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), hidrocloruro de topotecán inyectable (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), y vinorrelbina (Navelbine®).

El tratamiento con una combinación de un agente quimioterapéutico y una célula que expresa una molécula de CAR descrita en el presente documento puede utilizarse para tratar un cáncer hemático descrito en el presente documento, p. ej., LMA. En algunas realizaciones, la combinación de un agente quimioterapéutico y una célula que expresa CAR es útil para atacar, por ejemplo, matar, células madre cancerosas, por ejemplo, células madre leucémicas, por ejemplo, en sujetos con LMA. En algunas realizaciones, la combinación de un agente quimioterapéutico y una célula que expresa CAR es útil para tratar la enfermedad residual mínima (ERM). La EMR se refiere al pequeño número de células cancerosas que permanecen en un sujeto durante el tratamiento, p. ej., quimioterapia, o después del tratamiento. La EMR es, con frecuencia, una causa principal de recaída. La presente divulgación se refiere a un método para tratar el cáncer, por ejemplo, MRD, que comprende administrar un agente quimioterapéutico en combinación con una célula que expresa CAR, por ejemplo, como se describe en este documento.

En una realización, el agente quimioterapéutico se administra antes de la administración de la célula que expresa una molécula CAR. En los regímenes quimioterapéuticos en los que se desea más de una administración del agente quimioterapéutico, el régimen quimioterapéutico se inicia o se completa antes de la administración de una célula que expresa una molécula CAR. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico se administra al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 20 días, 25 días o 30 días antes de la administración de la célula que expresa la molécula CAR. En algunas realizaciones, el régimen quimioterapéutico se inicia o se completa al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 20 días, 25 días o 30 días antes de la administración de la célula que expresa la molécula CAR. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico que aumenta la expresión de CD19, CD20 o CD22 en las células cancerosas, por ejemplo, las células tumorales, por ejemplo, en comparación con la expresión en células normales o no cancerosas. La expresión se puede determinar, por ejemplo, mediante tinción inmunohistoquímica o análisis de citometría de flujo. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico es citarabina (Ara-C).

Los agentes anticancerígenos de particular interés para combinaciones con los compuestos de la presente invención incluyen: antimetabolitos; fármacos que inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina o la cinasa p70S6 FK506) o inhiben la cinasa p70S6; agentes alquilantes; inhibidores de mTOR; inmunomoduladores; antraciclinas; alcaloides de la vinca; inhibidores del proteosoma; agonistas de GITR; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; un inhibidor de la cinasa CDK4; un inhibidor de la cinasa BTK; un inhibidor de la cinasa MKN; un inhibidor de la cinasa DGK; o un virus oncolítico.

Los antimetabolitos ejemplares incluyen, sin limitación, antagonistas del ácido fólico (también denominados en este documento antifolatos), análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de la adenosina desaminasa): metotrexato (Rheumatrex®, Trexall®), 5-fluorouracilo (Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®), floxuridina (FUDF®), citarabina (Cytosar-U®, Tarabine PFS), 6-mercaptopurina (Puri-Nethol®)), 6-tioguanina (Thioguanine Tabloid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), pentostatina (Nipent®), pemetrexed (Alimta®), raltitrexed (Tomudex®), cladribina (Leustatin®), clofarabina (Clofarex®, Clolar®), mercaptopurina (Puri-Nethol®), capecitabina (Xeloda®), nelarabina (Arranon®), azacitidina (Vidaza®) y gemcitabina (Gemzar®). Los antimetabolitos preferidos incluyen, por ejemplo, 5-fluorouracilo (Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®), floxuridina (FUDF®), capecitabina (Xeloda®), pemetrexed (Alimta®), raltitrexed (Tomudex®) y gemcitabina (Gemzar®).

Agentes alquilantes ejemplares incluyen, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), clormetina (Mustargen®), ciclofosfamida (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procitox®, Revimmune™), ifosfamida (Mitoxana®), melfalán (Alkeran®), clorambucilo (Leukeran®), pipobromán (Amedel®, Vercyte®), trietilenmelamina (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), trietilentiofosforamina, temozolomida (Temodar®), tiotepa (Thioplex®), busulfán (Busilvex®, Myleran®), carmustina (BiCNU®), lomustina (CeeNU®), estreptozocina (Zanosar®) y Dacarbazina (DTIC-Dome®). Agentes alquilantes ilustrativos adicionales incluyen, sin limitación, oxaliplatino (Eloxatin®); Temozolomida (Temodar® y Temodal®); Dactinomicina (también conocida como actinomicina-D, Cosmegen®); Melfalán (también conocido como L-PAM, L-sarcolisina y mostaza de fenilalanina, Alkeran®); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Carmustina (BiCNU®); Bendamustina (Treanda®); Busulfán (Busulfex® y Myleran®); carboplatino (Paraplatin®); Lomustina (también conocida como CCNU, CeeNU®); Cisplatino (también conocido como CDDP, Platinol® y Platinol®-AQ); Clorambucilo (Leukeran®); Ciclofosfamida (Cytoxan® y Neosar®); Dacarbazina (también conocida como DTIC, DIC e imidazol carboxamida, DTIC-Dome®); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Ifosfamida (Ifex®); prednumustina; Procarbazina (Matulane®); Mecloretamina (también conocida como mostaza nitrogenada, mustina y clorhidrato de mecloretamina, Mustargen®); Estreptozocina (Zanosar®); Tiotepa (también conocido como tiofosfamida, TESPA y TSPA, Thioplex®); Ciclofosfamida (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procitox®, Revimmune®); y bendamustina HCl (Treanda®).

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con fludarabina, ciclofosfamida y/o rituximab. En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR). En algunas realizaciones, el sujeto tiene LLC. Por ejemplo, el sujeto tiene una supresión en la rama corta del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene una del(17p). En algunas realizaciones, el sujeto comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (IgV_H). En otras realizaciones, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (IgV_H). En algunas realizaciones, la fludarabina se administra a una dosis de aproximadamente 10-50 mg/m^2 (p. ej., de aproximadamente 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 o 45-50 mg/m^2), p. ej., por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la ciclofosfamida se administra a una dosis de aproximadamente 200-300 mg/m^2 (p. ej., de aproximadamente 200-225, 225-250, 250-275 o 275-300 mg/m^2), p. ej., por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el rituximab se administra a una dosis de aproximadamente 400-600 mg/m2 (p. ej., 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg/m^2), p. ej., por vía intravenosa.

En realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con bendamustina y rituximab. En algunas realizaciones, el sujeto tiene LLC. Por ejemplo, el sujeto tiene una supresión en la rama corta del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene una del(17p). En algunas realizaciones, el sujeto comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (IgV_H). En otras realizaciones, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (IgV_H). En algunas realizaciones, la bendamustina se administra a una dosis de aproximadamente 70-110 mg/m2 (p. ej., 70-80, 80-90, 90-100 o 100-110 mg/m2), p. ej., por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el rituximab se administra a una dosis de aproximadamente 400-600 mg/m2 (p. ej., 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg/m^2), p. ej., por vía intravenosa.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y/o un corticosteroide (por ejemplo, prednisona). En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP). En realizaciones, el sujeto tiene linfoma difuso de célula B grandes (LDLBG). En casos, el sujeto tiene LDLBG en estadio limitado no voluminoso (p. ej., comprende un tumor que tiene un tamaño/diámetro de menos de 7 cm). En algunas realizaciones, se trata al sujeto con radiación en combinación con R-CHOP. Por ejemplo, al sujeto se le administra R-CHOP (p. ej., 1-6 ciclos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de R-CHOP), seguido de radiación. En algunos casos, al sujeto se le administra R-CHOP (p. ej., 1-6 ciclos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de R-CHOP) después de la radiación.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina y/o rituximab. En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina y rituximab (EPOCH-R). En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con EPOCH-R de dosis ajustada (DA-EPOCH-R). En algunas realizaciones, el sujeto tiene un linfoma de célula B, p. ej., un linfoma agresivo de células B con reordenamiento de Myc.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con rituximab y/o lenalidomida. La lenalidomida ((*RS*)-3-(4-amino-1-oxo 1,3-dihidro-2H-isoindol- 2-il)piperidina-2,6-diona) es un inmunomodulador. En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con rituximab y lenalidomida. En algunas realizaciones, el sujeto tiene linfoma folicular (FL) o linfoma de células del manto (MCL). En algunas realizaciones, el sujeto tiene FL y no se ha tratado previamente con una terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, se administra lenalidomida a una dosis de aproximadamente 10-20 mg (p. ej., 10-15 o 15-20 mg), p. ej., diariamente. En algunas realizaciones, se administra rituximab a una dosis de aproximadamente 350-550 mg/m^2 (p. ej., 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg/m^2), p. ej., por vía intravenosa.

Los inhibidores ejemplares de mTOR incluyen, por ejemplo, temsirolimus; ridaforolimus (formalmente conocido como deferolimus, dimetilfosfinato de (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2 [(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*, 23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23, 29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0^{4,9}] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la publicación PCT n.º WO 03/064383); everolimus (Afinitor® o RAD001); rapamicina (AY22989, Sirolimus®); simapimod (CAS 164301-51-3); emsirolimus, (5-{2,4-Bis[(3*S*)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-Amino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y *N*^{2}-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4*H*-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartilL-serina-, sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1) (SEQ ID NO: 1316) y XI,765.

Los inmunomoduladores ilustrativos incluyen, p. ej., afutuzumab (disponible de Roche®); pegfilgrastim (Neulasta®); lenalidomida (CC-5013, Revlimid®); talidomida (Thalomid®), actimid (CC4047); e IRX-2 (mezcla de citocinas humanas que incluyen interleucina 1, interleucina 2 e interferón γ, CAS 951209-71-5, disponible de IRX Therapeutics).

Las antraciclinas ilustrativas incluyen, p. ej., doxorubicina (Adriamycin® y Rubex®); bleomicina (lenoxano®); daunorubicina (clorhidrato de dauorubicina, daunomicina y clorhidrato de rubidomicina, Cerubidine®); daunorubicina liposómica (liposoma de citrato de daunorubicina, DaunoXome®); mitoxantrona (DHAD, Novantrone®); epirubicina (Ellence™); idarubicina (Idamycin®, Idamycin PFS®); mitomicina C (Mutamycin®); geldanamicina; herbimicina; ravidomicina; y desacetilravidomicina.

Los alcaloides de la vinca ilustrativos incluyen, p. ej., tartrato de vinorelbina (Navelbine®), vincristina (Oncovin®) y vindesina (Eldisine®)); vinblastina (también conocida como sulfato de vinblastina, vincaleucoblastina y VLB, Alkaban-AQ® y Velban®); y vinorelbina (Navelbine®).

Los inhibidores ilustrativos del proteasoma incluyen bortezomib (Velcade®); carfilzomib (PX-171-007, (*S*)-4-metil-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-4-metil-1-((*R*)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((*S*)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida); marizomib (NPI-0052); citrato de ixazomib (MLN-9708); delanzomib (CEP-18770); y *O*-metil-*N*-[(2-metil-5-tiazolil)carbonil]-L-seril-*O*-metil-*N*-[(1*S*)-2-[(2*R*)-2-metil-2-oxiranil]-2-oxo-1-(fenilmetil)etil]-L-serinamida (ONX-0912).

En realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con brentuximab. Brentuximab es un conjugado de anticuerpo-fármaco de un anticuerpo anti-CD30 y monometil-auristatina E. En algunas realizaciones, el sujeto padece linfoma de Hodgkin (LH), p. ej., LH recurrente o refractario. En algunas realizaciones, el sujeto comprende LH CD30+. En algunas realizaciones, el sujeto se ha sometido a un trasplante autólogo de células madre (ASCT). En algunas realizaciones, el sujeto no se ha sometido a un ASCT. En algunas realizaciones, se administra brentuximab a una dosis de aproximadamente 1-3 mg/kg (p. ej., aproximadamente 1-1.5, 1.5-2, 2-2.5 o 2.5-3 mg/kg), p. ej., por vía intravenosa, p. ej., cada 3 semanas.

En realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con brentuximab y dacarbazina o en combinación con brentuximab y bendamustina. La dacarbazina es un agente alquilante con un nombre químico de 5-(3,3-dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida. La bendamustina es un agente alquilante con un nombre químico de ácido 4-[5-[Bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbencimidazol-2-il]butanoico. En algunas realizaciones, el sujeto padece linfoma de Hodgkin (LH). En algunas realizaciones, el sujeto no se ha tratado previamente con una terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto tiene al menos 60 años de edad, p. ej., 60, 65, 70, 75, 80, 85 o más. En algunas realizaciones, se

administra dacarbazina a una dosis de aproximadamente 300-450 mg/m^2 (p. ej., 300-325, 325-350, 350-375, 375-400, 400-425 o 425-450 mg/m^2), p. ej., por vía intravenosa. En realizaciones, la bendamustina se administra a una dosificación de aproximadamente 75-125 mg/m2 (por ejemplo, 75-100 o 100-125 mg/m^2, por ejemplo, aproximadamente 90 mg/m^2), p. ej., por vía intravenosa. En algunas realizaciones, se administra brentuximab a una dosis de aproximadamente 1-3 mg/kg (p. ej., aproximadamente 1-1.5, 1.5-2, 2-2.5 o 2.5-3 mg/kg), p. ej., por vía intravenosa, p. ej., cada 3 semanas.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de CD20, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, un anticuerpo mono o biespecífico anti-CD20) o un fragmento del mismo. Los anticuerpos anti-CD20 ejemplares incluyen, entre otros, rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, veltuzumab, obinutuzumab, TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), ocaratuzumab y Pro 13 1921 (Genentech). Véase, p. ej., Lim et al. Haematologica. 95,1(2010):135-43.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD20 comprende rituximab. Rituximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa quimérico de ratón/ser humano que se une a CD20 y provoca la citólisis de una célula que expresa CD20, p. ej., como se describe en www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf. En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con rituximab. En algunas realizaciones, el sujeto tiene LLC o LLCP.

En algunas realizaciones, se administra rituximab por vía intravenosa, p. ej., como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada infusión proporciona aproximadamente 500-2000 mg (p. ej., aproximadamente500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900, o 1900-2000 mg) de rituximab. En algunos casos, rituximab se administra a una dosis de 150 mg/m^2 a 750 mg/m^2, p. ej., aproximadamente 150-175 mg/m^2, 175-200 mg/m^2, 200-225 mg/m^2, 225-250 mg/m^2, 250-300 mg/m^2, 300-325 mg/m^2, 325-350 mg/m^2, 350-375 mg/m^2, 375-400 mg/m^2, 400-425 mg/m^2, 425-450 mg/m^2, 450-475 mg/m^2, 475-500 mg/m^2, 500-525 mg/m^2, 525-550 mg/m^2, 550-575 mg/m^2, 575-600 mg/m^2, 600-625 mg/m^2, 625-650 mg/m^2, 650-675 mg/m^2 o 675-700 mg/m^2, donde m^2 indica el área de superficie corporal del sujeto. En algunas realizaciones, se administra rituximab en un intervalo de dosificaciones de al menos 4 días, p. ej., 4, 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, se administra rituximab en un intervalo de dosificaciones de al menos 0,5 semanas, p. ej., 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas o más. En algunas realizaciones, se administra rituximab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en esta memoria durante un periodo de tiempo, p. ej., al menos 2 semanas, p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 semanas o más. Por ejemplo, se administra rituximab en una dosis e intervalo de dosificaciones descritos en el presente documento durante un total de al menos 4 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD20 comprende ofatumumab. El ofatumumab es un anticuerpo monoclonal humano IgG1k anti-CD20 con un peso molecular de aproximadamente 149 kDa. Por ejemplo, se genera ofatumumab utilizando tecnología de ratón transgénico e hibridoma y se expresa y purifica a partir de una línea celular murina recombinante (NS0). Véase, p. ej., www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/1253261bl.pdf; y los números de identificador de ensayos clínicos NCT01363128, NCT01515176, NCT01626352 y NCT01397591. En algunas realizaciones, se administra una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones a un sujeto en combinación con ofatumumab. En algunas realizaciones, el sujeto tiene LLC o LLCP.

En algunas realizaciones, se administra ofatumumab como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada una de las infusiones proporciona aproximadamente150-3000 mg (p. ej., aproximadamente 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1200, 1200-1400, 1400-1600, 1600-1800, 1800-2000, 2000-2200, 2200-2400, 2400-2600, 2600-2800, o 2800-3000 mg) de ofatumumab. En algunas realizaciones, se administra ofatumumab a una dosis de partida de aproximadamente 300 mg, seguida de 2000 mg, p. ej., durante aproximadamente 11 dosis, p. ej., durante 24 semanas. En algunas realizaciones, se administra ofatumumab en un intervalo de dosificaciones de al menos 4 días, p. ej., 4, 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, se administra ofatumumab en un intervalo de dosificaciones de al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 20, 22, 24, 26, 28, 30 semanas o más. En algunas realizaciones, se administra ofatumumab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en esta memoria durante un periodo de tiempo, p. ej., al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o 1, 2, 3, 4, 5 años o más. Por ejemplo, se administra ofatumumab a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en esta memoria durante un total de al menos 2 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende ocrelizumab. Ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado, p. ej., como se describe en los Identificadores de Ensayo Clínico Nºs NCT00077870, NCT01412333, NCT00779220, NCT00673920, NCT01194570, y Kappos et al. Lancet. 19,378(2011):1779-87.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende veltuzumab. Veltuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra CD20. Véase, por ejemplo, Identificador de ensayo clínico núm. NCT00547066, NCT00546793, NCT01101581 y Goldenberg et al. Leuk Lymphoma. 51 (5) (2010): 747-55.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende GA101. GA101 (también denominado obinutuzumab o RO5072759) es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado y gluco-manipulado. Véase, p. ej., Robak. Curr. Opin. Investig. Drugs. 10.6(2009):588-96; Números de identificación de ensayos clínicos: NCT01995669, NCT01889797, NCT02229422, y NCT01414205; y www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s000lbl.pdf.

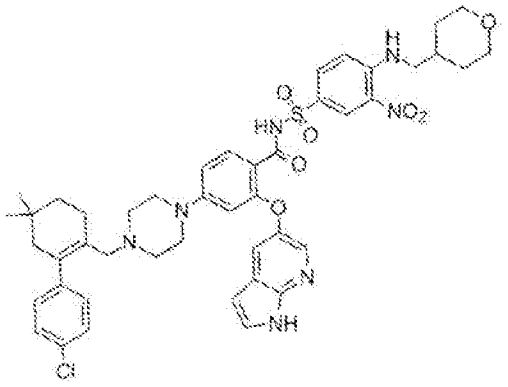
En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende AME-133v. El AME-133v (también denominado LY2469298 u ocaratuzumab) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado contra CD20 con mayor afinidad por el receptor FcγRIIIa y una actividad de citotoxicidad celular potenciada dependiente de anticuerpos (ADCC) en comparación con rituximab. Véase, p. ej., Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25; y Forero-Torres et al. Clin. Cancer Res. 18,5(2012):1395-403.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende PRO131921. El PRO131921 es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado manipulado para tener una mejor unión a FcγRIIIa y ADCC potenciada en comparación con rituximab. Véase, p. ej., Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25; y Casulo et al. Clin Immunol. 154.1(2014):37-46; e Identificador de Ensayo Clínico Nº NCT00452127.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende TRU-015. El TRU-015 es una proteína de fusión anti-CD20 derivada de dominios de un anticuerpo contra CD20. El TRU-015 es más pequeño que los anticuerpos monoclonales, pero conserva las funciones efectoras mediadas por Fc. Véase, p. ej., Robak et al. BioDrugs 25.1(2011): 13-25. TRU-015 contiene un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-CD20 vinculado a los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana, pero carece de los dominios CH1 y CL.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD20 descrito en esta memoria se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico, p. ej., un agente quimioterapéutico (p. ej., citoxano, fludarabina, inhibidor de histona desacetilasa, agente desmetilante, vacuna peptídica, antibiótico antitumoral, inhibidor de tirosina quinasa, agente alquilante, agente antimicrotúbulos o antimitótico), agente antialérgico, agente antináuseas (o antiemético), analgésico o agente citoprotector descrito en esta memoria.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor del linfoma de células B 2 (BCL-2) (por ejemplo, venetoclax, también llamado ABT-199 o GDC-0199;) y/o rituximab. En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con venetoclax y rituximab. Venetoclax es una pequeña molécula que inhibe la proteína antiapoptótica, BCL-2. La estructura de venetoclax (4-(4- { [2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil}piperazin-1-il)-*N*-({3-nitro-4-[(tetrahidro-2*H*-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1*H*-pirrolo[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida) se muestra a continuación.



En algunas realizaciones, el sujeto tiene LLC. En algunas realizaciones, el sujeto tiene LLC recidivante, p. ej., al sujeto se le ha administrado previamente una terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, se administra venetoclax a una dosis de aproximadamente 15-600 mg (p. ej., 15-20, 20-50, 50-75, 75-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500 o 500-600 mg), p. ej., diariamente. En algunas realizaciones, el rituximab se administra en una dosis de aproximadamente 350-550 mg/m2 (por ejemplo, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg/m2), p. ej., por vía intravenosa, p. ej., mensualmente.

En algunas realizaciones, una o más células que expresan CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administran en combinación con un virus oncolítico. En algunas realizaciones, los virus oncolíticos son capaces de replicarse selectivamente y desencadenar la muerte o retardar el crecimiento de una célula cancerosa. En algunos casos,

los virus oncolíticos no tienen ningún efecto o tienen un efecto mínimo sobre las células no cancerosas. Un virus oncolítico incluye, entre otros, un adenovirus oncolítico, virus del herpes simple oncolítico, retrovirus oncolítico, parvovirus oncolítico, virus vaccinia oncolítico, virus Sinbis oncolítico, virus de la gripe oncolítico o virus de ARN oncolítico (por ejemplo, reovirus oncolítico, virus de la enfermedad de Newcastle oncolítico (NDV), virus oncolítico del sarampión o virus de la estomatitis vesicular oncolítica (VSV)).

En algunas realizaciones, el virus oncolítico es un virus, por ejemplo, un virus oncolítico recombinante, descrito en el documento US2010/0178684 A1. En algunas realizaciones, un virus oncolítico recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico heteróloga) que codifica un inhibidor de una respuesta inmune o inflamatoria, por ejemplo, como se describe en el documento US2010/0178684 A1. En realizaciones, el virus oncolítico recombinante, por ejemplo, NDV oncolítico, comprende una proteína proapoptótica (por ejemplo, apoptina), una citocina (por ejemplo, GM-CSF, interferón gamma, interleucina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral alfa), una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo contra ED-B fibronectina), un antígeno asociado a un tumor, una proteína adaptadora biespecífica (por ejemplo, anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo dirigido contra la proteína HN de NDV y un receptor coestimulador de células T, tal como CD3 o CD28; o una proteína de fusión entre IL-2 humana y anticuerpo de cadena sencilla dirigido contra la proteína HN de NDV). Véase, p. ej., Zamarin et al. Future Microbiol. 7,3(2012):347-67. En algunas realizaciones, el virus oncolítico es un NDV oncolítico quimérico descrito en los documentos US 8591881 B2, US 2012/0122185 A1 o US 2014/0271677 A1.

En algunas realizaciones, el virus oncolítico comprende un adenovirus condicionalmente replicativo (CRAd), que está diseñado para replicarse exclusivamente en células cancerosas. Véase, p. ej., Alemany et al. Nature Biotechnol. 18(2000):723-27. En algunas realizaciones, un adenovirus oncolítico comprende uno descrito en la Tabla 1 en la página 725 de Alemany et al..

Los virus oncolíticos ejemplares incluyen, entre otros, los siguientes:

Adenovirus oncolítico del grupo B (ColoAd1) (PsiOxus Therapeutics Ltd.) (véase, por ejemplo, Identificador de Ensayo Clínico: NCT02053220);

ONCOS-102 (previamente denominado CGTG-102), que es un adenovirus que comprende factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Oncos Therapeutics) (véase, p. ej., el Identificador del Ensayo Clínico: NCT01598129);

VCN-01, que es un adenovirus humano oncolítico modificado genéticamente que codifica la hialuronidasa PH20 humana (VCN Biosciences, S.L.) (véase, p. ej., Identificadores de Ensayos Clínicos: NCT02045602 y NCT02045589);

Adenovirus condicionalmente replicativo ICOVIR-5, que es un virus derivado del serotipo 5 del adenovirus humano de tipo salvaje (Had5) que se ha modificado para replicarse selectivamente en células cancerosas con una vía retinoblastoma/E2F desregulada (Institut Català d'Oncologia) (véase, p. ej., Identificador de ensayo clínico: NCT01864759);

Celyvir, que comprende células madre mesenquimales autólogas (CMM) derivadas de la médula ósea infectadas con ICOVIR5, un adenovirus oncolítico (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, España/Ramon Alemany) (véase, p. ej., Identificador del Ensayo Clínico: NCT01844661);

CG0070, que es un adenovirus oncolítico del serotipo 5 (Ad5) que se replica condicionalmente, en el que el promotor E2F-1 humano impulsa la expresión de los genes víricos esenciales E1a, restringiendo con ello la replicación vírica y la citotoxicidad a las células tumorales defectuosas en la vía Rb (Cold Genesys, Inc.) (véase, p. ej., Identificador del Ensayo Clínico: NCT02143804); o

DNX-2401 (anteriormente llamado Delta-24-RGD), que es un adenovirus que ha sido diseñado para replicarse selectivamente en células deficientes en la vía del retinoblastoma (Rb) y para infectar células que expresan ciertas integrinas que se unen a RGD de manera más eficiente (Clínica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/ DNAtrix, Inc.) (véase, p. ej., Identificador de ensayo clínico: NCT01956734).

En algunas realizaciones, un virus oncolítico descrito en este documento se administra mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intraarterial, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. En algunas realizaciones, un virus oncolítico descrito en este documento se administra por vía intratumoral, transdérmica, transmucosa, oral, intranasal o mediante administración pulmonar.

En una realización, las células que expresan un CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administran a un sujeto en combinación con una molécula que disminuye la población de células Treg. Se conocen en la técnica métodos que disminuyen el número de células Treg (por ejemplo, las agotan) e incluyen, por ejemplo, la eliminación

de CD25, la administración de ciclofosfamida y la modulación de la función de GITR. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que reducir la cantidad de células Treg en un sujeto antes de la aféresis o antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en este documento reduce la cantidad de células inmunes no deseadas (por ejemplo, Treg) en el microambiente del tumor y reduce el riesgo de recaída del sujeto.

En una realización, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con una molécula que disminuye la población de células Treg. Los métodos que disminuyen el número de (p. ej., agotan) los linfocitos Treg son conocidos en la técnica e incluyen, p. ej., el agotamiento de CD25, la administración de ciclofosfamida y la modulación de la función de GITR. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que reducir la cantidad de células Treg en un sujeto antes de la aféresis o antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en este documento reduce la cantidad de células inmunes no deseadas (por ejemplo, Treg) en el microambiente del tumor y reduce el riesgo de recaída del sujeto. En una realización, las células que expresan CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administran a un sujeto en combinación con una molécula dirigida a GITR y/o moduladora de funciones de GITR, como un agonista de GITR y/o un anticuerpo GITR que agota las células T reguladoras (Tregs). En una realización, las células que expresan CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administran a un sujeto en combinación con ciclofosfamida. En una realización, la molécula de unión a GITR y/o la molécula que modula la función de GITR (por ejemplo, el agonista de GITR y/o los anticuerpos GITR que agotan Treg) se administran antes de las células que expresan CAR. Por ejemplo, en una realización, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En algunas realizaciones, se administra ciclofosfamida al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. En realizaciones, la ciclofosfamida y un anticuerpo anti-GITR se administran al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. En tratamientos de la invención, el sujeto tiene un cáncer hematológico tal como ALL or CLL. En una realización, el sujeto padece LLC.

En una realización, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con un agonista de GITR, por ejemplo, un agonista de GITR descrito en este documento. En una realización, el agonista de GITR se administra antes que la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células.

Los agonistas de GITR ejemplares incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de GITR y anticuerpos anti-GITR (por ejemplo, anticuerpos anti-GITR bivalentes) tales como, por ejemplo, una proteína de fusión de GITR descrita en la patente de EE. UU. nº: 6.111.090, Patente Europea No.: 090505B1, Patente de EE. UU. N.º: 8.586.023, números de publicación del PCT: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-GITR descrito, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º: 7.025.962, Patente Europea No.: 1947183B1, Patente de EE. UU. N.º: 7.812.135, Patente de EE. UU. N.º: 8.388.967, Patente de EE. UU. N.º: 8.591.886, Patente Europea No.: EP 1866339, Número de publicación PCT: WO 2011/028683, Publicación PCT N.º: WO 2013/039954, Publicación PCT N.º: WO2005/007190, Publicación PCT N.º: WO 2007/133822, Publicación PCT N.º: WO2005/055808, Publicación PCT N.º: WO 99/40196, Publicación PCT N.º: WO 2001/03720, Publicación PCT N.º: WO99/20758, Publicación PCT N.º: WO2006/083289, Publicación PCT N.º: WO 2005/115451, Patente de EE. UU. N.º: 7 618 632 y Publicación PCT N.º: WO 2011/051726.

En una realización, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa, por ejemplo, un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa descrito en este documento. En una realización, el inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa es un inhibidor de SHP-1, por ejemplo, un inhibidor de SHP-1 descrito en este documento, tal como, por ejemplo, estibogluconato de sodio. En una realización, el inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa es un inhibidor de SHP-2, por ejemplo, un inhibidor de SHP-2 descrito en este documento.

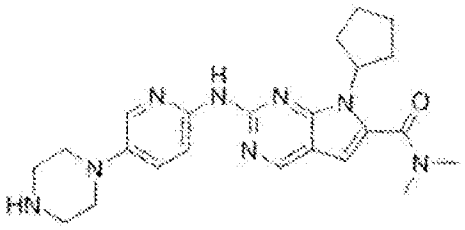
En una realización, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones opcionalmente en combinación con uno o más inhibidores de células B se puede utilizar en combinación con un inhibidor de cinasa. En una realización, el inhibidor de cinasa es un inhibidor de CDK4, por ejemplo, un inhibidor de CDK4 descrito en este documento, por ejemplo, un inhibidor de CD4/6, tal como, por ejemplo, 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona, clorhidrato (también denominado palbociclib o PD0332991). En una realización, el inhibidor de cinasa es un inhibidor de BTK, por ejemplo, un inhibidor de BTK descrito en este documento, tal como, por ejemplo, ibrutinib. En una realización, el inhibidor de cinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR descrito en este documento, tal como, por ejemplo, rapamicina, un análogo de rapamicina, OSI-027. El inhibidor de mTOR puede ser, por ejemplo, un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2, por ejemplo, un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2 descritos en este documento. En una realización, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de MNK, p. ej., un inhibidor de MNK descrito en esta memoria, tal como, p. ej., 4-amino-5-(4-fluoroanilino)-pirazolo [3,4-d] pirimidina. El inhibidor de MNK puede ser, p. ej., un inhibidor de MNK1a, MNK1b, MNK2a y/o MNK2b.

En una realización, el inhibidor de cinasa es un inhibidor de CDK4 seleccionado de aloisina A; flavopiridol o HMR-1275, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3S,4R)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-4-cromenona; crizotinib (PF-02341066; 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(2*R*,3*S*)-2-(hidroximetil)-1-metil-3-pirrolidinil]-4*H*-1-benzopiran-4-ona, hidrocloruro

(P276-00); 1-metil-5-[[2-[5-(trifluorometil)-1*H*-imidazol-2-il]-4-piridinil]oxi]-*N*-[4-(trifluorometil)fenil]-1*H*-bencimidazol-2-amina (RAF265); indisulam (E7070); roscovitina (CYC202); palbociclib (PD0332991); dinaciclib (SCH727965); N-[5-[[(5-*terc*-butiloxazol-2-il)metil]tio]tiazol-2-il]piperidin-4-carboxamida (BMS 387032); ácido 4-[[9-cloro-7-(2,6-difluorofenil)-5*H*-pirimido[5,4-*d*][2]benzazepin-2-il]amino]-benzoico (MI,N8054); 5-[3-(4,6-difluoro-1H-bencimidazol-2-il)-1H-indazol-5-il]-N-etil-4-metil-3-piridinametanamina (AG-024322); N-(piperidin-4-il)amida del ácido 4-(2,6-diclorobenzoilamino)-1H-pirazol-3-carboxílico (AT7519); 4-[2-metil-1-(1-metiletil)-1*H*-imidazol-5-il]-*N*-[4-(metilsulfonil)fenil]-2-pirimidinamina (AZD5438); y XI,281 (BMS908662).

En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de CDK4, p. ej., palbociclib (PD0332991), y el palbociclib se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg (p. ej., 75 mg, 100 mg o 125 mg) al día durante un periodo de tiempo, p. ej., diariamente durante 14- 21 días de un ciclo de 28 días, o diariamente durante 7-12 días de un ciclo de 21 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de palbociclib.

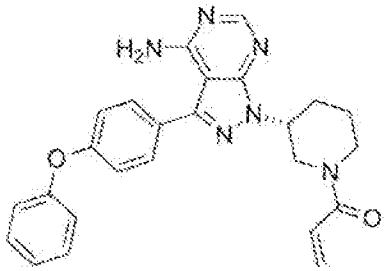
En realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (CDK) 4 o 6, por ejemplo, un inhibidor de CDK4 o un inhibidor de CDK6 descrito en este documento. En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de CDK4/6 (por ejemplo, un inhibidor que se dirige tanto a CDK4 como a CDK6), por ejemplo, un inhibidor de CDK4/6 descrito en este documento. En una realización, el sujeto tiene LCM. El LCM es un cáncer agresivo que responde poco a las terapias actualmente disponibles, es decir, es esencialmente incurable. En muchos casos de LCM, la ciclina D1 (un regulador de CDK4/6) se expresa (p. ej., debido a la translocación cromosómica que implica genes de inmunoglobulina y ciclina D1) en células de LCM. Por lo tanto, sin estar ligados a la teoría, se cree que las células de LCM son muy sensibles a la inhibición de CDK4/6 con alta especificidad (es decir, efecto mínimo sobre las células inmunitarias normales). Los inhibidores de CDK4/6 solos han tenido cierta eficacia en el tratamiento del LCM, pero solo han logrado una remisión parcial con una alta tasa de recaída. Un inhibidor de CDK4/6 ilustrativo es LEE011 (también denominado ribociclib), cuya estructura se muestra a continuación.



Sin quedar ligados a la teoría, se cree que la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria con un inhibidor de CDK4/6 (p. ej., LEE011 u otro inhibidor de CDK4/6 descrito en esta memoria) puede logar una respuesta elevada, p. ej., con tasas de remisión más elevadas y/o tasas de recaídas menores, p. ej., en comparación con un inhibidor de CDK4/6 solo.

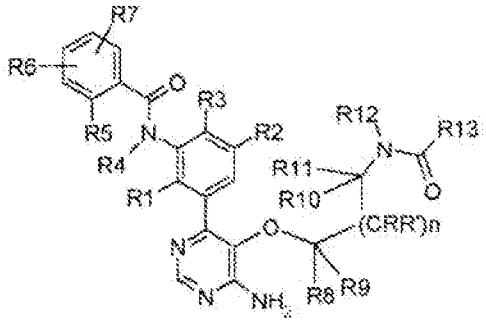
En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de BTK seleccionado entre ibrutinib (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13. En una realización, el inhibidor de BTK no reduce ni inhibe la actividad quinasa de la quinasa inducible por interleuquina-2 (ITK), y se selecciona de GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13.

En una realización, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK, p. ej., ibrutinib (PCI-32765). En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de BTK (por ejemplo, ibrutinib). En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con ibrutinib (también llamado PCI-32765). La estructura de ibrutinib (1-[(3*R*)-3-[4-Amino-3-(4-fenoxifenil)-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona) se muestra a continuación.



En algunas realizaciones, el sujeto padece LLC, linfoma de las células del manto (LCM) o linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP). Por ejemplo, el sujeto tiene una supresión en la rama corta del cromosoma 17 (del(17p),

p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene una del(17p). En algunas realizaciones, el sujeto padece LLC o LLCP recurrente, p. ej., al sujeto se le ha administrado previamente una terapia contra el cáncer (p. ej., se le han administrado previamente una, dos, tres o cuatro terapias contra el cáncer anteriores). En algunas realizaciones, el sujeto padece LLC o LLCP refractario. En otras realizaciones, el sujeto padece linfoma folicular, p. ej., linfoma folicular refractario o recurrente. En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de BTK, p. ej., ibrutinib (PCI-32765), y el ibrutinib se administra a una dosis de aproximadamente 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 420 mg, 440 mg, 460 mg, 480 mg, 500 mg, 520 mg, 540 mg, 560 mg, 580 mg, 600 mg (p. ej., 250 mg, 420 mg o 560 mg) diariamente durante un periodo de tiempo, p. ej., diariamente durante un ciclo de 21 días o diariamente durante un ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de ibrutinib. En algunas realizaciones, ibrutinib se administra en combinación con rituximab. Véase, por ejemplo, Burger et al. (2013) Ibrutinib In Combination With Rituximab (iR) Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): New, Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients, Resumen 675 presentado en la 55.ª Reunión y Exposición Anual de ASH, Nueva Orleans, LA 7-10 diciembre. Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que la adición de ibrutinib potencia la respuesta proliferativa de linfocitos T y puede hacer que los linfocitos cambien de un fenotipo T-auxiliar-2 (Th2) a T-auxiliar-1 (Th1). Th1 y Th2 son fenotipos de los célula T auxiliares, donde Th1 frente a Th2 dirigen diferentes rutas de respuesta inmunitaria. Un fenotipo Th1 se asocia con respuestas proinflamatorias, p. ej., para provocar la destrucción de células, tales como virus/patógenos intracelulares o células cancerosas, o para perpetuar respuestas autoinmunitarias. Un fenotipo Th2 está asociado con la acumulación de eosinófilos y respuestas antiinflamatorias. En algunas realizaciones de los métodos, usos y composiciones de este documento, el inhibidor de BTK es un inhibidor de BTK descrito en la solicitud internacional WO/2015/079417. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el inhibidor de BTK es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;



(I)

en la que,

R1 es hidrógeno, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxi;

R2 es hidrógeno o halógeno;

R3 es hidrógeno o halógeno;

R4 es hidrógeno;

R5 es hidrógeno o halógeno;

o R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, -CH2-, -CH2-CH2- , - CH=CH-, -CH=CH-CH2-; -CH2-CH=CH-; o -CH2-CH2-CH2-;

R6 y R7 representan independientemente uno del otro H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido por hidroxilo, cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido por halógeno o hidroxi, o halógeno; R8, R9, R, R', R10 y R11 representan independientemente uno del otro H, o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido por alcoxi C1-C6; o dos cualesquiera de R8, R9, R, R', R10 y R11 junto con el átomo de carbono al que están unidos pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 a 6 miembros;

R12 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o alcoxi C1-C6;

o R12 y cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11 junto con los átomos a los que están unidos pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 ó 7 miembros, anillo que puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6;

n es 0 o 1; y

R13 es alquenilo C2-C6 opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6, alcoxi C1-C6 o N,N-di-alquil C1-C6 amino; alquinilo C2-C6 opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; o óxido de alquilenilo C2-C6 opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.

En algunas realizaciones, el inhibidor de BTK de Fórmula I se elige de: N-(3-(5-((1-acriloilazetidin-3-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (E)-N-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-enoil)azetidin-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-amino-5-((1-propioloilazetidin-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-((1-(but-2-inoil)azetidin-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-((1-Acriloilpiperidin-4-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilacrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (E)-N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilpropiolamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (E)-N-(3-(6-Amino-5-(2-(4-metoxi-N-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilbut-2-inamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(2-((4-Amino-6-(3-(4-ciclopropil-2-fluorobenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-N-metiloxirano-2-carboxamida; N-(2-((4-Amino-6-(3-(6-ciclopropil-8-fluoro-1-oxoisoquinolin-2(1H)-il)fenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-N-metilacrilamida; N-(3-(5-(2-Acrilamidoetoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-etilacrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-(2-fluoroetil)acrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-((1-acrilamidociclopropil)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(5-(2-acrilamidopropoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-(2-(but-2-inamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-(2-(N-metilacrilamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(3-(N-metilacrilamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(5-((1-Acriloilpirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-((1-(but-2-inoil)pirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-2-(3-(5-((1-acriloilpirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona; N-(2-((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-N-metilacrilamida; N-(3-(5-(((2S,4R)-1-acriloil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(((2S,4R)-1-(but-2-inoil)-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; 2-(3-(5-(((2S,4R)-1-acriloil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona; N-(3-(5-(((2S,4S)-1-acriloil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-amino-5-(((2S,4S)-1-(but-2-inoil)-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-(((2S,4R)-1-acriloil-4-fluoropirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(6-Amino-5-(((2S,4R)-1-(but-2-inoil)-4-fluoropirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(5-((1-Acriloilazetidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-N-(3-(6-Amino-5-((1-propioloilazetidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (S)-2-(3-(5-((1-acriloilazetidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona; (R)-N-(3-(5-((1-acriloilazetidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; (R)-N-(3-(5-((1-acriloilpiperidin-3-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-(((2R,3S)-1-acriloil-3-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; N-(3-(5-(((2S,4R)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida; o N-(3-(5-(((2S,4S)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida.

A menos que se diga lo contrario, los términos químicos utilizados anteriormente para describir el inhibidor de BTK de Fórmula I se utilizan según su significado tal como se expone en la Solicitud Internacional WO/2015/079417.

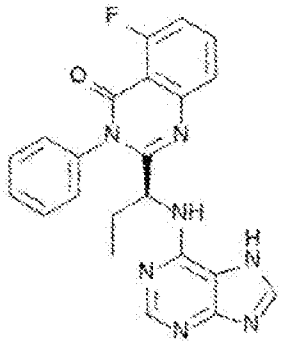
En una realización, el inhibidor de cinasa es un inhibidor de mTOR seleccionado entre temsirolimus; ridaforolimus (dimetilfosfinato de (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2 [(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*, 23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23, 29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.$0^{4,9}$] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669; everolimus (RAD001); rapamicina (AY22989); simapimod; (5-{2,4-bis[(3*S*)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[*trans*-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-ona (PF04691502); y N^2-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4*H*-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartilL-serina-, sal interna (SF1126) (SEQ ID NO: 1316); y XI,765.

En una realización, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, p. ej., rapamicina, y la rapamicina se administra a una dosis de aproximadamente 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg (p. ej., 6 mg) diariamente durante un período de tiempo, p. ej., diariamente durante un ciclo de 21 días o diariamente durante un

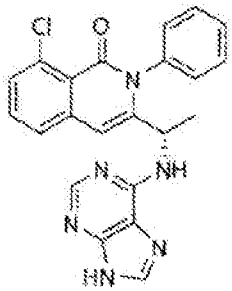
ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de rapamicina. En una realización, el inhibidor de cinasa es un inhibidor de mTOR, por ejemplo, everolimus y el everolimus se administra en una dosis de aproximadamente 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg (por ejemplo, 10 mg) diariamente durante un período de tiempo, por ejemplo, diariamente durante un ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de everolimus.

En una realización, el inhibidor de cinasa es un inhibidor de MNK seleccionado entre CGP052088; 4-amino-3-(p-fluorofenilamino)-pirazolo[3,4-d]pirimidina (CGP57380); cercosporamida; ETC-1780445-2; y 4-amino-5-(4-fluoroanilino)-pirazolo[3,4-d]pirimidina.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K) (por ejemplo, un inhibidor de PI3K descrito en este documento, por ejemplo, idelalisib o duvelisib) y/o rituximab. En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con idelalisib y rituximab. En realizaciones, una célula que expresa CAR se administra a un sujeto en combinación con duvelisib y rituximab. Idelalisib (también denominado GS-1101 o CAL-101; Gilead) es una molécula pequeña que bloquea la isoforma delta de PI3K. La estructura de idelalisib (5-fluoro-3-fenil-2-[(1*S*)-1-(7*H*-purin-6-ilamino)propil]-4(3*H*)-quinazolinona) se muestra a continuación.



Duvelisib (también llamado IPI-145; Infinity Pharmaceuticals y Abbvie) es una molécula pequeña que bloquea PI3K-δ,γ. La estructura de duvelisib (8-cloro-2-fenil-3-[(1S)-1-(9H-purin-6-ilamino)etil]-1(2H)-isoquinolinona) se muestra a continuación.



En algunas realizaciones, el sujeto tiene LLC. En algunas realizaciones, el sujeto tiene LLC recidivante, p. ej., al sujeto se le ha administrado previamente una terapia contra el cáncer (p. ej., se le ha administrado previamente un anticuerpo anti-CD20 o se le ha administrado previamente ibrutinib). Por ejemplo, el sujeto tiene una supresión en la rama corta del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene una del(17p). En algunas realizaciones, el sujeto comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV*$_H$). En otras realizaciones, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV*$_H$). En algunas realizaciones, el sujeto tiene una supresión en la rama largo del cromosoma 11 (del(11q). En otras realizaciones, el sujeto no tiene una del(11q). En algunas realizaciones, se administra idelalisib en una dosificación de aproximadamente 100-400 mg (p. ej., 100-125, 125-150, 150-175, 175-200, 200-225, 225-250, 250-275, 275-300, 325-350, 350-375 o 375-400 mg), p. ej., BID. En algunas realizaciones, se administra duvelisib a una dosis de aproximadamente 15-100 mg (p. ej., aproximadamente 15-25, 25-50, 50-75 o 75-100 mg), p. ej., dos veces al día. En algunas realizaciones, se administra rituximab a una dosis de aproximadamente 350-550 mg/m^2 (p. ej., 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg/m^2), p. ej., por vía intravenosa.

En una realización, el inhibidor de cinasa es un inhibidor dual de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y mTOR seleccionado entre 2-Amino-8-[*trans*-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-ona (PF-04691502); *N*-[4-[[4-(Dimetilamino)-1-piperidinil]carbonil]fenil]-*N*'-[4-(4,6-di-4-morfolinil-1,3,5-triazin-2-il)fenil]urea (PF-05212384, PKI-587); Ácido maleico (NVP-BGT226); 2-metil-2-{4-[3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]fenil}propanonitrilo (BEZ-235); apitolisib (GDC-0980, RG7422); 2,4-difluoro-N-{2-(metiloxi)-5-[4-(4-piridazinil)-6-quinolinil]-3-piridinil}bencenosulfonamida (GSK2126458); 8-(6-metoxipiridin-3-il)-3-metil-1-(4-(piperazin-1-il)-3-(trifluorometil)fenil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2(3H)-ona 3-[4-(4-Morfolinilpirido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pirimidin-2-il]fenol (PI-103); 5-(9-isopropil-8-metil-2-morfolino-9H-purin-6-il)pirimidin-2-amina (VS-5584, SB2343); y N-[2-[(3,5-Dimetoxifenil)amino]quinoxalin-3-il]-4-[(4-metil-3-metoxifenil)carbonil]aminofenilsulfonamida (XI,765).

En algunas realizaciones, se administra una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones a un sujeto en combinación con un inhibidor de la cinasa del linfoma anaplásico (ALK). Las cinasas ALK ejemplares incluyen, entre otras, crizotinib (Pfizer), ceritinib (Novartis), alectinib (Chugai), brigatinib (también llamado *AP26113;* Ariad), entrectinib (Ignyta), PF-06463922 (Pfizer), TSR-011 (Tesaro) (véase, por ejemplo, el Identificador de ensayo clínico n.º NCT02048488), CEP-37440 (Teva) y X-396 (Xcovery).

El nombre químico del crizotinib es 3-[(1*R*)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]-5-(1-piperidin-4-ilpirazol-4-il)piridin-2-amina. El nombre químico de ceritinib es 5-cloro-N^2-[2-isopropoxi-5-metil-4-(4-piperidinil)fenil]-N^4-[2-(isopropilsulfonil)fenil]-2,4-pirimidindiamina. El nombre químico de alectinib es 9-etil-6,6-dimetil-8-(4-morfolinopiperidin-1-il)-11-oxo-6,11-dihidro-5H-benzo[b]carbazol-3-carbonitrilo. El nombre químico de brigatinib es 5-cloro-N^2-{4-[4-(dimetilamino)-1-piperidinil]-2-metoxifenil}-N^4-[2-(dimetilfosforil)fenil]-2,4-pirimidinodiamina. El nombre químico de entrectinib es N-(5-(3,5-difluorobencil)-1H-indazol-3-il)-4-(4-metilpiperazin-1-il)-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)benzamida. El nombre químico de PF-06463922 es (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimetil-15-oxo-10,15,16,17-tetrahidro-2H-8,4-(meteno)pirazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazaciclotetradecino-3-carbonitrilo. La estructura química de CEP-37440 es (S)-2-((5-cloro-2-((6-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]annulen-2-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-N-metilbenzamida. El nombre químico de X-396 es (R)-6-amino-5-(1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi)-N-(4-(4-metilpiperazina-1-carbonil)fenil)piridazina-3-carboxamida.

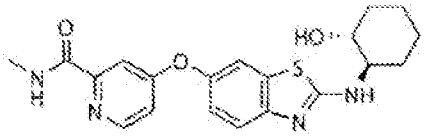
En una realización, el inhibidor de cinasa es un inhibidor de ITK seleccionado de ibrutinib; N-(5-(5-(4-acetilpiperazina-1-carbonil)-4-metoxi-2-metilfeniltio)tiazol-2-il)-4-((3,3-dimetilbutan-2-ilamino)metil)benzamida (BMS-509744); 7-bencil-1-(3-(piperidin-1-il)propil)-2-(4-(piridin-4-il)fenil)-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-6(5H)-ona (CTA056); *R*)-3-(1-(1-acriloilpiperidin-3-il)-4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-*N*-(3-metil-4-(1-metiletil))benzamida (PF-06465469).

Medicamentos que inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En un aspecto adicional, las composiciones de células de la presente invención se pueden administrar a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) de un trasplante de médula ósea, terapia de ablación de células T utilizando agentes de quimioterapia tales como fludarabina, radiación de haz externo (XRT), ciclofosfamida y/o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En un aspecto, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de una terapia ablativa de células B, como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de un trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

En algunas realizaciones, se administra una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones a un sujeto en combinación con un inhibidor de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). IDO es una enzima que cataliza la degradación del aminoácido L-triptófano a quinurenina. Muchos cánceres sobreexpresan IDO, por ejemplo, el cáncer de próstata, colorrectal, de páncreas, de cuello uterino, gástrico, de ovario, de cabeza y de pulmón. Las pDC, los macrófagos y las células dendríticas (DC) pueden expresar IDO. Sin limitarse a la teoría, se cree que una disminución del L-triptófano (por ejemplo, catalizada por IDO) produce un entorno inmunosupresor al inducir anergia y apoptosis de las células T. Por lo tanto, sin limitarse a la teoría, se cree que un inhibidor de IDO puede mejorar la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en este documento, por ejemplo, disminuyendo la supresión o muerte de una célula inmune que expresa CAR. Los inhibidores ejemplares de IDO incluyen, entre otros, 1-metil-triptófano, indoximod (NewLink Genetics) (véase, por ejemplo, los Identificadores de ensayos clínicos n.° NCT01191216; NCT01792050) e INCB024360 (Incyte Corp.) (véase, por ejemplo, los identificadores de ensayos clínicos n.° NCT01604889; NCT01685255).

En algunas realizaciones, se administra una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones a un sujeto en combinación con un modulador de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). Las MDSC se acumulan en la periferia y en el sitio del tumor de muchos tumores sólidos. Estas células suprimen las respuestas de las células T, lo que dificulta la eficacia de la terapia con células que expresan CAR. Sin limitarse a la teoría, se

cree que la administración de un modulador MDSC mejora la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en este documento. Los moduladores ejemplares de MDSC incluyen, entre otros, MCS110 y BLZ945. MCS110 es un anticuerpo monoclonal (mAb) contra el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Véase, p. ej., el identificador de ensayo clínico n.º NCT00757757. BLZ945 es un inhibidor de moléculas pequeñas del receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R). Véase, p. ej., Pyonteck et al. Nat. Med. 19(2013):1264-72. La estructura de BLZ945 se muestra a continuación.



En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con una célula CART CD19 (por ejemplo, CTL019, por ejemplo, como se describe en el documento WO2012/079000). En algunas realizaciones, el sujeto padece leucemia mieloide aguda (AML), por ejemplo, AML positiva para CD19 o AML negativa para CD19. En realizaciones, el sujeto padece un linfoma CD19+, p. ej., un linfoma no hodgkiniano (LNH) CD19+, un LF CD19+ o un LDLBG CD19+. En realizaciones, el sujeto padece un linfoma CD19+ recurrente o refractario. En realizaciones, se administra quimioterapia linforreductora al sujeto antes, a la vez o después de la administración (p. ej., infusión) de células CAR T CD19. En un ejemplo, la quimioterapia de depleción linfoide se administra al sujeto antes de la administración de células CART CD19. Por ejemplo, la quimioterapia linfodeplecionante finaliza entre 1 y 4 días (p. ej., 1, 2, 3 o 4 días) antes de la infusión de células CART CD19. En algunas realizaciones, se administran múltiples dosis de células CAR T CD19, p. ej., como se describe en esta memoria. Por ejemplo, una sola dosis comprende aproximadamente 5×10^8 célula CAR T CD19. En algunas realizaciones, se administra quimioterapia linforreductora al sujeto antes, a la vez o después de la administración (p. ej., infusión) de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que no expresa CAR de CD19. En algunas realizaciones, se administra un CART CD19 al sujeto antes, simultáneamente o después de la administración (por ejemplo, infusión) de una célula que no expresa CAR CD19.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con una célula que expresa CAR CD19, por ejemplo, CTL019, por ejemplo, como se describe en el documento WO2012/079000 para el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de CLL-1, por ejemplo, un cáncer descrito en este documento. Sin limitarse a la teoría, se cree que la administración de una célula que expresa CAR CD19 en combinación con una célula que expresa CAR mejora la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en este documento al dirigirse a las células cancerosas de linaje temprano, por ejemplo, células madre cancerosas, modulando la respuesta inmunitaria, agotando las células B reguladoras y/o mejorando el microambiente tumoral. Por ejemplo, una célula que expresa CAR CD19 tiene como diana células cancerosas que expresan marcadores del linaje temprano, p. ej., células madre cancerosas y células que expresan CD19, mientras que la célula que expresa CAR descrita en el presente documento tiene como diana células cancerosas que expresan marcadores del linaje tardío, p. ej., CLL-1. Esta estrategia de preacondicionamiento puede mejorar la eficacia de la célula que expresa CAR descrita en el presente documento. En dichas realizaciones, la célula que expresa CAR CD19 se administra antes, simultáneamente con o después de la administración (por ejemplo, infusión) de una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones.

En realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones también expresa un CAR dirigido a CD19, por ejemplo, un CAR CD19. En una realización, la célula que expresa un CAR y un CAR CD19 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer hematológico descrito en este documento, por ejemplo, LMA. En una realización, las configuraciones de una o ambas moléculas CAR comprenden un dominio de señalización intracelular primario y un dominio de señalización coestimulante. En otra realización, las configuraciones de una o ambas moléculas CAR comprenden un dominio de señalización intracelular primario y dos o más, p. ej., 2, 3, 4 o 5 o más, dominios de señalización coestimulantes. En dichas realizaciones, la molécula CAR y el CAR CD19 pueden tener el mismo o un dominio de señalización intracelular primario diferente, los mismos o diferentes dominios de señalización coestimuladora, o el mismo número o un número diferente de dominios de señalización coestimuladora. Alternativamente, el CAR y el CAR CD 19 se configuran como un CAR dividido, en el que una de las moléculas de CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un dominio coestimulador (por ejemplo, 4-1BB), mientras que la otra molécula de CAR comprende un dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular primario (por ejemplo, CD3 zeta).

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administra a un sujeto en combinación con un polipéptido de interleucina-15 (IL-15), un polipéptido del receptor alfa de interleucina-15 (IL-15Ra) o una combinación de un polipéptido IL-15 y un polipéptido IL-15Ra, por ejemplo, hetIL-15 (Admune Therapeutics, LLC). hetIL-15 es un complejo heterodimérico no covalente de IL-15 e IL-15Ra. hetIL-15 se describe en, por ejemplo, los documentos US 8.124.084, US 2012/0177598, US 2009/0082299, US 2012/0141413 y US 2011/0081311. En algunas realizaciones, se administra het-IL-15 por vía subcutánea.

En realizaciones, a un sujeto que tiene un trastorno hematológico, por ejemplo, LMA o SMD, se le administra una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones en combinación con un agente, por ejemplo, un agente citotóxico o de quimioterapia, una terapia biológica (por ejemplo, un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o una terapia celular) o un inhibidor (por ejemplo, un inhibidor de cinasa). En algunas realizaciones, se administra al sujeto la célula que expresa CAR en combinación con un agente citotóxico, por ejemplo, CPX-351 (Celator Pharmaceuticals), citarabina, daunorrubicina, vosaroxina (Sunesis Pharmaceuticals), sapacitabina (Cyclacel Pharmaceuticals), idarrubicina o mitoxantrona. CPX-351 es una formulación liposomal que comprende citarabina y daunorrubicina en una proporción molar de 5:1. En algunas realizaciones, se administra al sujeto la célula que expresa CAR en combinación con un agente hipometilante, por ejemplo, un inhibidor de la ADN metiltransferasa, por ejemplo, azacitidina o decitabina. En algunas realizaciones, se le administra al sujeto la célula que expresa CAR en combinación con una terapia biológica, por ejemplo, un anticuerpo o una terapia celular, por ejemplo, 225Ac-lintuzumab (Actimab-A; Actinium Pharmaceuticals), IPH2102 (Innate Pharma/Bristol Myers Squibb), SGN-CD33A (Seattle Genetics) o gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg; Pfizer). SGN-CD33A es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende un dímero de pirrolobenzodiazepina que está unido a un anticuerpo anti-CD33. Actimab-A es un anticuerpo anti-CD33 (lintuzumab) marcado con actinio. IPH2102 es un anticuerpo monoclonal que se dirige a los receptores similares a las inmunoglobulinas asesinas (KIR). En realizaciones, al sujeto se le administra la célula que expresa CAR en combinación con un inhibidor de FLT3, por ejemplo, sorafenib (Bayer), midostaurina (Novartis), quizartinib (Daiichi Sankyo), crenolanib (Arog Pharmaceuticals), PLX3397 (Daiichi Sankyo), AKN-028 (Akinion productos farmacéuticos), o ASP2215 (Estrellas). En algunas realizaciones, se le administra al sujeto la célula que expresa CAR en combinación con un inhibidor de la isocitrato deshidrogenasa (IDH), por ejemplo, AG-221 (Celgene/Agios) o AG-120 (Agios/Celgene). En algunas realizaciones, se administra al sujeto la célula que expresa CAR en combinación con un regulador del ciclo celular, por ejemplo, un inhibidor de la cinasa tipo polo 1 (Plk1), por ejemplo, volasertib (Boehringer Ingelheim); o un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 9 (Cdk9), por ejemplo, alvocidib (Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis). En algunas realizaciones, se administra al sujeto la célula que expresa CAR en combinación con un inhibidor de la red de señalización del receptor de células B, por ejemplo, un inhibidor del linfoma de células B 2 (Bcl-2), por ejemplo, venetoclax (Abbvie/Roche); o un inhibidor de la tirosina cinasa de Bruton (Btk), por ejemplo, ibrutinib (Pharmacyclics/Johnson & Johnson Janssen Pharmaceutical). En algunas realizaciones, se administra al sujeto la célula que expresa CAR en combinación con un inhibidor de la aminopeptidasa M1, por ejemplo, tosedostat (CTI BioPharma/Vernalis); un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), por ejemplo, pracinostat (MEI Pharma); un inhibidor de múltiples cinasas, por ejemplo, rigosertib (Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio); o un agonista inverso peptídico de CXCR4, por ejemplo, BL-8040 (BioLineRx).

En otra realización, los sujetos reciben una infusión de las composiciones de células que expresan CAR de la presente invención antes del trasplante, por ejemplo, trasplante alogénico de células madre, de células. En una realización preferida, las células que expresan CAR expresan transitoriamente el CAR, por ejemplo, mediante electroporación de un CAR de ARNm, con lo que la expresión del antígeno al que se dirige el CAR se termina antes de la infusión de células madre del donante para evitar el fracaso del injerto. En una realización, al sujeto se le puede administrar un agente que reduce o mejora un efecto secundario asociado con la administración de la célula que expresa CAR. Los efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa CAR incluyen, entre otros, CRS y linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), también denominada síndrome de activación de macrófagos (MAS). Los síntomas de SLC incluyen fiebre alta, náuseas, hipotensión transitoria, hipoxia y similares. En consecuencia, los métodos descritos en este documento pueden comprender la administración de una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones a un sujeto y la administración adicional de un agente para controlar niveles elevados de un factor soluble resultante del tratamiento con la célula que expresa CAR. En una realización, el factor soluble elevado en el sujeto es uno o más de IFN-γ, TNFα, IL-2 e IL-6. Por lo tanto, un agente administrado para tratar este efecto secundario puede ser un agente que neutralice uno o más de estos factores solubles. Los ejemplos de agentes de este tipo incluyen, pero sin limitación, un esteroide (p. ej., corticosteroide), un inhibidor de TNFα y un inhibidor de IL-6. Un ejemplo de un inhibidor de TNFα es una molécula de anticuerpo anti-TNFα, tal como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y golimumab. Otro ejemplo de un inhibidor de TNFα es una proteína de fusión tal como entanercept. Los inhibidores de molécula pequeña del TNFα incluyen, entre otros, derivados de xantina (por ejemplo, pentoxifilina) y bupropión. Un ejemplo de un inhibidor de IL-6 es una molécula de anticuerpo anti-IL-6 tal como tocilizumab (toc), sarilumab, elsilimomab, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301 y FM101. En una realización, la molécula de anticuerpo anti-IL-6 es tocilizumab. Un ejemplo de un inhibidor basado en IL-1R es anakinra.

En algunas realizaciones, la linfodepleción se realiza en un sujeto, por ejemplo, antes de administrar una o más células que expresan un CAR de acuerdo con las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la linfodepleción comprende la administración de uno o más de melfalán, citoxano, ciclofosfamida y fludarabina.

En algunas realizaciones, se administra una quimioterapia de depleción linfoide al sujeto antes, simultáneamente o después de la administración (por ejemplo, infusión) de células CAR. En un ejemplo, la quimioterapia de linfoagotamiento se administra al sujeto antes de la administración de células CAR. Por ejemplo, la quimioterapia de linfoagotamiento finaliza de 1 a 4 días (p. ej., 1, 2, 3 o 4 días) antes de la infusión de células CAR. En algunas realizaciones, se administran múltiples dosis de células CAR, por ejemplo, como se describe en este documento. Por ejemplo, una dosis única comprende aproximadamente 5×10^8 células CAR. En algunas realizaciones, se

administra una quimioterapia de depleción linfoide al sujeto antes, simultáneamente o después de la administración (por ejemplo, infusión) de una célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, las células que expresan CAR de acuerdo con las reivindicaciones se administran a un sujeto en combinación con una célula que expresa CAR CD19, por ejemplo, CTL019, por ejemplo, como se describe en el docoumento WO2012/079000, para el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión. del antígeno de cáncer que es un cáncer hematológico descrito en este documento. Sin limitarse a la teoría, se cree que la administración de una célula que expresa CAR CD 19 en combinación con otra célula que expresa CAR mejora la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en este documento al dirigirse a las células cancerosas de linaje temprano, por ejemplo, células madre cancerosas, modulando la respuesta inmunitaria, agotando las células B reguladoras y/o mejorando el microambiente tumoral. Por ejemplo, una célula que expresa CAR CD19 tiene como diana células cancerosas que expresan marcadores del linaje temprano, p. ej., células madre cancerosas y células que expresan CD19, mientras que algunas otras células que expresan CAR descritas en el presente documento tienen como diana células cancerosas que expresan marcadores del linaje tardío. Esta estrategia de preacondicionamiento puede mejorar la eficacia de la célula que expresa CAR descrita en el presente documento. En tales realizaciones, la célula que expresa CAR CD19 se administra antes, simultáneamente con o después de la administración (por ejemplo, infusión) de la segunda célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, una célula que expresa CAR que expresa un CAR dirigido a un antígeno canceroso distinto de CD19 también expresa un CAR dirigido a CD19, p. ej., un CAR CD19. En una realización, la célula que expresa un CAR no CD19 y un CAR CD19 se administra a un sujeto para el tratamiento de un cáncer hematológico descrito en este documento, por ejemplo, LMA. En una realización, las configuraciones de una o ambas moléculas CAR comprenden un dominio de señalización intracelular primario y un dominio de señalización coestimulante. En otra realización, las configuraciones de una o ambas moléculas CAR comprenden un dominio de señalización intracelular primario y dos o más, p. ej., 2, 3, 4 o 5 o más, dominios de señalización coestimulantes. En tales realizaciones, la molécula CAR no CD19 y la CAR CD19 pueden tener el mismo o diferente dominio de señalización intracelular primario, los mismos o diferentes dominios de señalización coestimulantes, o el mismo número o un número diferente de dominios de señalización coestimulantes. Como alternativa, el CAR no CD19 y el CAR CD19 se configuran como un CAR dividido, en el que una de las moléculas CAR comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio coestimulante (p. ej., 4-1BB), mientras que la otra molécula CAR comprende un dominio de unión al antígeno y un dominio de señalización intracelular primaria (p. ej., CD3 zeta).

Inhibidores de moléculas inhibidoras/inhibidores de puntos de control

En una realización, al sujeto se le puede administrar un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora, p. ej., el agente es un inhibidor de puntos de control. Las moléculas inhibidoras o de puntos de control, p. ej., muerte programada 1 (PD1), pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de organizar una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFR beta). En realizaciones, la célula que expresa CAR de acuerdo con las reivindicaciones comprende un receptor coestimulador de conmutación, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2013/019615.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir la administración de una célula que expresa CAR en combinación con un inhibidor de puntos de control. En una realización, el sujeto responde completamente. En otra realización, el sujeto es un respondedor parcial o no respondedor y, por ejemplo, en algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control se administra antes de la célula que expresa CAR, por ejemplo, dos semanas, 12 días, 10 días, 8 días, una semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día antes de la administración de la célula que expresa CAR. En algunas realizaciones, el inhibidor del punto de control se administra simultáneamente con la célula que expresa CAR.

La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, mediante inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar el rendimiento de una célula que expresa CAR. En algunas realizaciones, un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ARNbc, p. ej., ARNip o ARNhc, o grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR), una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) o una endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), puede utilizarse para inhibir la expresión de una molécula inhibidora en la célula que expresa CAR. En una realización, el inhibidor es un ARNhc. En una realización, la molécula inhibidora está inhibida dentro de una célula que expresa CAR. En estas realizaciones, una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula inhibidora está ligada al ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes, del CAR.

En una realización, una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T está unida operativamente a un

promotor, p. ej., un promotor derivado de H1 o U6, de manera que la molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T se expresa, p. ej., se expresa dentro de una célula que expresa CAR. Véanse, p. ej., Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA" Capítulo 3, en *Gene Transfer*: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann y Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU., 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) Science 296: 550-553; Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T está presente en el mismo vector, p. ej., un vector lentivírico, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes, del CAR. En tal realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T se ubica en el vector, por ejemplo, el vector lentiviral, en 5' o 3' con respecto al ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. La molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T, puede transcribirse en la misma dirección o en una dirección diferente que el ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T está presente en un vector distinto del vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, del CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T, se expresa transitoriamente dentro de una célula que expresa CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, por ejemplo, inhibe, la función de las células T se integra de forma estable en el genoma de una célula que expresa CAR. En una realización, la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T es PD-1.

En una realización, el inhibidor de una señal inhibidora puede ser, p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a una molécula inhibidora. Por ejemplo, el agente puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a PD1, PD-L1, PD-L2 o CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab (también conocido como MDX-010 y MDX-101, y comercializado como Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; Tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible de Pfizer, anteriormente conocido como ticilimumab, CP-675,206)). En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a TIM3. En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a LAG3. En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5). En algunas realizaciones, el agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR, por ejemplo, un inhibidor de una molécula inhibidora, se administra en combinación con un CAR alogénico, por ejemplo, un CAR alogénico de acuerdo con las reivindicaciones (por ejemplo, descrito en la sección CAR alogénico en este documento).

PD1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD1 se expresa en células B activadas, células T y células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Se ha demostrado que dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 regulan a la baja la activación de células T al unirse a PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). La inmunosupresión se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD1 con PD-L1.

En la técnica se puede disponer de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otros inhibidores de PD1, PD-L1 y PD-L2, y estos se pueden utilizar combinados con un CAR CD19 descrito en el presente documento. Por ejemplo, nivolumab (al que también se hace referencia como BMS-936558 o MDX1106; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG4 completamente humano que bloquea específicamente PD1. Nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD1 se divulgan en los documentos US 8 008 449 y WO2006/121168. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal IgG1k humanizado que se une a PD1. En el documento WO2009/101611 se divulgan Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD1 humanizados. Pembrolizumab (conocido anteriormente como lambrolizumab y al que también se hace referencia como Keytruda, MK03475; Merck) es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG4 humanizado que se une a PD1. Pembrolizumab y otros anticuerpos anti-PD1 humanizados se divulgan en los documentos US 8 354 509 y WO2009/114335. MEDI4736 (Medimmune) es un anticuerpo monoclonal humano que se une a PDL1 e inhibe la interacción del ligando con PD1. MDPL3280A (Genentech / Roche) es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 con Fc humano humano que se une a PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 se describen en la patente de EE. UU. N.º: 7.943.743 y publicación de EE. UU. N.º: 20120039906. Otros agentes de unión anti-PD-L1 incluyen YW243.55.S70 (las regiones variables de cadena pesada y ligera se muestran en las SEQ ID NOs 20 y 21 en el documento WO2010/077634) y MDX-1 105 (también conocido como BMS-936559 y, por ejemplo, los agentes de unión anti-PD-L1 descritos en el documento WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; p. ej., divulgado en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342), es un receptor soluble de fusión PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD1 y B7-H1. Otros anticuerpos anti-PD1 incluyen AMP 514 (Amplimmune), entre otros, p. ej., anticuerpos anti-PD1 divulgados en los documentos US 8 609 089, US 2010028330 y/o US 20120114649.

En algunos casos de la divulgación, un inhibidor de PD1 descrito en este documento (por ejemplo, un anticuerpo PD1, por ejemplo, un anticuerpo PD1 descrito en este documento) se usa en combinación con un CAR CD19 descrito en este documento para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD19. En algunos casos, un inhibidor de PD-L1 descrito en este documento (por ejemplo, un anticuerpo PD-L1, por ejemplo, un anticuerpo PD-L1 descrito en este documento) se utiliza en combinación con un CAR CD19 descrito en este documento para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD19. La enfermedad puede ser, p. ej., un linfoma tal como LDLBG que incluye LDLBG primario o LDLBG secundario. En algunos casos, el sujeto tiene, o se identifica que tiene, al menos un 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de células cancerosas, por ejemplo, células DLBCL, que son CD3+/PD1+. En algunos casos, el sujeto tiene, o se identifica que tiene, poblaciones sustancialmente no superpuestas de células CD19+ y células PD-L1+ en un cáncer, por ejemplo, el microambiente del cáncer. Por ejemplo, en algunos casos, menos del 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de las células en el cáncer, es decir, el microambiente del cáncer, son doblemente positivas para CD19 y PD-L1.

En algunos casos, el sujeto es tratado con una combinación de un CAR CD19, un inhibidor de PD1 y un inhibidor de PD-L1. En algunos casos, el sujeto es tratado con una combinación de un CAR CD19, un inhibidor de PD1 y un inhibidor de CD3. En algunos casos, el sujeto es tratado con una combinación de un CAR CD19, un inhibidor de PD1, un inhibidor de PD-L1 y un inhibidor de CD3.

En algunos casos, los métodos del presente documento incluyen una etapa de ensayar células en una muestra biológica, p. ej., una muestra que comprende células LDLBG, para CD3 y/o PD-1 (p. ej., expresión de CD3 y/o PD-1). En algunos casos, los métodos incluyen una etapa de ensayar células en una muestra biológica, p. ej., una muestra que comprende células LDLBG, para CD19 y/o PD-L1 (p. ej., expresión de CD19 y/o PD-L1). En algunos casos, los métodos incluyen, p. ej., proporcionar una muestra que comprende células cancerosas y realizar una etapa de detección, p. ej., mediante inmunohistoquímica, para uno o más de CD3, PD-1, CD19 o PD-L1. Los métodos pueden comprender un paso adicional de recomendar o administrar un tratamiento, p. ej., un tratamiento que comprende un CAR CD19.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de este es una molécula de anticuerpo anti-PD-1 tal como se describe en el documento US2015/0210769, titulado «Antibody Molecules to PD-1 and Uses Thereof». En una realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR (o colectivamente todas las CDR) de una región variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido entre cualquiera de BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clon-A, BAP049-Clon-B, BAP049-Clon-C, BAP049-Clon-D o BAP049-Clon-E; o como se describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0210769, o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente; o CDR estrechamente relacionadas, p. ej., CDR que son idénticas o que tienen al menos una alteración aminoacídica, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (p. ej., sustituciones, deleciones o inserciones, p. ej., sustituciones conservadoras).

En otra realización más, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en este documento, por ejemplo, un anticuerpo elegido entre cualquiera de BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum 10, BAP049-hum11, BAP049-hum 12, BAP049-hum 13, BAP049-hum 14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clone-A, BAP049-Clone-B, BAP049-Clone-C, BAP049-Clone-D, o BAP049-Clone-E; o como se describe en la Tabla 1 de US 2015/0210769, o codificado por la secuencia de nucleótidos en la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

TIM3 (inmunoglobulina-3 de linfocitos T) también regula de manera negativa la función de los linfocitos T, especialmente en linfocitos T1 citotóxicos CD8+ y linfocitos auxiliares T1 CD4+ que segregan IFN-g, y desempeña una función crucial en el agotamiento de los linfocitos T. La inhibición de la interacción entre TIM3 y sus ligandos, p. ej., galectina-9 (Gal9), fosfatidilserina (PS) y HMGB1, puede aumentar la respuesta inmunitaria. En la técnica se puede disponer de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de TIM3 y sus ligandos y estos se pueden utilizar combinados con un CAR CD19 descrito en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas de bajo peso molecular o inhibidores peptídicos que tienen como diana TIM3 se unen al dominio IgV de TIM3 para inhibir la interacción con sus ligandos. Los anticuerpos y péptidos que inhiben TIM3 se divulgan en los documentos WO2013/006490 y US20100247521. Otros anticuerpos anti-TIM3 incluyen versiones humanizadas de RMT3-23 (descritas en Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551) y el clon 8B.2C12 (descritas en Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541). En el documento US20130156774 se describen anticuerpos biespecíficos que inhiben TIM3 y PD-1.

En una realización, el anticuerpo anti-TIM3 o fragmento de este es una molécula de anticuerpo anti-TIM3 tal como se describe en el documento US2015/0218274, titulado «Antibody Molecules to TIM3 and Uses Thereof». En una realización, la molécula de anticuerpo anti-TIM3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR (o colectivamente todas las CDR) de una región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido entre cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum 11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 del documento US 2015/0218274; o codificado por la secuencia de nucleótidos en las Tablas 1-4; o una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o más idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente, o CDR estrechamente relacionadas, por ejemplo, CDR que son idénticas o que tienen al menos una alteración de aminoácido, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones o inserciones, por ejemplo, sustituciones conservadoras).

En otra realización más, la molécula de anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en el presente documento, p. ej., un anticuerpo elegido entre cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 del documento US 2015/0218274; o codificado por la secuencia de nucleótidos de las Tablas 1-4; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En otras realizaciones, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR es un inhibidor de CEACAM (p. ej., inhibidor de CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5). En una realización, el inhibidor de CEACAM es una molécula de anticuerpo anti-CEACAM. Se describen anticuerpos anti-CEACAM-1 ilustrativos en los documentos WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251 y WO 2014/022332, p. ej., un anticuerpo monoclonal 34B1, 26H7 y 5F4; o una forma recombinante de los mismos, como se describe, p. ej., en los documentos US 2004/0047858, US 7.132.255 y WO 99/052552. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CEACAM se une a CEACAM-5 como se describe, por ejemplo, en Zheng et al. PLoS One. 2 de septiembre de 2010; 5 (9). pii: e12529 (DOI:10:1371/journal.pone.0021146), o presenta reactividad cruzada con CEACAM-1 y CEACAM-5 como se describe, p. ej., en los documentos WO 2013/054331 y US 2014/0271618.

Sin querer limitarnos a la teoría, se cree que las moléculas de adhesión celular del antígeno carcinoembrionario (CEACAM), como CEACAM-1 y CEACAM-5, median, al menos en parte, la inhibición de una respuesta inmune antitumoral (véase, por ejemplo, Markel et al. J Immunol. 15 de marzo de 2002;168(6):2803-10; Markel et al. J Immunol. 1 de noviembre de 2006;177(9):6062-71; Markel et al. Immunology. 12 de febrero de 2009;126(2):186-200; Markel et al. Cancer Immunol Immunother. 10 de febrero de 2010;59(2):215-30; Ortenberg et al. Mol Cancer Ther. 2012 Jun; 11(6):1300-10; Stern et al. J Immunol. 1 de junio de 2005;174(11):6692-701; Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529). Por ejemplo, se ha descrito a CEACAM-1 como un ligando heterófilo para TIM-3 y que desempeña un papel en la tolerancia y el agotamiento de las células T mediada por TIM-3 (véase, por ejemplo, el documento WO 2014/022332; Huang, et al. (2014) Nature doi: 10. 1 038/nature 13848). En algunas realizaciones, se ha demostrado que el co-bloqueo de CEACAM-1 y TIM-3 mejora una respuesta inmune antitumoral en modelos de cáncer colorrectal de xenoinjerto (véase, por ejemplo, el documento WO 2014/022332; Huang, et al. (2014), más arriba). En otras realizaciones, el bloqueo conjunto de CEACAM-1 y PD-1 reduce la tolerancia de los linfocitos T como se describe, p. ej., en el documento WO 2014/059251. Por tanto, se pueden utilizar inhibidores de CEACAM con los otros inmunomoduladores descritos en el presente documento (p. ej., inhibidores anti-PD-1 y/o anti-TIM-3) para potenciar la respuesta inmunitaria contra un cáncer, p. ej., un melanoma, un cáncer de pulmón (p. ej., CPNM), un cáncer de vejiga, un cáncer de colon, un cáncer ovárico y otros cánceres como se describe en el presente documento.

LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos o CD223) es una molécula de la superficie celular expresada en linfocitos T y linfocitos B activados que ha demostrado desempeñar una función en el agotamiento de los linfocitos T CD8+. En la técnica se puede disponer de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de LAG3 y sus ligandos y estos se pueden utilizar combinados con un CAR CD19 descrito en el presente documento. Por ejemplo, BMS-986016 (Bristol-Myers Squib) es un anticuerpo monoclonal que tiene como diana LAG3. IMP701 (Immutep) es un anticuerpo antagonista contra LAG3 e IMP731 (Immutep y GlaxoSmithKline) es un anticuerpo de depleción contra LAG3. Otros inhibidores de LAG3 incluyen IMP321 (Immutep), que es una proteína de fusión recombinante de una porción soluble de LAG3 e Ig que se une a moléculas MHC de clase II y activa las células presentadoras de antígeno (APC). Otros anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO2010/019570.

En una realización, el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de este es una molécula de anticuerpo anti-LAG3 tal como se describe en el documento US2015/0259420, titulado «Antibody Molecules to LAG3 and Uses Thereof». En una realización, la molécula de anticuerpo anti-LAG3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR (o

colectivamente todas las CDR) de una región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido entre cualquiera de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050(Ser) (e.g., BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050-Clon-H, BAP050-Clon-I o BAP050-Clon-J; o como se describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0259420; o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente, o CDR estrechamente relacionadas, p. ej., CDR que son idénticas o que tienen al menos una alteración aminoacídica, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (p. ej., sustituciones, deleciones o inserciones, p. ej., sustituciones conservadoras).

En otra realización más, la molécula de anticuerpo anti-LAG3 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones de un anticuerpo descrito en el presente documento, p. ej., un anticuerpo elegido entre cualquiera de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050(Ser) (e.g., BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser, o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050-Clon-H, BAP050-Clon-I, o BAP050-Clon-J; o como se describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0259420; o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

Aunque sin desear quedar ligados a la teoría, en algunas realizaciones, un microambiente tumoral no es propicio para que los linfocitos CART ataquen a las células cancerosas, debido a los efectos inhibidores directos o indirectos ejercidos por la presencia de células que expresan PD-L1+ o linfocitos T PD1+ dentro del microambiente tumoral. Más específicamente, un microambiente tumoral puede comprender células tumorales (que generalmente son CD19+), células efectoras inmunitarias (que pueden ser linfocitos T CD3+ y pueden ser PD1+ o PD1-, y que pueden ser células endógenas o células que expresan CAR), y células mieloides activadas (que generalmente son PD-L1+). Los linfocitos T PD1+ pueden crear una "barrera" alrededor del microambiente tumoral al evitar la entrada de linfocitos CART al tumor. Según la teoría no limitante del presente documento, la preadministración de un inhibidor de PD1 y/o un inhibidor de PD-L1 hace que el microambiente tumoral sea más favorable para la entrada de células que expresan CAR en el microambiente tumoral y elimine eficazmente las células cancerosas positivas diana. Los datos que respaldan este modelo se proporcionan en el presente documento, p. ej., en los ejemplos 20 y 21.

En consecuencia, en ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere a métodos de terapia de combinación que comprenden administrar a un sujeto una célula que expresa una molécula CAR que se une a CD19, por ejemplo, un CAR CD19, en combinación con un inhibidor de PD1, un inhibidor de PD-L1 o ambos. En algunos casos, el inhibidor de PD1 y/o el inhibidor de PD-L1 se administra antes de la terapia CAR. En otros casos, el inhibidor de PD1 y/o el inhibidor de PD-L1 se administra simultáneamente con o después de la terapia CAR. En algunos aspectos, el sujeto es un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD19, p. ej., una neoplasia maligna hemática, p. ej., una leucemia o un linfoma, p. ej., LDLBG, p. ej., LDLBG primario. En algunos casos, el paciente tiene, o se identifica que tiene, niveles elevados de PD1, PDL1 o CD3, o cualquier combinación de ellos. En algunos casos, el paciente tiene, o se identifica que tiene, al menos un 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de células DLBCL que son positivas para CD3 y PD1.

También se describen en este documento métodos para monitorizar la eficacia de una terapia con CAR, por ejemplo, una terapia con CAR CD19. Las células que expresan CAR pueden administrarse al torrente sanguíneo de un paciente con la intención de que las células se alojen en una célula tumoral, p. ej., se infiltren en un tumor. Por consiguiente, en algunos casos, el método comprende analizar una muestra de tumor para determinar la presencia de células que expresan CAR. En algunos casos, el método comprende la detección de un marcador tumoral, p. ej., CD19. En algunos casos, el método comprende la detección de un marcador de una célula que expresa CAR, p. ej., una construcción de CAR o un ácido nucleico que codifica la construcción de CAR. En algunos casos, el método comprende además la detección de un marcador de linfocitos T, p. ej., CD3. En algunos aspectos, el sujeto es un sujeto que tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD19, p. ej., una neoplasia maligna hemática, p. ej., una leucemia o un linfoma, p. ej., LDLBG, p. ej., LDLBG primario. En algunos casos, si las células que expresan CAR muestran una infiltración deficiente del tumor, se identifica que el sujeto tiene un riesgo elevado de recaída en comparación con un sujeto con una buena infiltración del tumor. En algunos casos, si las células que expresan CAR muestran una escasa infiltración del tumor, al sujeto se le administra un inhibidor de PD1 y/o un inhibidor de PD-L1, p. ej., en combinación con una segunda dosis de células que expresan CAR.

En algunas realizaciones, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR puede ser, p. ej., una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio es una molécula inhibidora, o fragmento de la misma, y el segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva, p. ej., un polipéptido que comprende un dominio de señalización intracelular como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el polipéptido que se asocia con una señal positiva puede incluir un dominio coestimulante de CD28, CD27, ICOS, p. ej., un dominio de señalización intracelular de CD28, CD27 y/o ICOS, y/o un dominio de señalización primaria, p. ej., de CD3 zeta, p. ej., descrito en esta memoria. En una realización, la proteína de fusión es expresada por la misma célula que expresó el CAR. En otra realización, la proteína de fusión es expresada por una célula, p. ej., un linfocito T que no expresa un CAR anti-CD19.

En una realización, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento es miR-17-92.

En una realización, el agente que potencia la actividad de un CAR es una citocina. Las citocinas tienen funciones importantes relacionadas con la expansión, diferenciación, supervivencia y homeostasis de los linfocitos T. Las citocinas que se pueden administrar al sujeto que recibe una célula que expresa CAR descritas en el presente documento incluyen: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-18 e IL-21, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la citocina administrada es IL-7, IL-15 o IL-21, o una combinación de las mismas. La citocina se puede administrar una vez al día o más de una vez al día, p. ej., dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. La citocina se puede administrar durante más de un día, p. ej., la citocina se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. Por ejemplo, la citocina se administra una vez al día durante 7 días.

En algunas realizaciones, la citocina se administra en combinación con células que expresan CAR. La citocina se puede administrar de forma simultánea o concurrente con las células que expresan CAR, p. ej., administrarse el mismo día. La citocina se puede preparar en la misma composición farmacéutica que las células que expresan CAR, o se puede preparar en una composición farmacéutica separada. Como alternativa, la citocina se puede administrar poco después de la administración de los linfocitos T que expresan CAR, p. ej., 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración de las células que expresan CAR. En realizaciones en las que la citocina se administra en un régimen de dosificación que ocurre a lo largo de más de un día, el primer día del régimen de dosificación de la citocina puede ser el mismo día de la administración con las células que expresan CAR, o el primer día de la dosificación de la citocina, el régimen puede ser 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración de los linfocitos T que expresan CAR. En una realización, el primer día, las células que expresan CAR se administran al sujeto, y el segundo día se administra una citocina una vez al día durante los siguientes 7 días. En una realización, la citocina que se va a administrar en combinación con las células que expresan CAR es IL-7, IL-15 y/o IL-21.

En otras realizaciones, la citocina se administra un periodo de tiempo suficiente después de la administración de las células que expresan CAR, p. ej., al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 1 año o más después de la administración de células que expresan CAR. En una realización, la citocina se administra después de la evaluación de la respuesta del sujeto a las células que expresan CAR. Por ejemplo, al sujeto se le administran células que expresan CAR según la dosificación y los regímenes descritos en esta memoria. La respuesta del sujeto a la terapia con CART se evalúa a las 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 1 año o más después de la administración de células que expresan CAR, utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, incluyendo la inhibición del crecimiento del tumor, la reducción de las células tumorales circulantes o la regresión del tumor. A los sujetos que no muestran una respuesta suficiente a la terapia con CART se les puede administrar una citocina. La administración de la citocina al sujeto que tiene una respuesta sub-óptima a la terapia con CART mejora la eficacia de CART y/o la actividad antitumoral. En una realización, la citocina administrada después de la administración de células que expresan CAR es IL-7.

Las terapias de combinación adicionales pueden incluir agentes antialérgicos, antieméticos, analgésicos, terapias complementarias.

Algunos pacientes pueden experimentar reacciones alérgicas a los agentes terapéuticos descritos en el presente documento y/u otro u otros agentes antineoplásicos durante o después de la administración; por lo tanto, a menudo se administran agentes antialérgicos para minimizar el riesgo de una reacción alérgica. Los agentes antialérgicos adecuados incluyen corticosteroides tales como dexametasona (p. ej., Decadron®), beclometasona (p. ej., Beclovent®), hidrocortisona (también conocida como cortisona, succinato sódico de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona y comercializada con los nombres comerciales Ala-Cort®, fosfato de hidrocortisona, Solu-Cortef®, Hydrocort Acetate® y Lanacort®), prednisolona (comercializada con los nombres comerciales Delta-Cortel®, Orapred®, Pediapred® y Prelone®), prednisona (comercializada con los nombres comerciales Deltasone®, Liquid Red®, Meticorten® y Orasone®), metilprednisolona (también conocida como 6-metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, comercializada con los nombres comerciales Duralone®,

Medralone®, Medrol®, M-Prednisol® y Solu-Medrol®); antihistamínicos, tales como difenhidramina (p. ej., Benadryl®), hidroxizina y ciproheptadina; y broncodilatadores, tales como los agonistas de los receptores beta-adrenérgicos, albuterol (p. ej., Proventil®) y terbutalina (Brethine®).

Algunos pacientes pueden experimentar náuseas durante y después de la administración de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento y/u otro u otros agentes antineoplásicos; por lo tanto, los anti-eméticos se utilizan para prevenir las náuseas (parte superior del estómago) y los vómitos. Los antieméticos adecuados incluyen aprepitant (Emend®), ondansetrón (Zofran®), granisetrón HCl (Kytril®), lorazepam (Ativan®, dexametasona (Decadron®), proclorperazina (Compazine®), casopitant (Rezonic® y Zunrisa®) y combinaciones de estos.

A menudo se prescriben medicamentos para aliviar el dolor experimentado durante el periodo de tratamiento para hacer que el paciente se sienta más cómodo. A menudo se utilizan analgésicos comunes que no necesitan receta, tales como Tylenol®. Sin embargo, los analgésicos opioides, tales como hidrocodona/paracetamol o hidrocodona/acetaminofeno (p. ej., Vicodin®), morfina (p. ej., Astramorph® o Avinza®), oxicodona (p. ej., OxyContin® o Percocet®), clorhidrato de oximorfona (Opana®) y fentanilo (p. ej., Duragesic®) también son útiles para el dolor moderado o intenso.

En un intento de proteger las células normales de la toxicidad del tratamiento y de limitar la toxicidad a los órganos, se pueden utilizar como una terapia complementaria agentes citoprotectores (tales como neuroprotectores, atrapadores de radicales libres, cardioprotectores, neutralizadores de la extravasación de antraciclina, nutrientes y similares). Los agentes citoprotectores adecuados incluyen Amifostina (Ethyol®), glutamina, dimesna (Tavocept®), mesna (Mesnex®), dexrazoxana (Zinecard® o Totect®), xaliprodén (Xaprila®) y leucovorina (también conocida como leucovorina cálcica, factor de citrovorum y ácido folínico).

La estructura de los compuestos activos identificados con números de código, denominaciones comerciales o genéricas se puede consultar en la edición actual del compendio estándar «The Merck Index» o en bases de datos, p. ej., Patents International (p. ej., IMS World Publications).

Los compuestos mencionados anteriormente, que se pueden utilizar combinados con un compuesto de la presente invención, se pueden preparar y administrar tal como se describe en la técnica, tal como en los documentos citados anteriormente.

En una realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la presente invención (por ejemplo, un compuesto de la presente invención) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración a un sujeto humano o animal, ya sea solo o junto con otros agentes anticancerígenos.

En una realización, la presente invención proporciona células para su uso en métodos de tratamiento de sujetos humanos o animales que padecen una enfermedad proliferativa celular que es un cáncer hematológico. La presente invención proporciona métodos para tratar a un sujeto humano o animal que necesita dicho tratamiento, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención (por ejemplo, un compuesto de la presente invención) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, ya sea solo o en combinación con otros agentes anticancerígenos.

En particular, las composiciones se formularán juntas como una combinación terapéutica o se administrarán por separado.

En la terapia combinada, el compuesto de la presente invención y otro(s) agente(s) anticanceroso(s) se pueden administrar de manera simultánea, a la vez o de manera secuencial sin límites de tiempo específicos, donde una administración de este tipo proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente.

En una realización preferida, el compuesto de la presente invención y el(los) otro(s) agente(s) anticanceroso(s) se administran generalmente de manera secuencial en cualquier orden por infusión o vía oral. El régimen de dosificación puede variar según la etapa de la enfermedad, la condición física del paciente, los perfiles de seguridad de los fármacos individuales, y la tolerancia de los fármacos individuales, así como otros criterios bien conocidos por el médico tratante y el profesional o profesionales médicos que administran la combinación. El compuesto de la presente invención y otros agentes anticancerígenos pueden administrarse con minutos de diferencia, horas, días o incluso semanas, dependiendo del ciclo particular que se utilice para el tratamiento. Además, el ciclo podría incluir la administración de un medicamento con mayor frecuencia que el otro durante el ciclo de tratamiento y en diferentes dosis por administración del medicamento.

En otro aspecto de la presente divulgación, se divulgan kits que incluyen uno o más compuestos de la presente invención y un socio de combinación como se divulga en este documento. Los kits representativos incluyen (a) un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (b) al menos un socio de

combinación, por ejemplo, como se indicó anteriormente, en donde dicho kit puede comprender un prospecto u otra etiqueta que incluya instrucciones para la administración.

Un compuesto de la presente invención también se puede utilizar para conseguir una mejora en combinación con procesos terapéuticos conocidos, por ejemplo, la administración de hormonas o radiación especialmente. Un compuesto de la presente invención se puede utilizar en particular como un radiosensibilizador, especialmente para el tratamiento de tumores que muestran poca sensibilidad a la radioterapia.

Combinación con una dosis baja, de potenciación inmunitaria de un inhibidor de mTOR

En una realización, las células que expresan una molécula de CAR se administran en combinación con una dosis baja potenciadora de la inmunidad de un inhibidor de mTOR. Por ejemplo, en una realización, la terapia de combinación incluye: células que expresan CAR CD19, una célula que expresa CAR dirigida a CD22, y un inhibidor de mTOR. Los métodos descritos en el presente documento utilizan dosis bajas, de potenciación inmunitaria, de inhibidores de mTOR, p. ej., inhibidores de mTOR alostéricos, incluidos rapálogos tales como RAD001. La administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR (p. ej., una dosis que es insuficiente para suprimir completamente el sistema inmunitario, pero suficiente para mejorar la función inmunitaria) puede optimizar el funcionamiento de las células efectoras inmunitarias, p. ej., linfocitos T o células que expresan CAR, en el sujeto. En la Solicitud de Patente de los EE. UU. N.º 2015/01240036 se describen métodos para medir la inhibición de mTOR, dosificaciones, pautas de tratamiento y composiciones farmacéuticas adecuadas.

En una realización, la administración de una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora el sistema inmunológico puede dar como resultado uno o más de los siguientes efectos:

i) una disminución en el número de células efectoras inmunes positivas para PD-1;

ii) un aumento en el número de células efectoras inmunes negativas para PD-1;

iii) un aumento en la proporción de células efectoras inmunes PD-1 negativas / células efectoras inmunes PD-1 positivas;

iv) un aumento en el número de células T vírgenes;

v) un aumento en la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: $CD62L^{alto}$, $CD127^{alto}$, CD27+ y BCL2, por ejemplo, en células T de memoria, por ejemplo, precursores de células T de memoria;

vi) una disminución en la expresión de KLRG1, por ejemplo, en células T de memoria, por ejemplo, precursores de células T de memoria; o

vii) un aumento en el número de precursores de células T de memoria, por ejemplo, células con una o una combinación de las siguientes características: aumento de $CD62L^{alto}$, aumento de $CD127^{alto}$, aumento de $CD27^{+}$, disminución de KLRG1 y aumento de BCL2;

y en la que cualquiera de los anteriores, por ejemplo, i), ii), iii), iv), v), vi) o vii), ocurre, por ejemplo, al menos transitoriamente, por ejemplo, en comparación con un sujeto no tratado.

En otra realización, la administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR da como resultado una proliferación o persistencia prolongada o mayor de células que expresan CAR, por ejemplo, en cultivo o en un sujeto, por ejemplo, en comparación con células que expresan CAR no tratadas o un sujeto no tratado. En algunas realizaciones, la mayor proliferación o persistencia se asocia con un incremento en el número de células que expresan CAR. Los métodos para medir la proliferación prolongada o mayor se describen en los ejemplos 18 y 19. En otra realización, la administración de una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejora el sistema inmunológico da como resultado una mayor destrucción de células cancerosas por células que expresan CAR, por ejemplo, en cultivo o en un sujeto, por ejemplo, en comparación con células que expresan CAR no tratadas o un sujeto no tratado. En algunas realizaciones, el aumento de la muerte de células cancerosas se asocia con una disminución del volumen del tumor.

En una realización, las células que expresan una molécula CAR se administran en combinación con una dosis baja, que mejora la inmunidad, de un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor alostérico de mTOR, por ejemplo, RAD001, o un inhibidor catalítico de mTOR. Por ejemplo, la administración de la dosis baja del inhibidor de mTOR que mejora la inmunidad puede iniciarse antes de la administración de una célula que expresa CAR; completarse antes de la administración de una célula que expresa CAR; iniciarse al mismo tiempo que la administración de una célula que expresa CAR; superponerse con la administración de una célula que expresa CAR; o continuar después de la administración de una célula que expresa CAR.

Como alternativa o además, la administración de una dosis baja de un inhibidor de mTOR que mejore el sistema inmunitario puede optimizar las células efectoras inmunitarias para que puedan expresar una molécula CAR. En dichas realizaciones, la administración de una dosis baja, potenciadora del sistema inmunitario, de un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor alostérico, por ejemplo, RAD001, o un inhibidor catalítico, se inicia o se completa antes de la recolección de células efectoras inmunitarias, por ejemplo, células T o células NK, que se van a diseñar para expresar una molécula CAR, de un sujeto.

En otra realización, las células efectoras inmunes, por ejemplo, células T o células NK, que se van a diseñar para expresar una molécula CAR, por ejemplo, después de la recolección de un sujeto, o las células efectoras inmunes que expresan CAR, por ejemplo, células T o células NK, por ejemplo, antes de la administración a un sujeto, se pueden cultivar en presencia de una dosis baja, que mejora el sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR.

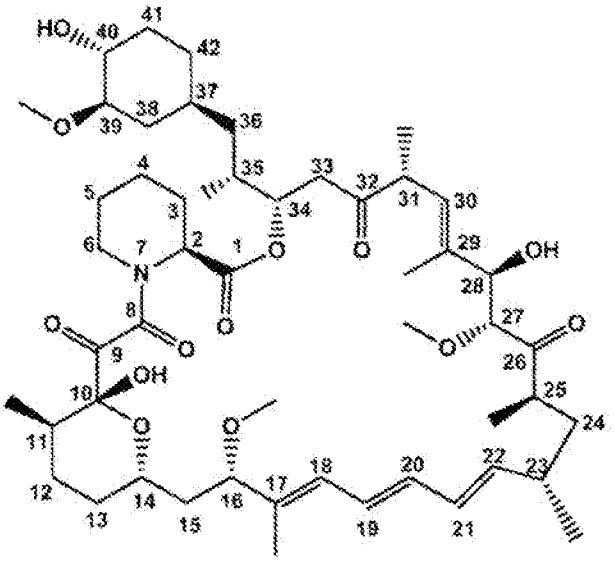
En una realización, administrar al sujeto una dosis baja, que mejora el sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR comprende administrar, por ejemplo, una vez por semana, por ejemplo, en una forma de dosificación de liberación inmediata, de 0,1 a 20, de 0,5 a 10, de 2,5 a 7,5, de 3 a 6 o aproximadamente 5 mg de RAD001, o una dosis bioequivalente del mismo. En una realización, administrar al sujeto una dosis baja, que mejora el sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR comprende administrar, por ejemplo, una vez por semana, por ejemplo, en una forma de dosificación de liberación sostenida, de 0,3 a 60, de 1,5 a 30, de 7,5 a 22,5, de 9 a 18 o aproximadamente 15 mg de RAD001, o una dosis bioequivalente del mismo.

En una realización, una dosis de un inhibidor de mTOR está asociada con, o proporciona, una inhibición de mTOR de al menos 5 pero no más de 90%, al menos 10 pero no más de 90%, al menos 15, pero no más de 90%, al menos 20 pero no más de 90%, al menos 30 pero no más de 90%, al menos 40 pero no más de 90%, al menos 50 pero no más de 90%, al menos 60 pero no más de 90%, al menos 70 pero no más de 90%, al menos 5 pero no más de 80%, al menos 10 pero no más de 80%, al menos 15, pero no más de 80%, al menos 20 pero no más de 80%, al menos 30 pero no más de 80%, al menos 40 pero no más de 80%, al menos 50 pero no más de 80%, al menos 60 pero no más del 80%, al menos 5 pero no más del 70%, al menos 10 pero no más del 70%, al menos 15, pero no más del 70%, al menos 20 pero no más del 70%, al menos 30 pero no más del 70%, al menos 40 pero no más del 70%, al menos 50 pero no más del 70%, al menos 5 pero no más del 60%, al menos 10 pero no más del 60%, al menos 15, pero no más del 60%, al menos 20 pero no más del 60%, al menos 30 pero no más del 60%, al menos 40 pero no más del 60%, al menos 5 pero no más del 50%, al menos 10 pero no más del 50%, al menos 15, pero no más del 50%, al menos 20 pero no más del 50%, al menos 30 pero no más del 50%, al menos 40 pero no más del 50%, al menos 5 pero no más del 40%, al menos 10 pero no más del 40%, al menos 15, pero no más del 40%, al menos 20 pero no más del 40%, al menos 30 pero no más del 40%, al menos 35 pero no más del 40%, al menos 5 pero no más del 30%, al menos 10 pero no más del 30%, al menos 15, pero no más del 30%, al menos 20 pero no más del 30%, o al menos 25 pero no más del 30%.

El grado de inhibición de mTOR se puede transmitir como, o corresponder a, el grado de inhibición de la cinasa P70 S6, p. ej., el grado de inhibición de mTOR se puede determinar por el nivel de disminución de la actividad de la cinasa P70 S6, p. ej., por la disminución de la fosforilación. de un sustrato de la cinasa P70 S6. El nivel de inhibición de mTOR se puede evaluar mediante diversos métodos, tal como la medida de la actividad de la cinasa P70 S6 mediante el ensayo de Boulay, como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2015/01240036, o como se describe en la patente de EE. UU. N.º 7.727.950; la medida del nivel de S6 fosforilado mediante transferencia Western; o la evaluación de un cambio en la relación de células efectoras inmunes PD1 negativas a células efectoras inmunes PD1 positivas.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de mTOR" se refiere a un compuesto o ligando, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que inhibe la cinasa mTOR en una célula. En una realización, un inhibidor de mTOR es un inhibidor alostérico. Los inhibidores de mTOR alostéricos incluyen el compuesto tricíclico neutro rapamicina (sirolimus), compuestos relacionados con rapamicina, es decir, compuestos que tienen una similitud funcional y estructural con rapamicina que incluyen, p. ej., derivados de rapamicina, análogos de rapamicina (también denominados rapálogos) y otros compuestos macrólidos que inhiben la actividad de mTOR. En una realización, un inhibidor de mTOR es un inhibidor catalítico.

La rapamicina es un antibiótico macrólido conocido producido por *Streptomyces hygroscopicus* que tiene la estructura que se muestra en la Fórmula A.



(A)

Véase, p. ej., McAlpine, J.B., *et al., J. Antibiotics* (1991) 44: 688; Schreiber, S.L., et al., J. Am. Chem. *Soc.* (1991) 113: 7433; Patente de EE.UU. Nº 3.929.992. Existen diversos esquemas de numeración propuestos para la rapamicina. Para evitar confusiones, cuando aquí se nombran análogos específicos de rapamicina, los nombres se dan con referencia a la rapamicina utilizando el esquema de numeración de la fórmula A.

Los análogos de rapamicina útiles en la invención son, por ejemplo, análogos O-sustituidos en los que el grupo hidroxilo en el anillo de ciclohexilo de la rapamicina se reemplaza por ORi en el que R_1 es hidroxialquilo, hidroxialcoxialquilo, acilaminoalquilo o aminoalquilo; por ejemplo, RAD001, también conocido como everolimus, como se describe en los documentos US 5.665.772 y WO94/09010.

Otros análogos de rapamicina adecuados incluyen aquellos sustituidos en la posición 26 o 28. El análogo de rapamicina puede ser un epímero de un análogo mencionado anteriormente, particularmente un epímero de un análogo sustituido en la posición 40, 28 o 26, y opcionalmente se puede hidrogenar adicionalmente, p. ej., como se describe en los documentos US 6 015 815, WO95/14023 y WO99/15530, p. ej., ABT578 también conocido como zotarolimus o un análogo de rapamicina descrito en los documentos US 7 091 213, WO98/02441 y WO01/14387, p. ej., AP23573 también conocido como ridaforolimus.

Los ejemplos de análogos de rapamicina adecuados para su uso en la presente invención de la patente estadounidense n.º 5.665.772 incluyen, entre otros, 40-O-bencil-rapamicina, 40-O-(4'-hidroximetil)bencil-rapamicina, 40-O-[4'-(1,2-dihidroxietil)]bencil-rapamicina, 40-O-alil-rapamicina, 40-O-[3'-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4(S)-il)-prop-2'-en-1'-il]-rapamicina, (2'E,4'S)-40-O-(4',5'-dihidroxipent-2'-en-1'-il)-rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etoxicarbonilmetil-rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, 40-O-(3-hidroxi)propil-rapamicina, 40-O-(6-hidroxi)hexil-rapamicina, 40-O-[2-(2-hidroxi)etoxi]etil-rapamicina, 40-O-[(3S)-2,2-dimetildioxolan-3-il]metil-rapamicina, 40-O-[(2S)-2,3-dihidroxiprop-1-il]-rapamicina, 40-O-(2-acetoxi)etil-rapamicina, 40-O-(2-nicotinoiloxi)etil-rapamicina, 40-O-[2-(N-morfolino)acetoxi]etil-rapamicina, 40-O-(2-N-imidazolilacetoxi)etil-rapamicina, 40-O-[2-(N-metil-N'-piperazinil)acetoxi]etil-rapamicina, 39-O-desmetil-39,40-O,O-etilen-rapamicina, (26R)-26-dihidro-40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, 40-O-(2-aminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-acetaminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-nicotinamidoetil)-rapamicina, 40-O-(2-(N-metil-imidazo-2'-ilcarbetoxamido)etil)-rapamicina, 40-O-(2-etoxicarbonilaminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-tolilsulfonamidoetil)-rapamicina y 40-O-[2-(4',5'-dicarboetoxi-1',2',3' -triazol-1' -il)-etil]-rapamicina.

Se conocen otros análogos de rapamicina útiles en la presente invención que son análogos en donde el grupo hidroxilo del anillo de ciclohexilo de la rapamicina y/o el grupo hidroxi en la posición 28 es reemplazado por un grupo hidroxiéster, por ejemplo, análogos de rapamicina que se encuentran en el documento US RE44 768, p. ej., temsirolimus.

Otros análogos de rapamicina útiles en la presente invención incluyen aquellos en donde el grupo metoxi en la posición 16 es reemplazado por otro sustituyente, p. ej., alquiniloxi, bencilo, ortometoxibencilo o clorobencilo (opcionalmente hidroxi-sustituido) y/o en donde el grupo mextoxi en la posición 39 se elimina junto con el carbono 39 de manera que el anillo de ciclohexilo de la rapamicina se convierte en un anillo de ciclopentilo que carece del grupo metioxi de la posición 39; p. ej., como se describe en los documentos WO95/16691 y WO96/41807. Los análogos se pueden modificar adicionalmente de modo que el hidroxi en la posición 40 de rapamicina se alquila y/o se reduce el 32-carbonilo.

Los análogos de rapamicina del documento WO95/16691 incluyen, entre otros, 16-desmetoxi-16-(pent-2-inil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-(but-2-inil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-(propargil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-(4-hidroxi-but-2-inil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-benciloxi-40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, 16-desmetoxi-16-benciloxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-orto-metoxibencil-rapamicina, 16-desmetoxi-40-O-(2-metoxietil)-16-pent-2-inil)oxi-rapamicina, 3 9-desmetoxi-40-desoxi-39-formil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-hidroximetil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-carboxi-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(4-metil-piperazin-1-il)carbonil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(morfolin-4-il)carbonil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-[N-metil, N-(2-piridin-2-il-etil)]carbamoil-42-nor-rapamicina y 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(p-toluenosulfonilhidrazonometil)-42-nor-rapamicina.

Los análogos de rapamicina del documento WO96/41807 incluyen, entre otros, 32-desoxorrapamicina, 16-*O*-pent-2-inil-32-desoxorrapamicina, 16-*O*-pent-2-inil-32-desoxo- 40-O-(2-hidroxietil)rapamicina, 16-*O*-pent-2-inil-32-(*S*)-dihidro-40-O-(2-hidroxietil)rapamicina, 32(*S*)-dihidro-40-*O*-(2-metoxi)etilrapamicina y 32(*S*)-dihidro-40-*O*-(2-hidroxietil)rapamicina.

Otro análogo de rapamicina adecuado es el umirolimus, como se describe en el documento US2005/0101624.

RAD001, también conocido como everolimus (Afinitor®), tiene el nombre químico (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-12-{(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-hidroxietoxi)-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-11,36-dioxa-4-aza-triciclo[30.3.1.04,9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraeno-2,3,10,14,20-pentaona, como se describe en los documentos US 5.665.772 y WO94/09010.

Otros ejemplos de inhibidores alostéricos de mTOR incluyen sirolimus (rapamicina, AY-22989), 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina (también llamado temsirolimus o CCI-779) y ridaforolimus (AP-23573/MK-8669). Otros ejemplos de inhibidores alostéricos de mTor incluyen zotarolimus (ABT578) y umirolimus.

Como alternativa o adicionalmente, se ha descubierto que los inhibidores de mTOR catalíticos competitivos con ATP se dirigen directamente al dominio de la cinasa de mTOR y se dirigen tanto a mTORC1 como a mTORC2. Estos también son inhibidores más eficaces de mTORC1 que los inhibidores de mTOR alostéricos tales como rapamicina, porque modulan las salidas de mTORC1 resistente a rapamicina tales como la fosforilación de 4EBP1-T37/46 y la traducción dependiente de la caperuza.

Los inhibidores catalíticos incluyen: BEZ235 o 2-metil-2-[4-(3-metil-2-oxo-8-quinolin-3-il-2,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-fenil]-propionitrilo, o la forma de sal monotosilada (la síntesis de BEZ235 se describe en WO2006/122806); CCG168 (también conocido como AZD-8055, Chresta, CM, et al., Cancer Res, 2010, 70(1), 288-298) que tiene el nombre químico {5-[2,4-bis-((S)-3-metil-morfolin-4-il)-pirido[2,3d]pirimidin-7-il]-2-metoxi-fenil}-metanol; 3-[2,4-bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-N-metilbenzamida (documento WO09104019); 3-(2-aminobenzo[d]oxazol-5-il)-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (documentos WO10051043 y WO2013023184); A N-(3-(N-(3-((3,5-dimetoxifenil)amino)quinoxalina-2-il)sulfamoil)fenil)-3-metoxi-4-metilbenzamida (documentos WO07044729 y WO12006552); PKI-587 (Venkatesan, AM, J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645) que tiene el nombre químico 1-[4-[4-(dimetilamino)pipendina-1-carbonil]fenil]-3-[4-(4,6-dimorfolino-1,3,5-triazin-2-il)fenil]urea; GSK-2126458 (ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43) que tiene el nombre químico 2,4-difluoro-N-{2-metoxi-5-[4-(4-piridazinil)-6-quinolinil]-3-piridinil}bencenosulfonamida; 5-(9-isopropil-8-metil-2-morfolino-9H-purin-6-il)pirimidin-2-amina (WO10114484); y (E)-N-(8-(6-amino-5-(trifluorometil)piridin-3-il)-1-(6-(2-cianopropan-2-il)piridin-3-il)-3-metil-1H-imidazo[4, 5-c]quinolin-2(3H)-ilideno)cianamida (WO12007926).

Los ejemplos adicionales de inhibidores catalíticos de mTOR incluyen 8-(6-metoxi-piridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-fenil)-1,3-dihidro-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (documento WO2006/122806) y Ku-0063794 (García-Martínez JM, *et al.*, *Biochem J.*, 2009, 421(1), 29-42. El Ku-0063794 es un inhibidor específico de la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR)). WYE-354 es otro ejemplo de un inhibidor catalítico de mTOR (Yu K, et al. (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15): 6232-6240).

Los inhibidores de mTOR útiles según la presente invención también incluyen profármacos, derivados, sales farmacéuticamente aceptables o análogos de los mismos de cualquiera de los anteriores. Los inhibidores de mTOR, tal como RAD001, pueden formularse para administración basándose en métodos bien establecidos en la técnica basados en las dosis particulares descritas en este documento. En particular, la Patente de los EE. UU. n.º 6.004.973 proporciona ejemplos de formulaciones que se pueden utilizar con los inhibidores de mTOR descritos en el presente documento.

Métodos y biomarcadores para evaluar la eficacia de CAR o la idoneidad de la muestra

La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, identificaciones genéticas que indican si es probable que un paciente de cáncer tratado con una terapia con CAR recaiga o haya recaído. Sin desear limitarse a la teoría, en el ejemplo 12 se establece una base experimental para esta identificación genética.

En una realización, se utilizan nuevas firmas genéticas transcripcionales descritas en este documento (por ejemplo, en la Tabla 29 del Ejemplo 12) para permitir mejoras en los productos fabricados, reduciendo así la probabilidad de recaída del paciente. En una realización, las firmas genéticas descritas en este documento se utilizan para modificar la aplicación terapéutica del producto fabricado, reduciendo así la probabilidad de recaída del paciente.

En una realización, las firmas genéticas descritas en este documento (por ejemplo, en la Tabla 29 en el Ejemplo 12) se identifican en un sujeto antes del tratamiento con una célula que expresa CAR, por ejemplo, tratamiento CART que predice la recaída al tratamiento con CAR. En una realización, las firmas genéticas descritas en este documento se identifican en una muestra de aféresis o una muestra de médula ósea. En una realización, las firmas genéticas descritas en este documento se identifican en un producto celular que expresa CAR fabricado, por ejemplo, un producto CART antes de la infusión.

Esta descripción también proporciona pruebas, por ejemplo, en el ejemplo 12, de que (sin desear quedar ligados a la teoría) la disminución de la identificación de T_{REG} en el paciente antes de la aféresis o durante la fabricación del producto CART reduce el riesgo de recaída del paciente.

En una realización, un paciente recibe un tratamiento previo con una o más terapias que reducen las células T_{REG} antes de la recolección de células para la fabricación de productos CAR, por ejemplo, la fabricación de productos CART, lo que reduce el riesgo de recaída del paciente al tratamiento con células que expresan CAR. Los métodos de disminución de linfocitos T_{REG} incluyen, pero sin limitación, ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, agotamiento de CD25 y combinaciones de los mismos.

En una realización, un paciente se trata previamente con ciclofosfamida o un anticuerpo anti-GITR antes de la recolección de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, reduciendo así el riesgo de recaída del paciente en el tratamiento con células que expresan CAR.

En una realización, el proceso de fabricación de células que expresan CAR se modifica para agotar las células T_{REG} antes de la fabricación del producto celular que expresa CAR. En una realización, se utiliza la depleción de CD25 para agotar las células T_{REG} antes de la fabricación del producto celular que expresa CAR.

En una realización, después de tratar a un paciente o un producto celular que expresa CAR con un tratamiento que reduce las células T_{REG}, el paciente es tratado con una terapia combinada. La terapia de combinación puede comprender, p. ej., un inhibidor de CD19 tal como una célula que expresa CAR CD19, y uno o más inhibidores de linfocitos B, p. ej., inhibidores de linfocitos B como se describe en el presente documento.

En una realización, se analiza a un paciente para determinar el nivel de células T_{REG} en una muestra del paciente, por ejemplo, una muestra que comprende células cancerosas y/o una muestra que representa un microambiente tumoral. En una realización, esta información se utiliza para determinar un curso de tratamiento para el paciente. Por ejemplo, en una realización, si se identifica que el paciente tiene niveles elevados de células T_{REG} en comparación con un control, la terapia comprende administrar un tratamiento distinto de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, la terapia puede comprender la administración de una molécula de anticuerpo, la administración de una terapia de molécula pequeña, cirugía o radioterapia, o cualquier combinación de las mismas. Esta terapia puede dirigirse a uno o más antígenos de linfocitos B.

En una realización, un recidivante es un paciente que tiene, o que se ha identificado que tiene, un nivel mayor de expresión (p. ej., aumento de los niveles de ARN) de uno o más de (p. ej., 2, 3, 4 o todos) los siguientes genes, en comparación con no recidivantes: MIR199A1, MIR1203, uc021ovp, ITM2C, y HLA-DQB1 y/o niveles reducidos de expresión (p. ej., reducción de los niveles de ARN) de uno o más de (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o todos) los siguientes genes, en comparación con no recidivantes: PPIAL4D, TTTY10, TXLNG2P, MIR4650-1, KDM5D, USP9Y, PRKY, RPS4Y2, RPS4Y1, NCRNA00185, SULT1E1 y EIF1AY.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método para evaluar o supervisar la eficacia de una terapia con células que expresan CAR, en un sujeto (p. ej., un sujeto que padece cáncer), o la idoneidad de una muestra (p. ej., una muestra de aféresis) para una terapia con CAR, p. ej., una terapia que incluye la administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria de un inhibidor de mTOR. El método incluye adquirir un valor de eficacia para la terapia CAR, o idoneidad de la muestra, en donde dicho valor es indicativo de la eficacia o idoneidad de la terapia con células que expresan CAR.

En algunos casos, el valor de la eficacia de la terapia con CAR, o idoneidad de la muestra, comprende una medida de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más (la totalidad) de los siguientes:

(i) el nivel o actividad de uno, dos, tres o más (p. ej., la totalidad) de los linfocitos T_{EFF} en reposo, linfocitos T_{REG} en reposo, linfocitos T más jóvenes (p. ej., células CD4 o CD8, o linfocitos T gamma/delta más jóvenes), o linfocitos T de memoria tempranos, o una combinación de estos, en una muestra (p. ej., una muestra de aféresis o una muestra de un producto de tipo célula que expresa CAR elaborado);

(ii) el nivel o actividad de uno, dos, tres o más (p. ej., la totalidad) de los linfocitos T_{EFF} activados, linfocitos T_{REG} activados, linfocitos T más viejos (p. ej., células CD4 o CD8 más viejas), o linfocitos T de memoria tardíos, o una combinación de estos, en una muestra (p. ej., una muestra de aféresis o una muestra de un producto de tipo célula que expresa CAR elaborado);

(iii) el nivel o actividad de un marcador del agotamiento de células inmunitarias, p. ej., uno, dos o más inhibidores de puntos de control inmunitarios (p. ej., PD-1, PD-L1, TIM-3 y/o LAG-3) en una muestra (p. ej., una muestra de aféresis o una muestra de un producto de tipo célula que expresa CAR elaborado). En un caso, una célula inmunitaria tiene un fenotipo agotado, p. ej., coexpresa al menos dos marcadores de agotamiento, p. ej., coexpresa PD-1 y TIM-3. En otros casos, una célula inmunitaria tiene un fenotipo agotado, p. ej., coexpresa al menos dos marcadores de agotamiento, p. ej., coexpresa PD-1 y LAG-3;

(iv) el nivel de actividad de las células efectoras inmunitarias CD27 y/o CD45RO- (p. ej., CD27+ CD45RO-), p. ej., en una población de linfocitos T CD4+ o CD8+, en una muestra (p. ej., una muestra de aféresis o una muestra de un producto de tipo célula que expresa CAR elaborado);

(v) el nivel o actividad de uno, dos, tres, cuatro, cinco, diez, doce o más de los biomarcadores elegidos de CCL20, IL-17a y/o IL-6, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CD57, CD27, CD122, CD62L, KLRG1;

(vi) un nivel o actividad de citocinas (p. ej., calidad del repertorio de citocinas) en una muestra de producto celular que expresa CAR; o

(vii) una eficiencia de transducción de una célula que expresa CAR en una muestra de producto de tipo célula que expresa CAR elaborado.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, la terapia con células que expresan CAR comprende una pluralidad (p. ej., una población) de células efectoras inmunitarias que expresan CAR, p. ej., una pluralidad (p. ej., una población) de linfocitos T o linfocitos NK, o una combinación de estos. En un caso, la terapia celular que expresa CAR incluye la administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, la medida de uno o más de (i)-(vii) se obtiene de una muestra de aféresis adquirida del sujeto. La muestra de aféresis se puede evaluar antes de la infusión o reinfusión.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, la medida de uno o más de (i)-(vii) se obtiene de una muestra de un producto de tipo célula que expresa CAR elaborado. El producto de tipo célula que expresa CAR elaborado se puede evaluar antes de la infusión o reinfusión.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, se evalúa al sujeto antes de recibir, durante o después de recibir la terapia con células que expresan CAR.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, la medida de uno o más de (i)-(vii) evalúa el perfil de uno o más de expresión génica, citometría de flujo o expresión de proteínas.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, el método comprende además identificar que el sujeto responde, no responde, recidivante o no recidivante, en función de la medida de uno o más de (i)-(vii).

En algunos casos de cualquiera de los métodos descritos en este documento, un respondedor (por ejemplo, un respondedor completo) tiene, o se identifica que tiene, un mayor nivel o actividad de una, dos o más (todas) de GZMK, PPF 1BP2 o células T vírgenes en comparación con un no respondedor.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, un sujeto que no responde al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un nivel o actividad más elevados de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más (p. ej., la totalidad) de IL22, IL-2RA, IL-21, IRF8, IL8, CCL17, CCL22, linfocitos T efectores o linfocitos T reguladores, en comparación con un sujeto que responde al tratamiento.

En un caso, un recidivante es un paciente que tiene, o que se ha identificado que tiene, un nivel mayor de expresión de uno o más de (p. ej., 2, 3, 4 o todos) los siguientes genes, en comparación con sujetos no recidivantes: MIR199A1, MIR1203, uc021ovp, ITM2C, y HLA-DQB1 y/o niveles reducidos de expresión de uno o más de (p. ej.,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o todos) los siguientes genes, en comparación con los no recidivantes: PPIAL4D, TTTY10, TXLNG2P, MIR4650-1, KDM5D, USP9Y, PRKY, RPS4Y2, RPS4Y1, NCRNA00185, SULT1E1 y EIF1AY.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, un sujeto con una respuesta completa al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un porcentaje más elevado, p. ej., más elevado estadísticamente significativo, de linfocitos T CD8+ en comparación con un valor de referencia, p. ej., un porcentaje de linfocitos T CD8+ de un sujeto que no responde al tratamiento.

En algunos casos cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, un sujeto con una respuesta completa al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un porcentaje más elevado de células efectoras inmunitarias CD27+ CD45RO-, p. ej., en la población CD8+, en comparación con un valor de referencia, p. ej., un número de células efectoras inmunitarias CD27+ CD45RO- de un sujeto que no responde al tratamiento.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, un sujeto con una respuesta completa al tratamiento o un sujeto con una respuesta parcial al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un porcentaje más elevado, p. ej., más elevado estadísticamente significativo, de linfocitos T CD4+ en comparación con un valor de referencia, p. ej., un porcentaje de linfocitos T CD4+ de un sujeto que no responde al tratamiento.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, un sujeto con una respuesta completa al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un porcentaje más elevado de uno, dos, tres o más de (p. ej., todos) linfocitos T_{EF} en reposo, linfocitos T_{REG} en reposo, linfocitos T más jóvenes (p. ej., células CD4 o CD8, o linfocitos T gamma/delta más jóvenes), o linfocitos T de memoria tempranos, o una combinación de estos, en comparación con un valor de referencia, p. ej., un número de un sujeto que no responde al tratamiento de linfocitos T_{EF} en reposo, linfocitos T_{REG} en reposo, linfocitos T más jóvenes (p. ej., células CD4 o CD8 más jóvenes) o linfocitos T de memoria tempranos.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, un sujeto que no responde al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un porcentaje más elevado de uno, dos, tres o más de (p. ej., todos) linfocitos T_{EF} activados, linfocitos T_{REG} activados, linfocitos T más viejos (p. ej., células CD4 o CD8 más viejas), o linfocitos T de memoria tardíos, o una combinación de estos, en comparación con un valor de referencia, p. ej., un número de linfocitos T_{EFF} activados de un sujeto que responde al tratamiento, linfocitos T_{REG} activados, linfocitos T más viejos (p. ej., células CD4 o CD8 más viejas) o linfocitos T de memoria tardíos.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, un sujeto que no responde al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un porcentaje más elevado del marcador de agotamiento de células inmunitarias, p. ej., uno, dos o más inhibidores de puntos de control inmunitarios (p. ej., PD-1, PD-L1, TIM-3 y/o LAG-3). En un caso, un sujeto que no responde al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un porcentaje más elevado de células efectoras inmunitarias que expresan PD-1, PD-L1 o LAG-3 (p. ej., linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+) (p. ej., linfocitos T CD8+ y/o células CD4+ que expresan CAR) en comparación con el porcentaje de células efectoras inmunitarias que expresan PD-1 o LAG-3 de un sujeto que responde al tratamiento.

En un caso, un sujeto que no responde al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un porcentaje más elevado de células inmunitarias que tienen un fenotipo agotado, p. ej., células inmunitarias que coexpresan al menos dos marcadores de agotamiento, p. ej., coexpresan PD-1, PD-L1 y/o TIM-3. En otros casos, un sujeto que no responde al tratamiento tiene, o se ha identificado que tiene, un porcentaje más elevado de células inmunitarias que tienen un fenotipo agotado, p. ej., células inmunitarias que coexpresan al menos dos marcadores de agotamiento, p. ej., coexpresan PD-1 y LAG-3.

En algunos casos de cualquiera de los métodos descritos en este documento, un paciente que no responde tiene, o se identifica que tiene, un mayor porcentaje de células PD-1/PD-LH7LAG-3+ en la población de células que expresan CAR en comparación con un paciente que responde (por ejemplo, un paciente que responde completamente) a la terapia celular que expresa CAR.

En algunos casos de cualquiera de los métodos descritos en este documento, un respondedor parcial tiene, o se identifica que tiene, un porcentaje mayor de células PD-1/PD-L1+/LAG-3+ que un respondedor en la población de células que expresan CAR.

En algunos casos de cualquiera de los métodos descritos en este documento, un paciente que no responde tiene, o se identifica que tiene, un fenotipo agotado de PD1/PD-L1+ CAR+ y coexpresión de LAG3 en la población de células que expresan CAR.

En algunos casos de cualquiera de los métodos descritos en este documento, un paciente que no responde al tratamiento tiene, o se identifica que tiene, un mayor porcentaje de células PD-1/PD-L1+/TIM-3+ en la población de células que expresan CAR en comparación con el paciente que responde (por ejemplo, un paciente que responde completamente).

En algunos casos de cualquiera de los métodos descritos en este documento, un respondedor parcial tiene, o se identifica que tiene, un mayor porcentaje de células PD-1/PD-L1+/TIM-3+ que los respondedores, en la población de células que expresan CAR.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, la presencia de linfocitos T CD8+ CD27+ CD45RO- en una muestra de aféresis es un predictor positivo de la respuesta del sujeto a una terapia celular que expresa CAR.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, un porcentaje elevado de linfocitos T PD1+ CAR+ y LAG3+ o TIM3+ en una muestra de aféresis es un factor de pronóstico deficiente de la respuesta del sujeto a una terapia con células que expresan CAR.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, el sujeto que responde al tratamiento (p. ej., el sujeto con una repuesta completa o parcial al tratamiento) tiene uno, dos, tres o más (o la totalidad) del siguiente perfil:

(i) tiene un número mayor de células efectoras inmunitarias CD27+ en comparación con un valor de referencia, p. ej., un número de células efectoras inmunitarias CD27+ de un sujeto que no responde al tratamiento;

(ii) tiene un mayor número de linfocitos T CD8+ en comparación con un valor de referencia, p. ej., un número de linfocitos T CD8+ de un sujeto que no responde al tratamiento;

(iii) tiene un número menor de células inmunitarias que expresan uno o más inhibidores de puntos de control, p. ej., un inhibidor de puntos de control elegidos de PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 o KLRG-1, o una combinación, en comparación con un valor de referencia, p. ej., un número de células que expresan uno o más inhibidores de puntos de control de un sujeto que no responde al tratamiento; o

(iv) tiene un número mayor de una, dos, tres, cuatro o más (todas) de células TEFF en reposo, células T_{REG} en reposo, células CD4 vírgenes, células de memoria no estimuladas o células T de memoria temprana, o una combinación de las mismas, en comparación con un valor de referencia, por ejemplo, un número de no respondedores de células T_{EFF} en reposo, células T_{REG} en reposo, células CD4 vírgenes, células de memoria no estimuladas o células T de memoria temprana.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, el nivel o actividad de citocinas de (vi) se escoge entre una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (o la totalidad) de la citocina CCL20/MIP3a, IL17A, IL6, GM-CSF, IFNγ, IL10, IL13, IL2, IL21, IL4, IL5, IL9 o TNFα, o una combinación de estas. La citocina se puede escoger entre una, dos, tres, cuatro o más (la totalidad) de IL-17a, CCL20, IL2, IL6 o TNFa. En un caso, un mayor nivel o actividad de una citocina se escoge entre una o más de IL-17a y CCL20 y es indicativo de una mayor respuesta o menos recaídas.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, una eficacia de transducción de un 15 % o superior en (vii) es indicativa de una mayor respuesta o menos recaídas.

En algunos casos de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, una eficiencia de transducción inferior a un 15 % en (vii) es indicativa de una menor respuesta o más recaídas.

En algunos casos, el sujeto que responde al tratamiento, un sujeto que no responde al tratamiento, un sujeto recidivante o un sujeto no recidivante identificado mediante los métodos del presente documento se puede evaluar adicionalmente de acuerdo con criterios clínicos. Por ejemplo, un sujeto con una respuesta completa al tratamiento tiene, o se ha identificado como, un sujeto que tiene una enfermedad, p. ej., un cáncer, que muestra una respuesta completa, p. ej., una remisión completa, al tratamiento. Una respuesta completa se puede identificar, p. ej., usando las NCCN Guidelines®, como se describe en este documento. Un sujeto con una respuesta parcial al tratamiento tiene, o se identificado como, un sujeto que tiene una enfermedad, p. ej., un cáncer que muestra una respuesta parcial, p. ej., una remisión parcial, al tratamiento. Una respuesta parcial se puede identificar, p. ej., usando las NCCN Guidelines®, como se describe en este documento. Un no respondedor es, o se identifica como, un sujeto que tiene una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, que no muestra una respuesta a un tratamiento, por ejemplo, el paciente tiene una enfermedad estable o una enfermedad progresiva. Se puede identificar a un paciente que no responde, por ejemplo, utilizando las NCCN Guidelines®, como se describe en este documento.

Como alternativa, o en combinación con los métodos desvelados en el presente documento, sensible a dicho valor, realizando uno, dos, tres, cuatro o más de:

administrar, p. ej., a un sujeto que responde al tratamiento o un sujeto no recidivante, una terapia con células que expresan CAR;

administrar una dosificación alterada de una terapia con células que expresan CAR;

alterar la programación o evolución temporal de una terapia con células que expresan CAR;

administrar, p. ej., a un sujeto que no responde al tratamiento o un sujeto con una respuesta parcial al tratamiento, un agente adicional combinado con una terapia con células que expresan CAR, p. ej., un inhibidor de puntos de control, p. ej., un inhibidor de puntos de control descrito en el presente documento;

administrar a un sujeto que no responde al tratamiento o un sujeto con una respuesta parcial al tratamiento una terapia que aumenta el número de linfocitos T más jóvenes en el sujeto antes del tratamiento con una terapia con células que expresan CAR;

modificar el proceso de elaboración de una terapia con células que expresan CAR, p. ej., enriqueciendo en linfocitos T más jóvenes antes de introducir un ácido nucleico que codifica un CAR, o aumentando la eficiencia de transducción, p. ej., para un sujeto identificado como un sujeto que no responde al tratamiento o un sujeto con una respuesta parcial al tratamiento;

administrar una terapia alternativa, p. ej., para un sujeto que no responde al tratamiento o un sujeto con una respuesta parcial al tratamiento o un sujeto recidivante; o

si el sujeto es, o se ha identificado como, un sujeto que no responde al tratamiento o un sujeto recidivante, reducir la población de linfocitos T_{REG} y/o identificación genética de T_{REG}, p. ej., mediante uno o más del agotamiento de CD25, administración de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR o una combinación de estos.

En ciertos casos, el sujeto se trata previamente con un anticuerpo anti-GITR. En ciertos casos, el sujeto se trata con un anticuerpo anti-GITR antes de la infusión o reinfusión.

En algunos casos de los métodos descritos en el presente documento, se realiza captura de imágenes con FDG-PET/CT (PET/CT) en un sujeto que se ha tratado con una terapia con CAR. Esta medida puede predecir la respuesta a la terapia. Por ejemplo, en algunos casos, se miden el volumen tumoral metabólicamente activo (VTM) y/o la captación de [11F]-2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG). En algunos casos, una disminución en VTM es indicativa de respuesta, p. ej., CR (respuesta completa) o PR, por sus siglas en inglés, (respuesta parcial), p. ej., un valor de VTM posterior al tratamiento de aproximadamente 0 es indicativo de CR, mientras que un aumento en VTM es indicativo de EP (enfermedad progresiva). En algunos casos, una disminución en la captación de FDG es indicativa de respuesta, p. ej., CR o PR, mientras que un aumento en la captación de FDG es indicativo de EP. En algunos casos, la captura de imágenes se realiza después de la administración de la terapia con CAR, p. ej., aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o 6 meses después de la administración de la terapia con CAR. En algunos casos, la captura de imágenes se realiza en un sujeto que no tiene síntomas de SLC (síndrome de liberación de citocinas), p. ej., un paciente que padecía SLC y cuyos síntomas se resolvieron antes de la captura de imágenes. En algunos casos, la captura de imágenes se realiza en un sujeto que tiene síntomas de SLC. En algunos casos, las imágenes se realizan antes de la terapia con CAR y la imagen previa a la terapia se compara con una imagen posterior a la terapia. En algunos casos, el sujeto tiene un cáncer, p. ej., linfoma, p. ej., linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG) o linfoma folicular (LF). En algunos casos, la terapia con CAR comprende una célula que expresa CAR19, p. ej., CTL019. En algunos casos, la terapia con CAR comprende una terapia con CAR descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa CAR20, una célula que expresa CAR22 o una célula que expresa CAR19, opcionalmente en combinación con una terapia con linfocitos B.

Medicina personalizada (teranóstica)

CARACTERÍSTICAS DE CD79, P. EJ., MUTACIONES

Sin querer limitarnos a la teoría, algunos pacientes con cáncer muestran una respuesta inicial a un inhibidor de CD 19, como una célula que expresa CAR CD 19, y luego recaen. En algunos casos, la recaída es causada (al menos en parte) por un cambio de marco y/o un codón de terminación prematuro en CD19 en las células cancerosas, u otro cambio en la expresión (incluidos los niveles de expresión) de CD19 que reduce la capacidad de una célula que expresa CAR CD19 para atacar a las células cancerosas. Tal mutación puede reducir la eficacia de la terapia con CD19 y contribuir a la recaída del paciente. En consecuencia, en algunos casos, puede ser beneficioso cuando una terapia de CD19 se complementa o reemplaza con una terapia dirigida a una segunda diana diferente, p. ej., una diana expresada en linfocitos B, p. ej., uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1. En el presente documento se desvelan diversas terapias de combinación ilustrativas de este tipo. La invención se refiere a los CAR CD22 como se definen en las reivindicaciones.

Esta solicitud desvela, entre otras cosas, métodos para tratar a un sujeto que tiene cáncer que comprende uno o más de: (1) determinar si un sujeto tiene una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, en una característica de CD19 en relación con una característica de referencia, y (2) si hay una diferencia entre la

característica determinada y la característica de referencia, administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una terapia con CAR, p. ej., CART, tratando así al sujeto. El paciente puede ser, p. ej., un paciente que ha recaído después del tratamiento con un inhibidor de CD19, p. ej., una célula que expresa CAR CD19. El paciente puede ser un paciente que ha recibido o está recibiendo una terapia con CAR CD19 y está en riesgo de recaída. El paciente puede ser un no respondedor a una terapia con CD 19 CAR.

La característica puede ser, p. ej., una secuencia de CD19, p. ej., una secuencia de proteína o ácido nucleico. La secuencia se puede determinar, p. ej., como se describe en los ejemplos, mediante secuenciación de ácidos nucleicos de alto rendimiento o mediante espectrometría de masas de proteínas. Como se describe en el Ejemplo del presente documento, un paciente puede recaer después de la terapia con CART CD19 debido a mutaciones en CD19, p. ej., en el exón 2 de CD19, p. ej., una mutación que provoca un cambio de marco y un codón de parada prematuro en CD19. En casos, la inserción o deleción no causa uno o ambos de un desplazamiento del marco y un codón de parada prematuro. La mutación puede ser, p. ej., una inserción, una supresión, una sustitución, una translocación o una combinación de cualquiera de las anteriores. La inserción, supresión o sustitución puede implicar, p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 20 o 50 nucleótidos. La inserción, supresión o sustitución puede implicar, p. ej., como máximo 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 20, 50 o 100 nucleótidos. En algunos casos, una población de células comprenderá más de una mutación. En tales casos, las mutaciones pueden estar en subpoblaciones de células solapantes o no solapantes.

En algunos casos, se identifica que un paciente tiene una característica de CD19 que reduce la capacidad de CD19 para interactuar con un inhibidor de CD19, tal como una célula que expresa CAR CD19. Tal característica puede ser, p. ej., una mutación de cambio de marco, un codón de parada prematuro, una alteración en la secuencia de ácido nucleico o una alteración en la estructura del transcrito de ARNm primario. La característica puede ser, p. ej., una desviación de la producción normal de CD19 que se produce antes del corte y empalme. La característica puede ser, p. ej., una característica distinta de la omisión de exón. Dichos pacientes pueden tratarse con un inhibidor de otra diana, p. ej., un inhibidor de linfocitos B, por ejemplo, una célula que expresa CAR dirigida contra otro epítopo, p. ej., un epítopo dentro de uno o más de CD10, CD20, CD22, CD34, CD123, FLT-3 o ROR1.

En algunos casos, se identifica que un paciente tiene una característica de CD19 que reduce la capacidad de CD19 para interactuar con un inhibidor de CD19, tal como una célula que expresa CAR CD19, pero no reduce ni anula la capacidad de CD19 para interactuar con un segundo inhibidor de CD19, tal como un inhibidor de CD19 que se une a una región diferente en CD19. Una característica de este tipo puede ser, p. ej., una mutación que no provoque una mutación de desplazamiento del marco de lectura o un codón de parada prematuro, o ambos. Tal característica puede ser, p. ej., una alteración en la secuencia de ácido nucleico o una alteración en la estructura del transcrito de ARNm primario, una desviación de la producción normal de CD19 que ocurre antes del corte y empalme, o una característica distinta a la omisión de exón. Dichos pacientes pueden tratarse con un inhibidor de CD19, p. ej., un inhibidor de linfocitos B dirigido contra una región intacta de CD19, p. ej., una porción de tipo silvestre de CD19. Por ejemplo, si hay una mutación en el exón 2, el segundo inhibidor de CD19 puede unirse a un exón distinto del exón 2, o una parte del exón 2 que carece de la mutación. El segundo inhibidor de CD19 puede ser, p. ej., un inhibidor de CD19 descrito en el presente documento.

IDENTIFICACIONES DE T_{EF} Y T_{REG}

Los métodos del presente documento pueden incluir etapas para determinar una identificación de T_{REG} o determinar los niveles de linfocitos T_{EF} o linfocitos T_{REG}, p. ej., en un paciente o en una población de células, p. ej., células inmunitarias. Los métodos del presente documento también pueden incluir etapas para reducir el nivel de linfocitos T_{REG}, o la disminución de una identificación de T_{REG}, en un paciente o en una población de células. En algunos casos, un T_{EF} es una célula con expresión regulada al alza de uno o más (p. ej., al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o todos) de los siguientes genes: AIM2, ALAS1, B4GALT5, BATF, C3orf26, C4orf43, CCL3, CCL4, CCT3, CCT7, CD40LG, CHAC2, CSF2, CTNNA1, EBNA1BP2, EDARADD, EEF1E1, EIF2B3, EIF2S1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GFOD1, GLRX2, HSPD1, HSPE1, IFNG, IL15RA, IL21, IL2RA, IL3, KCNK5, KIAA0020, LARP4, LRP8, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MTCH2, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, OTUD7B, PAM, PDIA6, PEA15, PFKM, PGAM1, PGAM4, PPIL1, PRDX4, PRSS23, PSMD1, PSMD11, PSMD14, PTRH2, PUS7, RBBP8, RPF2, RPP25, SFXN1, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SORD, SPR, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TMCC2, TMEM165, TNFRSF9, TXN, TXNDC5, UCK2, VDR, WDR12, YWHAG y ZDHHC16. En algunos casos, un linfocito T_{REG} es una célula con expresión regulada al alza de uno o más (p. ej., al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 o todos) de los siguientes genes: AIM2, ALAS1, BATF, C5orf32, CCL17, CD40LG, CHAC2, CSF1, CTSL1, EBNA1BP2, EDARADD, EMP1, EPAS1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GCLM, GK, GPR56, HMOX1, HSPD1, HSPE1, IKBIP, IL10, IL13, IL15RA, IL1RN, IL2RA, IL3, IL4, IL5, IL9, KCNK5, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, PANX2, PDIA6, PGAM4, 2005; PPIL1, PPPDE2, PRDX4, PRKAR1B, PSMD1, PSMD11, PUS7, RBBP8, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TNFRSF11A, TNFRSF1B, TNFRSF8, TNFRSF9, TXN,. UCK2, VDR, VTRNA1-3, WDR12, YWHAG, ZDHHC16 y ZNF282. La expresión regulada al alza puede medirse, p. ej., 16 horas después de la estimulación. La expresión regulada al alza puede determinarse, p. ej., midiendo los niveles de ARN para los genes indicados.

Composiciones y tratamientos farmacéuticos

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender, en algunos aspectos, una célula que expresa CAR, por ejemplo, una pluralidad de células que expresan CAR, de acuerdo con las reivindicaciones, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención están en un aspecto formuladas para administración intravenosa.

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

En una realización, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de, por ejemplo, no hay niveles detectables de un contaminante, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en endotoxina, micoplasma, lentivirus competente para la replicación (RCL), p24, ácido nucleico VSV-G, gag del VIH, perlas recubiertas anti-CD3/anti-CD28 residuales, anticuerpos de ratón, suero humano agrupado, albúmina de suero bovino, suero bovino, componentes de medios de cultivo, componentes de plásmidos o células de empaquetamiento de vectores, una bacteria y un hongo. En una realización, la bacteria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en Alcaligenes faecalis, Candida albicans, Escherichia coli, Haemophilus influenza, Neisseria meningitides, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia y Streptococcus pyogenes grupo A.

Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y condición del paciente (sujeto). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende las células, por ejemplo, las células T descritas en este documento, se puede administrar en una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, en algunos casos de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de esos rangos. En algunas realizaciones, las células, por ejemplo, las células T, se pueden administrar a 3×10^4, 1×10^6, 3×10^6 o 1×10^7 células/kg de peso corporal. Las composiciones celulares también se pueden administrar múltiples veces a estas dosis. Las células se pueden administrar utilizando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, p. ej., Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988).

En algunas realizaciones, una dosis de células CAR comprende aproximadamente 1×10^5, 2×10^5, 5×10^5, 1×10^6, $1{,}1 \times 10^6$, 2×10^6, $3{,}6 \times 10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1{,}8 \times 10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, o 5×10^8 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR comprende al menos aproximadamente 1×10^5, 2×10^5, 5×10^5, 1×10^6, $1{,}1 \times 10^6$, 2×10^6, $3{,}6 \times 10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1{,}8 \times 10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, o 5×10^8 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR comprende hasta aproximadamente 1×10^5, 2×10^5, 5×10^5, 1×10^6, $1{,}1 \times 10^6$, 2×10^6, $3{,}6 \times 10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1{,}8 \times 10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, o 5×10^8 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR comprende aproximadamente $1{,}1 \times 10^6$ - $1{,}8 \times 10^7$ células/kg o aproximadamente 8×10^5 - $1{,}5 \times 10^6$ células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR comprende aproximadamente 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9, o 5×10^9 células. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR comprende al menos aproximadamente 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9, o 5×10^9 células. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR comprende hasta aproximadamente 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9, o 5×10^9 células.

En determinados aspectos, se puede desear administrar células activadas, p. ej., linfocitos T o linfocitos NK, a un sujeto y después volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células de la misma según la presente divulgación y reinfundir el paciente con estas células activadas y expandidas. Este procedimiento se puede realizar varias veces cada pocas semanas. En determinados aspectos, las células, p. ej., linfocitos T o linfocitos NK, pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cm^3 a 400 cm^3. En determinados aspectos, las células, p. ej., linfocitos T o linfocitos NK, se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cm^3, 30 cm^3, 40 cm^3, 50 cm^3, 60 cm^3, 70 cm^3, 80 cm^3, 90 cm^3 o 100 cm^3.

La administración de las composiciones objeto puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo mediante inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (iv) o intraperitoneal. En un aspecto, las composiciones de células, p. ej., composiciones de linfocitos T o linfocitos NK, de la presente invención se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En un aspecto, las composiciones celulares, p. ej., composiciones de linfocitos T o linfocitos NK, de la presente invención

se administran mediante inyección i.v. Las composiciones de células, p. ej., composiciones de linfocitos T o linfocitos NK, pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

En un aspecto ejemplar particular, los sujetos pueden someterse a leucocitaféresis, en donde los leucocitos se recolectan, enriquecen o agotan ex vivo para seleccionar y/o aislar las células de interés, por ejemplo, células T. Estos aislamientos celulares, por ejemplo, aislamientos de células T o células NK, se pueden expandir mediante métodos conocidos en la técnica y tratar de manera que se puedan introducir uno o más constructos CAR de la invención, creando así una célula que exprese CAR, por ejemplo, una célula T CAR de la invención. Los sujetos que lo necesiten pueden posteriormente someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de un trasplante de células madre de sangre periférica. En determinados aspectos, después o simultáneamente con el trasplante, los sujetos reciben una infusión de células que expresan CAR expandidas de la presente invención. En un aspecto adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosis de los tratamientos anteriores que se administrarán a un paciente variará según la naturaleza precisa de la afección que se esté tratando y el receptor del tratamiento. El escalado de dosis para administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para un agente terapéutico, p. ej., un anticuerpo, p. ej., CAMPATH, por ejemplo, puede estar, p. ej., en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, p. ej., administrado diariamente durante un periodo entre 1 y 30 días. La dosis diaria adecuada es de 1 a 10 mg al día, aunque en algunos casos se pueden utilizar dosis mayores de hasta 40 mg al día (descritas en la Patente de los EE. UU. n.º 6.120.766).

En una realización, el CAR se introduce en células, por ejemplo, células T o células NK, por ejemplo, utilizando transcripción in vitro, y el sujeto (por ejemplo, humano) recibe una administración inicial de células que expresan CAR, por ejemplo, células T CAR de la invención, y una o más administraciones posteriores de las células que expresan CAR, por ejemplo, células T CAR de la invención, en el que una o más administraciones posteriores se administran menos de 15 días, por ejemplo, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días después de la administración anterior. En una realización, se administran más de una administración de las células que expresan CAR, por ejemplo, las células T CAR de la invención al sujeto (por ejemplo, un ser humano) por semana, por ejemplo, se administran 2, 3 o 4 administraciones de las células que expresan CAR, por ejemplo, las células T CAR de la invención por semana. En una realización, el sujeto (p. ej., un sujeto humano) recibe más de una administración de células que expresan CAR, p. ej., linfocitos CAR T por semana (p. ej., 2, 3 o 4 administraciones por semana) (también denominado en el presente documento ciclo), seguido de una semana sin células que expresan CAR, p. ej., administraciones de linfocitos CAR T, y luego se administran una o más administraciones adicionales de células que expresan CAR, p. ej., linfocitos CAR T (p. ej., más de una administración de las células que expresan CAR, p. ej., linfocitos CAR T por semana) al sujeto. En otra realización, el sujeto (p. ej., sujeto humano) recibe más de un ciclo de células que expresan CAR, p. ej., linfocitos CAR T y el tiempo entre cada ciclo es inferior a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días. En una realización, las células que expresan CAR, p. ej., linfocitos CAR T se administran en días alternos para tener 3 administraciones a la semana. En una realización, las células que expresan CAR, p. ej., linfocitos CAR T de la invención se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

En algunas realizaciones, los sujetos pueden ser sujetos adultos (es decir, mayores de 18 años). En determinadas realizaciones, los sujetos pueden tener una edad de entre 1 y 30 años. En algunas realizaciones, los sujetos tienen una edad de 16 años o más. En determinadas realizaciones, los sujetos tienen una edad de entre 16 y 30 años. En determinadas realizaciones, los sujetos son sujetos infantiles (es decir, entre 1 y 18 años de edad).

En un aspecto, las células que expresan CAR, p. ej., CART, se generan usando vectores víricos lentivíricos, tales como lentivirus. Las células que expresan CAR, p. ej., los CART generados de esa manera tendrán una expresión de CAR estable.

En un aspecto, las células que expresan CAR, p. ej., CART, se generan usando un vector vírico tal como un vector gammarretrovírico, p. ej., un vector gammarretrovírico descrito en el presente documento. Los CART generados utilizando estos vectores pueden tener una expresión CAR estable.

En un aspecto, las células que expresan CAR, p. ej., CART, expresan transitoriamente vectores de CAR durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días después de la transducción. La expresión transitoria de CAR se puede efectuar mediante el suministro del vector de ARN de CAR. En un aspecto, el ARN de CAR se transduce en la célula, p. ej., linfocito NK o linfocito T, mediante electroporación.

Un problema potencial que puede surgir en pacientes que están siendo tratados con linfocitos CAR T que expresan de manera transitoria (particularmente con ScFv murinos que portan CART) es la anafilaxia después de múltiples tratamientos.

Sin limitarnos a esta teoría, se cree que dicha respuesta anafiláctica podría ser causada por un paciente que desarrolla una respuesta humoral anti-CAR, es decir, anticuerpos anti-CAR que tienen un isotipo anti-IgE. Se cree

que las células productoras de anticuerpos de un paciente experimentan un cambio de clase del isotipo IgG (que no causa anafilaxia) al isotipo IgE cuando hay una pausa de diez a catorce días en la exposición al antígeno.

Si un paciente tiene un alto riesgo de generar una respuesta de anticuerpos anti-CAR durante el curso de una terapia CAR transitoria (como las generadas por las transducciones de ARN), las pausas en la infusión de CART no deben durar más de diez a catorce días.

Anticuerpos de CD19 y CAR

Humanización del anticuerpo anti-CD19 murino

Se desea la humanización del anticuerpo murino CD19 para el entorno clínico, donde los residuos específicos de ratón pueden inducir una respuesta de antígeno humano anti-ratón (HAMA) en pacientes que reciben tratamiento con CART19, es decir, tratamiento con linfocitos T transducidos con la construcción CAR19. La producción, caracterización y eficacia de las secuencias de CAR CD19 humanizadas se describen en la solicitud internacional WO2014/153270, incluidos los ejemplos 1-5 (págs. 115-159), por ejemplo, las tablas 3, 4 y 5 (págs. 125-147).

Construcciones CAR, p. ej., construcciones CAR CD19

De las construcciones CD 19 CAR descritas en la Solicitud Internacional WO2014/153270, se reproducen aquí ciertas secuencias. Se entiende que las secuencias de esta sección también se pueden utilizar en el contexto de otros CAR, por ejemplo, CAR CD10, CAR CD20, CAR CD22 (como en la invención), CAR CD34, CAR CD123, CAR FLT-3, CAR ROR1, CAR CD79b, CAR CD179b o CAR CD79a.

Las secuencias de los fragmentos scFv humanos (SEQ ID NO: 1-12) se proporcionan a continuación en la Tabla 2. Las construcciones CAR completas se generaron usando las SEQ ID NO: 1-12 con secuencias adicionales, las SEQ ID NO: 13-17, que se muestran a continuación, para generar construcciones CAR completas con las SEQ ID NO: 31-42.

- Líder (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 13)

MALPVTALLLPLALLLHAARP

- **Líder (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 54)**

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAG
ACCC

- Bisagra de CD8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 14)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

- **Bisagra de CDS (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 55)**

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCC
TGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGG
GCTGGACTTCGCCTGTGAT

- Transmembrana de CD8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 15)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

- **Transmembrana (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 56)**

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATC
ACCCTTTACTGC

- Dominio intracelular de 4-1BB (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 16)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

- **Dominio intracelular de 4-1BB (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 60)**

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC
AAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAG
GATGTGAACTG

- Dominio de CD3 zeta (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 17)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

- CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 101)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAG
CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGAC
GTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC
TGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAA
AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCC
ACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

- **Dominio de CD3 zeta (secuencia de aminoácidos; secuencia de referencia de NCBI NM_000734.3) (SEQ ID NO:43)**

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

- CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico; Secuencia de Referencia NCBI NM 000734.3); (SEQ ID NO: 44)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

Dominio CD28 (secuencia de aminoácidos, SEQ ID NO: 1317)

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

Dominio de CD28 (secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO: 1318)

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCG
CCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTT
CGCAGCCTATCGCTCC

Dominio ICOS de tipo silvestre (secuencia de aminoácidos, SEQ ID NO: 1319)

TKKKYS S S VHDPNGE YMFMR A VNT AK K SRLTD VTL

Dominio ICOS de tipo silvestre (secuencia de nucleótidos, SEQ ID NO: 1320)

ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTT
CATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA

Dominio ICOS mutante de Y a F (secuencia de aminoácidos, SEQ ID NO: 1321)

TKKKYSSSVHDPNGEFMFMRAVNTAKK SRLTD VTL

Bisagra IgG4 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 102)

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM

Bisagra de IgG4 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 103)

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGGACC
CAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCG
AGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTC
AATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACG
GCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAAC
CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGC
CAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGA
CCACCCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTG
GACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCC
TGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

Todos estos clones contenían un cambio de residuo Q/K en el dominio de señal del dominio coestimulador derivado de 4-1BB.

Tabla 2: Construcciones de CAR CD19 humanizadas

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
Dominio scFv de CAR1	1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT
		SRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS

Nombre	SEQ ID	Secuencia
103101 CAR1 Soluble scFv - nt	61	atggcctccccgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgcc tcggccgaaattgtgatgacccagtctccgccaccttcttagcctttcaccccggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaaacccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggaqtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttgggctctgagactacttactactctcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggcttactgggacagggtactctggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101 CAR1 Soluble scFv - aa	73	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscraaqdiskylnw yqqkpggaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirqppgkglewigvigsettyyssalksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycakhyyygsyamdywgqgtlvtvssHHHHHHHH

Nombre	SEQ ID	Secuencia
104875 CAR 1-Completo - nt	85	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccctctggctcttctgctccacgccgcc tcggccctgaaattgttgatgacccagtcaccctccctcactcttagccttccaccctgtg agcgccgcaaccctgtcttgcagagccatcccaagacatctcaaaatacattaattgg tatcaccagaagccccctgaccaggttccttcgccttctgatctaccacaccagccctct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttgctgtctatttctgtcagcaagggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccagaaa gcggaccgggtctttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtcctccccgattacggggtgtctttggatccagacagccaccgggggaaggg tctggaatggattggagtgatttgggctctgagactacttactctttctcct tcaagtcagcgtcaccatctccaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgtcaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcggtagctacgcaatggattactgggtcagggtacttctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgaggccaccccaccccggctcctaccatcgcctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtgggccgtgca taccccgggctcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta
		cttgcgggtcctgctgctttcactgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggaccctgaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104875 CAR 1-Completo - aa	31	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqapatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpggaptlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltissleqpedfavyfcggg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyysssslksrvtiskdnsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssttkpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllislvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse igmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 2		
Dominio scFv de CAR2	2	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrihs gipardfsgsgsgtdytltissleqedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggs gggsgggggsgggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkgle wigviwgsettyygsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvss
103102 CAR2-Soluble scFv - nt	62	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccaagccgc tcggccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgccgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagcatctcaaaatacctaattggt tatcaacagaagccgggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactcaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggttcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggsgtgtcttctccccgattacgggggtgtcttggatcagacagccaccgggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcggtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtacttctggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103102	74	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw
CAR2-Soluble scFv - aa		yqqkpgqaprlliyhtsrihsgipardfsgsgsgtdytltissleqedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgggsgggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqssiksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssnhhhhhhhh

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 2 104876 - Completo - nt	86	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaaattgtgatgacccagtctccccgccacccttagcctttccaccccgtg agcgccgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagccatctccaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccatttctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttgctgtcttatttctgtcagcaagggg aacaccctgcctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctcttccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgaggccaccccaccccggctcctacccatcgcctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtgggccgtgca taccccgggttcttgacttgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctgtta cttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtcagactactca agaggaggaggcggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggaccctgaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcacagccacaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104876 CAR 2-Completo - aa	32	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqapatlslspgeratlscraagdiskylnw yqqkpggaprllihhtsrlhsgiparfsgsggsgtdytltisslqpedfavyfcggg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqssiksrvtiskdnsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssatttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr khllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse igmkgerrrghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

CAR 3		
CARS Dominio scFv	3	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssgggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscraseqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcq qgntlpytfgqgtkleik
103104 CAR 3-Soluble scFv - nt	63	atggctctgccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tccgccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtcctggtgaagcctctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggaggtgtccctcccagactacggagtgagc tggattaggcagcctccagggaaagggcttggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactattccatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaaqaatcaagtgagcctcaagctctccatcagttcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggaggggtctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccgaaattgtgatgacccagagcctgcaaccctgtcc ctttctcccgggggaacgggctaccctttctttgtcgggcatcaacaagatatctcaaa atcctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccttaggcttctttatctacc acaacctctgcctgcatagcgggatttccgcacgctttagcgggtctggaagcggg acggactacactctgaccatctcatctccagccgaggacttgccgtctacttt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR 3-Soluble scFv - aa	75	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggggsggggsggggseivmtqspatls lspgeratlscraseqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikhhhhhhhh

104877 CAR 3-Completo - nt	87	atggctctgccccgtgaccgcgctcctcctgccgctggctctgctgcttcacgccgcc tccgccacaagtccagcttcaagaatcagggccctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctccccgactacggagtgagc tggattcgacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccactactattcatcttcccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccgaaattcgtgatgacccagagcccctgccaaccctgtcc ctttctcccgggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccctaggcttcttatctacc acacctctcgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagccccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacacctttggccagggcaccaagcttgaga tcaaaacgactactcccgctccaagccccaccccctgtcccccgaccatcgcctct cagccgctctccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtggggccgtgca
		tacccgggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcgggtcctgctgcttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgcccagcctacaagcagggccagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaaggggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104877 CAR 3 - Completo - aa	33	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvsipdygvs wirqppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvsagggsggggsggggsgggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgipsrfsgsgsg tdytltissleqedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikttpapzpptpaptiase qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfscsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayse gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 4		

Dominio scFv de CAR4	4	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyqssiksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsggggsgggggsgggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpggaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltissleqpedfavyfcq qgntlpytfgqgtkleik
CAR4 103106 - scFv soluble - nt	64	atggctctgccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tgccccagaagtccagcttcaagaatcagggcctggtacggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctccagactacggagtgagc tggattagacagcctccccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcttcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactacttatggaggctcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccgaaattgtgatgacccagagccctgccaccctgtcc cttctccccgggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagcccgggacaggccccctaggcttcttatctacc acaactctcgcctgcatagcgggattccccgcacgctttagcgggtctggaagcggg acagactacactctgaccatctcatctctccagcccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacacctttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103106 CAR4-Soluble scFv - aa	76	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqssiksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsgggggsgggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytltissleqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikhhhhhhhhh

104878 CAR 4 - Completo - nt	88	atggctctgccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgcc tcgccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actccaaagaatcaagtgagcctccaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccgaaatcgtgatgacccagagccctgccaaccctgtcc ctttctcccgggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatccacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccctaggcttcttatctacc acacctctcgcctgcatagcgggattcccgccacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagccccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaaccactactccgctccaaggccaccccaccccctgccccgaccatcgcctct cagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtgggccgtgca tacccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggccccctcggctggta cttgcgggggtcctgctgctttcactgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggtttccagaggaggaggaagccggctgcgaac tgcgcgtgaaatccagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccccaag aggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagctatagcgagatt ggtatgaaagggggaacgcagaagaggccaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
104878 CAR 4 - Completo - aa	34	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggggsgggggsggggseivmtqapatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgipariagsgsg tdytltissiqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleiktttpaprppтpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllislvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlyneinlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglyneiqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

CAR 5		
Dominio scFv de CAR5	5	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltissiqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggga ggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyysasikarvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789 CAR5 - scFv soluble - nt	65	atggcctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttctttcttccatgccgcc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagcccccgctaccctgtccctgtcacccggcg agagggcgaaccctttcatgcagggccagccaggtacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgcctgctgatctaccacaccagccgcct ccacagcggtatcccccgccagatttcccgggagcgggtctggaaccgactacaccc tcaccatctcttctctgcagcccgaggatttcgccgtctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacacctttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaaggaggcgg aggatcaggcggtggcggaagcggaggaggtggctcccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctg acttgtaccgtgtcccggtgtgagcctcccccgactacggagtctctggattcgcca gcctccgggaagggtcttgaatggattgggggtgatttgggatcagagactactt actactcttcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatcbgtgaccgccgctgaccacgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggaggggtcttatgctatggactactggggacaggga cctggtgactgtctctagccatccaccatcaccaccatcatcac
99789 CAR5 - scFv soluble -aa	77	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscraasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltissiqpedfavyfcqgg ntlpytfgqgtkleikgggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyysaslksrvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssHHHHHHHH

104879 CAR 5 - Completo - nt	89	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgcctggctcttctgctccacgccgcc tcggccgaaattgtgatgacccagtcaccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaacctgtcttgcagagcctccaagacatctcaaaatacctt aattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctgcctt ctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggacagactacaccc tcactatcagctcactgccgccagaggacttgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtggtcccggcggtggaggaagcggcggaggcgggagccagg tccaactccaagaaagcggacgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgtgcgggagtgtctcttcccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccgggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcacccgaggccaccccaccccggct
		cctaccatcgcctcccagccttgtcctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccgggctcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccccttctggctggtacttgcgggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccgagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcagggccagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagcgcgca gaaagaatcccaggagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcgaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaggaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccacaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104879 CAR 5 - Completo - aa	35	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc**rasqdiskyln**w yqqkpgqaprlliy**htsrlhs**gipardfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc**qqg** **ntlpyt**fgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslp**dygvs**wirqppgkglewig**viwgsettyysasika**rvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvssatttpaprppt pa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllislvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 6		

Dominio scFv de CAR6	6	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs gipsrfsgsgsgtdytltissleqedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikgggg ggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyyqssiksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99790 CAR6 - scFv soluble - nt	66	atggccctccctgctgaccgctctgctgctgcctctggcacttctttctccatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcg agagggccaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgcctgctgatctaccacaccagccgcct ccaccggtatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacaccc tcaccatctcttctctgcagccgaggatttcgccgtctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacacctteggtcaaggtaccaagctggagatcaagggaggcgg aggatcaggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggaccctgacttgtgaagccatcagaaaccctctcccrg acttgtaccgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgcca gcctccggggaagggtcttgaatggattggggtgatttggggatcagagactactt actaccagtcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagcrgtcatctgtgaccgccgatgaccaccgccgtgtactatty tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactgggggcagggga
		ccctggtgactgtctctagcatcaccatcaccaccatcatcac
99790 CAR6 - scFv soluble - aa	78	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgipsrfsgsgsgtdytltissleqedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikgggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqssiksrvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss**hhhhhhhh**

104880 CAR6-Completo - nt	90	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgcc tcggccgaaattgtgatgacccagtcaccccgccactcttagcctttcaccccgtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaatacctttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcgggatctgggaccgactcaccc tcactatcagcttcagtgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggaggcggagggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtccctcccgagttacgggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttgggggctctgagactactt actacaatcatccctcaagtcatcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatt cagtgtcactgaaactgtcatccgtgaccgcagccgcacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactgggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactacccccagcaccgaggccaccccaccccggct cctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtggggccgtgcatacccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccctctggctggtacttgcgggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgcgggtcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcagggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggcgaggacgggaccccgaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatcccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcgaa gcctatagcgagattggtatgaaagggggaacgcagaaggaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
104880 CAR6-Completo - aa	36	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc**rasqdiskylnw** yqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc**qqg** **ntlpyt**fgqgtkleikgggsggggsggggsggggsgqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslp**dygvs**wirqppgkglewig**viwgsettyygsslks**rvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvssatttpaprpptpa puiasqplsirpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae
		ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

CAR 7		
Dominio scFv de CAR7	7	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsetyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggggsggggsggggsgggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik
100796 CAR7-scFv soluble - nt	67	atggcactgcctgttactgccttctgctgcctctggccttcttcctgcatgccgccaggccccaagtccagctgcaagagtcaggaccctggactggtgaagccctctgagactctctcactgacttgtaccgtctccgggggtccatcccccgactacggagtgtcatggatccgccaacctccagggaagggcttgaatggattggtgtcatctgggggttctgaaaccacctactactccatcttcctgaagtccagggtgaccatcagcaaggatattccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgccgtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattgggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggaggtctggaggtggaggacccggtggtggtggtcaggcggaggaggaggcgagattgtgatgactcagtccccagccacctttctctttccacccggcgagagagccaaccctgagctgtagagccagccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccgggcaggccccctcgcctcctgatctaccatacctccacgcctttcactctggtatcccccgctcggtttagcggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaagatttgcagtgtatttctgccagcagggcaatacccttccttcacacctttcggtcaggaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccaccat
CAR7 100796 - scFv soluble - aa	79	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggggsggggsggggsgggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikhhhhhhhh

104881 CAR 7 Completo - nt	91	atggctctgccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggsgtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttgyggtag cgaaaccactactattcatcttccctgaagtcacgggtccaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacacggcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggaggcggtggaggtggctcggaggtggcggaagcgaaatcgtgatgacccagagc cctgcaaccctgtcccttttctccggggaacgggctacccttttcttgtcgggcatc acsagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccta ggcttcttatctaccacacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccgagga cttcgccgtctacttctgccagcagggtaacacccctgccgtacacccttcggccagg
		gcaccaagcttgagatcaaaagccactactcccgctccaaggccacccccccctgcc ccgaccatcgcctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtgggccgtgcataccccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccccttggctggtacttgcggggtcctgctgtttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtccgyaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagccgcagatgctccagcctac aagcagggycagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggatamgatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg cctgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
CAR 7 104881 Completo - aa	37	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp**dygvs** wirqppgkglewig**viwgsettyyssslks**rvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvssgggggsgggggsgggggsgggggseivmtqs patlslspgeratlsc**rasqdiskyln**wyqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfs gsgsgtdytltissiqpedfavyfc**qqgntlpyt**fgqgtkleikttppaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvillslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkpqrrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 8		

Dominio scFv de CAR8	8	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyqssiksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqi iskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltislqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleik
100798 CARS-scFv soluble - nt	68	atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaggccccggactggtgaagccgtctgagg actctctcactgattgtaccgtcagcgggtgtcctccccgactacggagtgtcc tggatccgccaacctccagggaaagggcttgaatggattggtgttcatctgggttc tgaaaccacctactccagtcttccctgaagtccagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctggtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggagggagcgagattgtgatgactcagtcc ccagccaccctttctctttccaccgggcgagagccaccctgagctgtagagccag ccaggccatttctaagtacctccaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccccc gcctcctgatctaccatacctccacgccttccactctggtatccccgctggtttagc ggatccggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga
		ttcgcagtgtatttctgccagcagggcaataccctccttacacctteggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcgaccatcaccatcatcaccac
100798 CARS-ScFv soluble - aa	80	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqssiksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggaprlliyhtsrlhsgiparfs gsgsgtdytltislqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtrleikhhhhhhhhh

104882 CAR 8 - Completo - nt	92	atggctctgccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgcc tgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaaqccatctgaga ctctgtcctcacttgcaccgtgagcggagtgtcctccrcagaytacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttgggqtag cgaaaccactttactatcaatcttcccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcacgccgctgacaccgcc gtgcattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctccggaggcggtgggtcagaaatcgtgatgacccagagc cctgccaaccctgtcccttttctccrgggqaacgggctacccttttctgtcgggcatc acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccta ggcttcttatctaccacacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagc gggtctggaagcgggagccgactacactctgaccatctcatctctccagccrgagga cttgccgtctacttctgccagcagggtaacacccttgccgtacacctteggccagg gcaccaagcttgagatcaaaacgacbactcccgctccaaggccacccacccctgcc ccgaccatcgcctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagc tggtgggqccgtgcatacccgggqtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg cccctctggctggtacttgccgggqtcctgctgctttcactctgtatcactctttac tgtaagcgcggtccggaagaagctgctgtacatcrttaagcaacccttcatgaggcc tgtgccagactactcaagaggaggacggctgttccatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgccgctgaaattcagccgcagccgcagatgctccagcctac aagcagggqcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtccggagcgaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccctgaaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatcccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcgaga gcctatagcgagattggtatgaaaggcgaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgccctcgg
104882 CAR 8 - Completo - aa	38	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp**dygvs** wirqppgkglewig**viwgsettyyqsslks**rvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycak**hyyyggsyamdy**wgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlsc**rasqdiskyln**wyqqkpgqaprlliy**htsrlhs**giparfs gsgsgtdytltissiqpedfavyfc**qqgntlpyt**fgqgtkleikttppaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvillslvitly ckrgrkhllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay
		kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR 9		

Dominio scFv de CAR9	9	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs gipsrfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggs ggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyynsalksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
CAR9 99789 - scFv soluble - nt	69	atggccctccctgctgaccgctctgctgctggccctctgcctgcttctttatccatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccagagccccgctaccctgtccctgtcacccggcg agagggccaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgcctgctgatctaccacaccagcggcct ccctgcggtatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactaccctc tcaccatctcttctgcagccgaggatttgccgtctatttctgccagcagggg aatacccgccgtacacctttggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcgg aggatcaggcggtggcggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggacccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctg acttgtaccgtgtccggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgcca gcctccggggaagggtcttgaatggattggggtgatttggggatcagagactactt actacaattcatcactttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattg tyccaaacattactattacggaggggtcttatgctatggactactgggacaggggа ccctggtgactgtctctagcgccatcaccatcaccaccatcatcac
CAR9 99789 - scFv soluble - aa	81	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikgggsggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsalksrvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvsshhhhhhhh

105974 CAR 9 - Completo - nt	93	atggccctccctgtcaccgccctgctgcctctggctcttctgctccacgccgcc tcggccccgaaattgtgatgacccagtcaccccgccactcttagcctttcaccccggtg agccgcgcaatcctgtcttgcagaggctcccaagacatctcaaaatacctttaattggt atcaacagaagccccggacaggctcctagccttctgatctaccacaccagccccgtct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggg aacaccctgcctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagcggaggcggtggtggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctccgccgattacgggtgtcttggatcagaca gccaccgggaaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actccaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaggacaactctaagaat caggtgtcactgtgaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg
		cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactgggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggct cctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tggtggggccgtgcataccaggggtcttgacttcgcctgcgatatctacattggg cccctctggctggtacttgcgggtcctgctgctttcactgtgatcactttttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcc tgtcagactactcaagaggaggacggctgttccatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcagggccagaaccagctctacaacgaactcaatctaggtcggagaggaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcggcgaagcccgcga gaaagaatcccaagaggggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaggacaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
105974 CAR 9 - Completo - aa	39	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqsparlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgipsrfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqgg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpseslsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewlgviwgsettyynsalksrvtiskdnskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssatttpaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeaggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR10		

Dominio scFv de CAR10	10	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyynsalksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsgggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqd iskylnwyqqkpggaprliiyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgggtkleik
100796 CAR10 - soluble en scFv - nt	70	atggcactgcctgtcactgcctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaggacctggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaccgtctcagcgggtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctccctgggaaagggcttgaatggattggtgtcatctgggggttc tgaaaccacctactacaactcttccctgaagtccagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagcctgaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggagggagcgagattgtgatgactcagtcc ccagccaccctttctctttccaccgggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccgggycaggcccctc gcctcctgatctaccatacctcacgcttcactcggtatccccgctggtttagc
		ggatcaggatctggtaccgactacaactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgccagcagggcaatacccttcctttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccaccat
100796 CAR10 - scFv soluble - aa	82	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyynsalksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggggsggggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpggaprliiyhtsrlhsgiparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik**hhhhhhhh**

105975 CAR 10 Completo - nt	94	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccctctggctcttctgctccacgccgcc tcggccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccccgtg agcgcgcaacccctgtcttgccgagcctcccaagacatctcaaaatacctttaattgg tatcaacagaagccccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttgcctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtcccggcggtggaggaagcggaggcggtgggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctcccccgattacggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattgggagtgatttggggctctgagactactt actacaactccatcccttcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcggagctacgcaatggattactgggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggct cctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagc tggtggggccgtgcataccccgggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg ccccttgggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttccatgccggttccccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagccgcagatgctccagcctac aagcagggccagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagaggaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcagaaggaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgccctcgg	
CAR 10 105975 Completo - aa	40	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNW YQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG NTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNSKN QVSLRLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPA
		PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKFRRRNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

CAR11		
Dominio scFv de CAR11	11	eivmtqspatislspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs gipsrfsgsgsgtdytltissiqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggs ggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkgle wigviwgsettyynssikarvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg gsyamdywgqgtlvtvss
CAR11 103101 - scFv soluble - nt	71	Atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggccgaaattgtgatgacccagtcacccgccsctcttagcctttccaccgggtg agcgcgccaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctcaaaatacctaaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagcggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtcgggcggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctccccccgattacgggtgtcttggatcagacagccaccgggaaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactacaattcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa atgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccsgccaccaccatcatcaccatcaccat
CAR11 103101 - scFv soluble - aa	83	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatislspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgipsrfsgsgsgtdytltissiqpedfavyfcqgg ntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsgqvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynssikarvtiskdnsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvsshhhhhhhh

105976 CAR 11 Completo - nt	95	atggctctgccgtgaccgcactcctcctgccttgctggctctgctgcttcacgccgcc tcgcccagcaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctccgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttgggggtag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtcaagggtcaccatttcaaaggata actccaaagaatcaagtgagcctccaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg gaggcggtggaggtggctccggaggtggcggaagcgaaatcgtgatgacccagagc cctgccaaccctgtccctttctccccgggaacgggctaccctttcttgtcgggcatc
		acgagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccccta ggcttcttatctatgccacacctctgcctgtcatagcgggattcccgcacgctttagc gggtctggaagcggyaccgactacactctgaccatctcatctctccagccgaggaa cttgccgtctactttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaacgactactcccgctccaaggccaccccacccctgcc ccgaccatcgcctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagc tggtgggccgtgcatacccgggggtctgacttcgcctgcgatatctacatttgggg cccctctggctggtacttgcgggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggctccagaggaggaggg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagccgcagatgctccagcctac aagcagggccagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggaagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccccgagaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatcccccaggagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcgaaa gcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaaggaggcaaaggccacgacgg actgttaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg
CAR 11 105976 Completo - aa	41	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPSLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTA VYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQS PATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR12		

Dominio scFv de CAR12	12	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyynsalksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsggggsggggsgaivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtslhsgiparfsgsgsgtdytltissleqpedfavyfcq qgntlpytfgqgtkleik
103104 CAR12 - soluble en scFv - nt	72	atggctctgccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tgcccacgaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctccaggaaagggactggagtggatcggagtgatttgggggtag cgaaaccactactataactctttccctgaagtcaccgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg
		gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtggaggtggctcgagatcgtgatgacccagagccctgccaccctgtcc ctttctccaggggaacgggctgccctttctttgtcgggcatcacaagatatctcaaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggccctaggcttcttatctacc acacctctgcctgcatagcgggattccagcagctttagcgggtctgggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagccccgaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacacctttggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103104 CAR12 - scFv soluble - aa	84	**MALPVTALLLPLALLLHAARP**qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyynsalksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsgaivmtqspatls lspgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtslhsgiparfsgsgsg tdytltissleqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik**hhhhhhhhh**

CAR 12 105977 - Completo - nt	96	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccctctggctcttctgctccacgccgcc tcggccccgaaattgtgatgacccagtcacccgccactcttagcctttcaccccgtg agcgccaacccctgtcttgccagagcctcccaagacatctcaaaatacctttaattgg tatcaacagaagccccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcactatcagctcactgcagccagaggacttgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctggagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtggaggaagccaggtccaactccagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctcttcccgattacgggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttgggctctgagactacttactacaactcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctccaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgaggccccaccccccggctcctaccatcgcctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtgggccgtgca taccccgggtcttgacttgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttccccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaagggggaacgcagaagaggccaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg	
CAR 12 105977 - Completo - aa	42	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNW YQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG NTLPYTFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Tabla 3: Construcciones de CAR CD19 Murinas

CTL019		
CTL019-scFv soluble-etiqueta His - nt	97	Atggccctgccggtcaccgctctgctgctgccccttgctctgcttctttcatgcagc aaggccggacatccagatgacccaaaccacctcatccctctctgcctctcttggag acagggtgaccatttcttgtcgcgccagccaggacatcagcaagtatctgaactgg tatcagcagaagccggacggaaccgtgaagctcctgatctaccatacctctggcct gcatagcgggcgtgcccctcacgcttctctggaagcggatcaggaaccgattatttctc tcactatttcaaatcttgagcaggaagatattgccacctatttctgccagcagggt aataccctgccctacacctttcggaggagggaccaagctcgaaatcaccggtggagg aggcagcggcggtggaggctctggtggaggtggttctgaggtgaagctgcaagaat caggccctggacttgtggccccttcacagtccctgagcgtgacttgcaccgtgtcc ggagtctccctgccccgactacggagtgtcatggatcagacaacctccacggaaagg actggaatggctcggtgtcatctgggctagcgaaactacttactacaattcagccc tcaaaagcaggctgactattataaggacaacagcaagtcccaagtcttcttaag atgaactcactccagactgaccgacaccgcaatctactatgtgctaagcactacta ctacggaggatcctacgctatggattactggggacaaggtacttccgtcaccgtct cttcaccatcatcaccatcaccatcac
CTL019 - scFv soluble-soluble His - aa	98	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvkllihytsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitgggggsggggsggggsevklqesggglvqpgqslsvtctvs gvslpdygvswirqpprkglewlgvtwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflk mnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvsshhhhhhhh
CTL019 completo - nt	99	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgc caggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggag acagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaaattgg tatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagatt acactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctc tcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggt

		aatacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcggatctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcagggtctcattacccgactatggtgtaagctggattgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctcatccaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctatgctatggactactgggccaaggaacctcagtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgccttggccgggactttgtggggtcccttctcctgtcactggttatcaccctttactgcaaacgggggcagaaagaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc	
CTL019 Completo - aa	58	MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkllihytsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitgggsggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvssatttpaprppтpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CTL019	59	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkllihytsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitgggsggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtvss

mCAR1 scFv	109	QVQLLESGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVVDFYFDYW GQGTTVTGGGSGGGSGGGSGGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNV AWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQ YNRYPYTFGFSTKLEIKRPS
mCAR1	110	QVQLLESGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDG
Completo - aa		DTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSCARKTISSVVDFYFDYW GQGTTVTGGGSGGGSGGGSGGGSELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNV AWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQ YNRYPYTFGFSTKLEIKRPSKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPG PSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
mCAR2 scFv	111	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSE
mCAR2 CAR - aa	112	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSL LVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYEALHMQALPPRL

mCAR2 Completo - aa	113	DIQMTQTT SSLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYYNSAL KSRLTIIKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKFLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEGGCELKV KFSRSADAPA YQQGQNQLYN ELNLGRREEY DVLDKRRGRD PEMGGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS EIGMKGERRR GKGHDGLYQG LSTATKDTYD ALHMQALPPR LEGGGEGRGS LLTCGDVEEN PGPRMLLLVT SLLLCELPHP AFLLIPSRVC NGIGIGEFKD SLSINATNIK HFKNCTSISG DLHILPVAFR GDSFTHTPPL DPQELDILKT VKEITGFLLI QAWPENRTDL HAFENLEIIR GRTKQHGQFS LAVVSLNITS LGLRSLKEIS DGDVIISGNK NLCYANTINW KKLFGTSGQK TKIISNRGEN SCKATGQVCH ALCSPEGCWG PEPRDCVSCR NVSRGRECVD KCNLLEGEPR EFVENSECIQ CHPECLPQAM NITCTGRGPD NCIQCAHYID GPHCVKTCPA GVMGENNTLV WKYADAGHVC HLCHPNCTYG CTGPGLEGCP TNGPKIPSIA TGMVGALLLL LVVALGIGLF M
mCAR3 scFv	114	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK
		GLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
mCAR3 Completo - aa	115	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSG SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPL FPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada enumerada en la Tabla 2. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno comprende además una CDR1 LC, una CDR2 LC y una CDR3 LC. En

algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una LC CDR1, una LC CDR2 y una LC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera enumerada en la Tabla 2.

En algunos casos, el dominio de unión a antígeno comprende una, dos o todas las LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera enumeradas en la Tabla 2, y una, dos o todas las HC CDR1, HC CDR2. y HC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión a cadena pesada enumerada en la Tabla 2.

En algunos casos, las CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia o una combinación de los mismos.

Las secuencias de las secuencias de CDR humanizadas de los dominios scFv se muestran en la **tabla 4** para los dominios variables de cadena pesada y en la **tabla 5** para los dominios variables de cadena ligera. "ID" representa la SEQ ID NO respectiva para cada CDR.

Tabla 4. CDR de dominio variable de cadena pesada (Kabat)

Candidato	**FW**	**R1**	**ID**	**HCDR2**	**ID**	**CDR3H**	**ID**
murino_CART19		GVSLPDYGVS	**19**	VIWGSETTYYNSALKS	**20**	HYYYGGSYAMDY	**24**
humanizado_CART19 a	**VH4**	GVSLPDYGVS	**19**	VIWGSETTYYSSSLKS	**21**	HYYYGGSYAMDY	**24**
humanizado_CART19 b	**VH4**	GVSLPDYGVS	**19**	VIWGSETTYYGSSLKS	**22**	HYYYGGSYAMDY	**24**
humanizado_CART19 c	**VH4**	GVSLPDYGVS	**19**	VIWGSETTYYNSSLKS	**23**	HYYYGGSYAMDY	**24**

Tabla 5. CDR de dominio variable de cadena ligera

Candidato	**FW**	**LCDR1**	**ID**	**CDR2L**	**ID**	**CDR3L**	**ID**
murino_CART19		RASQDISKYLN	**25**	HTSRLHS	**26**	QQGNTLPYT	**27**
humanizado_CART19 a	**VK3**	RASQDISKYLN	**25**	HTSRLHS	**26**	QQGNTLPYT	**27**
humanizado_CART19 b	**VK3**	RASQDISKYLN	**25**	HTSRLHS	**26**	QQGNTLPYT	**27**
humanizado_CART19 c	**VK3**	RASQDISKYLN	**25**	HTSRLHS	**26**	QQGNTLPYT	**27**

Los fragmentos de scFv CAR se clonaron a continuación en vectores lentivíricos para crear una construcción de CAR completo en un único marco de codificación, y se utilizó el promotor EF1 alfa para la expresión (SEQ ID NO: 100).

Promotor EF1 alfa

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGT
CGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGC
CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGT
TTGCCGCCAGAACACAGCTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG
CGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG
GAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGCG
GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAA
TTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACT
GGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGG
GCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT
CGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGA
TGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGT
CACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCC
GTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCG
ATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGG
AATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCC
ATTTCAGGTGTCGTGA (SEQ ID NO: 100).

Construcciones CAR22: diseño y función

Se aislaron fragmentos variables monocatenarios anti-CD22 totalmente humanos. Los scFv anti-CD22 se clonaron en vectores de expresión de CAR lentivíricos con la cadena CD3zeta y la molécula coestimulante 4-1BB. Los plásmidos que contienen CAR se amplificaron mediante transformación bacteriana en células STBL3, seguida por Maxiprepr utilizando el kit Plasmid Maki de Qiagen sin endotoxinas. Se produjo sobrenadante lentivírico en células 293T utilizando técnicas convencionales.

Las secuencias de los CAR humanos se proporcionan a continuación en las Tablas 6A y 6B.

Todos estos clones contenían un cambio de residuo Q/K en el dominio de señal del dominio coestimulador derivado de la cadena CD3zeta.

Tabla 6A: Construcciones CAR CD22 humanas

Nombre	**SEQ ID**	Sequencias
m971 NT	200	gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgcccc gaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattga cgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactca ccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccata accatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagct aaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctga atgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgtt gcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatgg aggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgata aatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagc cctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagac agatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatat actttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcat gaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaa ggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctacc agcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcag agcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgt agcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagt cgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaa cgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagataccta cagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccg gtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctg gtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggg gggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctggcc ttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgag ctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcgg aagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggc acgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctca ctcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcgga taacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcgcgcaattaaccctcact aaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagtcttatgcaatactcttgtagtcttgca acatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccga ttggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatgga ttggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacataa acgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactg cttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggt aactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacag ggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaa gcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtgagtacgccaaaaattttgactagcg gaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatc gcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaatataaattaaaacatata gtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaa ggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttag atcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacacc aaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagca agcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattat ataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaagagaag agtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttcttgggagc agcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgt ctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgca

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		actcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaa aggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttt ggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaatcacacgacctggatggagtg ggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaacca gcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggttta acataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtttaag aatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagac ccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggag agagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgattagactgta gcccaggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagttatcttggtagcagttcat gtagccagtggatatatagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaaacagcat acttcctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtacatacagacaatggcagca atttcaccagtactacagttaaggccgcctgttggtgggcggggatcaagcaggaatttggcatt ccctacaatccccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaattata ggacaggtaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtacaaatggcagtattcatccac aattttaaaagaaaaggggggattgggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacata atagcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgg gtttattacagggacagcagagatccagtttggctgcatacgcgtcgtgaggctccggtgcccgt cagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaatt gaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctc cgccttttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttc gcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttt acgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccga gcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtg cttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgc ctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctg gcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcggg cggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcg gccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgc gccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgag cggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctc gggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtc gcttcatgtgactccactgagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgtgcttttgga gtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtgg agactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatc ttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagct ctagagccaccatggccctgcctgtgacagccctgctgctgcctctggctctgctgctgcatgcc gctagacccggatcccaggtgcagctgcagcagtctggacccggcctcgtgaagcctagcca gaccctgtctctgacctgcgccatcagcggcgatagcgtgtccagcaatagcgccgcctggaa ctggatcagacagagccctagcagaggcctggaatggctgggccggacctactaccggtcca agtggtacaacgactacgccgtgtccgtgaagtcccggatcaccatcaaccccgacaccagc aagaaccagttctccctgcagctgaacagcgtgacccccgaggataccgccgtgtactactgc gccagagaagtgaccggcgacctggaagatgccttcgacatctggggccagggcacaatgg tcaccgtgtctagcggaggcggaggatctggcggcggaggaagtggcggaggggatctgg gggaggcggaagcgatatccagatgacccagagccccagctccctgtctgccagcgtgggc gacagagtgaccatcacctgtagggccagccagaccatctggtcctacctgaactggtatcag cagcggcctggcaaggcccccaacctgctgatctatgccgccagctctctgcagtccggcgtg cccagcagattttccggcagaggctccggcaccgacttcaccctgacaatcagttccctgcagg ccgaggacttcgccacctactactgccagcagagctacagcatcccccagaccttcggccag gggaccaagctggaaatcaagtccggaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacacc ggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcg gggggcgcagtgcacacgaggggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttg gccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccctttactgcaaacggggcagaaag aaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatg gctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagc aggagcgcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaat ctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgg ggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagat aagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggg gcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacat gcaggccctgccccctcgctaagtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattga ctggtattcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgctgctttaatgccttgtatcatgctat tgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtgg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		cccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttgggg cattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccctccctattgccacggcggaa ctcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgt ggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgc gggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctg ccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccg cctccccgcctggaattcgagctcggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatc ttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaa gatctgcttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaa ctagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgt ctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagca gtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgag aggaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaat aaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctc tagctatcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatggctgactaatttttttta tttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttttg gaggcctaggcttttgcgtcgagacgtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctc actggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgc agcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttccca acagttgcgcagcctgaatggcgaatgggacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcg ggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgc tttcttcccttcctttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttta gggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgt agtgggccatcgccctgatagacggtttttcgcccctttgacgttggagtccacgttctttaatagtgg actcttgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttgatttataagggattttg ccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaa atattaacgcttacaatttaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttt ctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattga aaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttc ctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg
m971 VH	201	qvqlqqsgpg lvkpsqtlsl tcaisgdsvs snsaawnwir qspsrglewl grtyyrskwy ndyavsvksr itinpdtskn qfslqlnsvt pedtavyyca revtgdleda fdiwgqgtmv tvssastkgp svfplapssk stsggtaalg clvkdyfpep vtvswnsgal tsgvhtfpav lqssglysls svvtvpsssl gtqtyicnvs hkpsntkvdk kvepkscdkt sgqag
m971 VL	202	diqmtqspss lsasvgdrvt itcrasqtiw sylnwyqqrp gkapnlliya asslqsgvps rfsgrgsgtd ftltisslqa edfatyycqq sysipqtfgq gtkleikrtv aapsvfifpp sdeqlksgta svvcllnnfy preakvqwkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec
scFv CAR22-1 AA	203	qvqlvqsgggliqpggslrlscaasgftvssnymswvrqapgkglewvsviysggstyyadsv kgrftisrdnskntlylqmnslraedtavyycasqstpydssgyysgdafdiwgqgtmvtvssg gggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigsnyvywyqqlpgtapklliy rnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddslsgyvfgtgtkltvl
scFv CAR22-1 NT	204	caagtgcaactcgtccaatccggcggcggactgattcaaccaggaggttcccttagactctcat gtgccgctagcggattcactgtgtcctcaaactacatgagctgggtccgccaggcgcccggaa agggcctggaatgggtgtccgtgatctactcgggcggatcaacctactacgccgattccgtgaa ggggcggttcaccatctcgcgggataactccaagaacaccctgtacttgcaaatgaactcactg agggccgaagataccgccgtctactactgcgcgagccagtccactccctacgactcgagcgg gtactactccggggacgccttcgacatctggggacagggaactatggtcacggtgtcgtcggg aggaggggcagcggcggcggaggaagcgggggaggggttcgtcctatgtgctgaccca gccgccgagcgcctccgggactccgggccagcgcgtgaccatttcctgctccggctcctcatcc aacatcggttcgaattatgtgtactggtaccagcagctgcctggtactgcccctaagcttctcatct accggaacaaccagcgcccgtctggcgtgcccgaccggttctccggctcgaagtccggcacc agcgcctccctggctatctccgggctgagatccgaggatgaggccgactactattgcgcagcgt gggacgacagcctgtcgggatacgtgtttggaaccggaaccaagctcaccgtgctg
scFv soluble CAR22-1 NT	205	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaactcgtccaatccggcggcggactgattcaaccaggaggttcccttagactctcatgtgc cgctagcggattcactgtgtcctcaaactacatgagctgggtccgccaggcgcccggaaaggg cctggaatgggtgtccgtgatctactcgggcggatcaacctactacgccgattccgtgaagggg cggttcaccatctcgcgggataactccaagaacaccctgtacttgcaaatgaactcactgaggg ccgaagataccgccgtctactactgcgcgagccagtccactccctacgactcgagcgggtact actccggggacgccttcgacatctggggacagggaactatggtcacggtgtcgtcgggagga

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		gggggcagcggcggcggaggaagcgggggaggggggttcgtcctatgtgctgacccagccg ccgagcgcctccgggactccgggccagcgcgtgaccatttcctgctccggctcctcatccaaca tcggttcgaattatgtgtactggtaccagcagctgcctggtactgcccctaagcttctcatctaccg gaacaaccagcgcccgtctggcgtgcccgaccggttctccggctcgaagtccggcaccagcg cctccctggctatctccgggctgagatccgaggatgaggccgactactattgcgcagcgtggga cgacagcctgtcgggatacgtgtttggaaccggaaccaagctcaccgtgctgggatcgcacca ccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-1 AA	206	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgggliqpggslrlscaasgftvssnymswvrqapgkgle wvsviysggstyyadsvkgrftisrdnsknt lylqmnslraedtavyycasqstpydssgyysg dafdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigs nyvywyqqlpgtapklliyrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddsl sgyvfgtgtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-1 completo AA	207	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgggliqpggslrlscaasgftvssnymswvrqapgkgle wvsviysggstyyadsvkgrftisrdnsknt lylqmnslraedtavyycasqstpydssgyysg dafdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigs nyvywyqqlpgtapklliyrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddsl sgyvfgtgtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagt cgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-1 completo NT lentivirus	208	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaactcgtccaatccggcggcggactgattcaaccaggaggttcccttagactctcatgtgc cgctagcggattcactgtgtcctcaaactacatgagctgggtccgccaggcgcccggaaaggg cctggaatgggtgtccgtgatctactcgggcggatcaacctactacgccgattccgtgaagggg cggttcaccatctcgcgggataactccaagaacaccctgtacttgcaaatgaactcactgaggg ccgaagataccgccgtctactactgcgcgagccagtccactccctacgactcgagcgggtact actccggggacgccttcgacatctggggacagggaactatggtcacggtgtcgtcgggagga gggggcagcggcggcggaggaagcgggggaggggttcgtcctatgtgctgacccagccg ccgagcgcctccgggactccgggccagcgcgtgaccatttcctgctccggctcctcatccaaca tcggttcgaattatgtgtactggtaccagcagctgcctggtactgcccctaagcttctcatctaccg gaacaaccagcgcccgtctggcgtgcccgaccggttctccggctcgaagtccggcaccagcg cctccctggctatctccgggctgagatccgaggatgaggccgactactattgcgcagcgtggga cgacagcctgtcgggatacgtgtttggaaccggaaccaagctcaccgtgctgaccactacccc agcaccgaggccacccacccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccgga ggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatatct acatttgggccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgta agcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactac tcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactg cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctct acaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggac gggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgca gaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacc tatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-2 AA	209	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrglewlgrtyyrskwyndya vsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycardlgwiavagtfdywgqgtlvtvsssgggs ggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiyd vskrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssslnhvfgtgtkvtvl
scFv CAR22-2 NT	210	gaagtgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccatcccagactctcagcctgac gtgtgcgatcagcggggactctgtgtcctccaactccgccgcctggaactggattaggcagtcg ccgtcgagagggctggagtggttgggtagaacctactaccggtccaagtggtacaatgactac gccgtgtccgtgaagtcccggatcactattaacccggatacctcaaagaaccagttctccctgc aactgaactcggtgacccctgaggacaccgcagtgtactactgcgcccgggatctgggttggat cgctgtcgccggcaccttcgactattggggacagggcactctcgtgaccgtgtcgtcgggtgga ggagggagcggaggggcggaagcggtggcggcggttcccagtccgcgctgacccagcct gctagcgtgtccgggtcgcccggacagtcaatcaccatctcctgcactgggactagcagcgac gtgggcggctacaactacgtgtcatggtaccagcagcacccgggaaaggcgcccaagctgat gatctacgacgtgtccaagcgcccttcgggagtctccaaccgctttagcggctccaagtcgggc aacactgcctccctgaccattagcggactgcaggccgaagatgaggccgactattactgctcat cctacacctcctcctcactgaaccatgtgttcggcaccggaaccaaggtcacagtcctc

Nombre	SEQ ID	Sequencias
scFv soluble CAR22-2 NT	211	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccatcccagactctcagcctgacgtgt gcgatcagcggggactctgtgtcctccaactccgccgcctggaactggattaggcagtcgccgt cgagagggctggagtggttgggtagaacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccg tgtccgtgaagtcccggatcactattaacccggatacctcaaagaaccagttctccctgcaactg aactcggtgaccctgaggacaccgcagtgtactactgcgcccgggatctgggttggatcgctg tcgccggcaccttcgactattggggacagggcactctcgtgaccgtgtcgtcgggtggaggag ggagcggaggggcggaagcggtggcggcggttcccagtccgcgctgacccagcctgctag cgtgtccgggtcgcccggacagtcaatcaccatctcctgcactgggactagcagcgacgtggg cggctacaactacgtgtcatggtaccagcagcacccgggaaaggcgcccaagctgatgatct acgacgtgtccaagcgcccttcgggagtctccaaccgctttagcggctccaagtcgggcaaca ctgcctccctgaccattagcggactgcaggccgaagatgaggccgactattactgctcatccta cacctcctcctcactgaaccatgtgttcggcaccggaaccaaggtcacagtcctcggatcgcac caccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-2 AA	212	Malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrg lewlgrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycardlgwiavagtfd ywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvs wyqqhpgkapklmiydvskrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytsssln hvfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-2 completo AA	213	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrg lewlgrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycardlgwiavagtfd ywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvs wyqqhpgkapklmiydvskrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytsssln hvfgtgtkvtvlttttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtc gvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapayk qgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigm kgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-2 completo NT lentivirus	214	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccatcccagactctcagcctgacgtgt gcgatcagcggggactctgtgtcctccaactccgccgcctggaactggattaggcagtcgccgt cgagagggctggagtggttgggtagaacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccg tgtccgtgaagtcccggatcactattaacccggatacctcaaagaaccagttctccctgcaactg aactcggtgaccctgaggacaccgcagtgtactactgcgcccgggatctgggttggatcgctg tcgccggcaccttcgactattggggacagggcactctcgtgaccgtgtcgtcgggtggaggag ggagcggaggggcggaagcggtggcggcggttcccagtccgcgctgacccagcctgctag cgtgtccgggtcgcccggacagtcaatcaccatctcctgcactgggactagcagcgacgtggg cggctacaactacgtgtcatggtaccagcagcacccgggaaaggcgcccaagctgatgatct acgacgtgtccaagcgcccttcgggagtctccaaccgctttagcggctccaagtcgggcaaca ctgcctccctgaccattagcggactgcaggccgaagatgaggccgactattactgctcatccta cacctcctcctcactgaaccatgtgttcggcaccggaaccaaggtcacagtcctcaccactacc ccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccg gaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgata tctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagact actcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagct ctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagagga cgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaa cgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacac ctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-3 AA	215	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrglewlgrtyhrstwyddyass vrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgayycardrlqdgnswsdafdvwgqgtmvtvssgg ggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapkl miydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstpyvfgtgtqltvl
scFv CAR22-3 NT	216	gaagtgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccttcccaaactctctccctgacct gtgcgatctctggggattcggtgctgtcgaatagcgacacctggaactggatcagacagtcacc ctcccggggcctggagtggctcgggagaacttaccaccggtccacttggtacgacgactatgc cagctcagtgcgcggaagggtgtccattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgc agttgaacgctgtgaccccggaagataccggagcctactactgcgcccgcgaccggctgcag gacggaaactcctggtccgatgccttcgacgtctggggccagggaaccatggtcactgtgtcat

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ccggcggtggcggttcgggcggtggtggcagcggtggaggcggctcccagtcggcactgact cagccagcttcagtctccggctcgccgggacagtccatcaccatttcctgcactggaaccagct ccgatgtcgggggggtataactacgtgtcgtggtaccagcaacatcctggaaaggcccccaagc tcatgatctacgacgtgtccaatcgccctagcggagtgtcaaaccggttttccggctccaagtcc gggaacaccgcgtccctgacaatcagcggactgcaggccgaggacgaagccgactactact gctcgagctacaccagctcgtccacgccgtacgtgttcggaactgggacccagctgaccgtgct g
scFv soluble CAR22-3 NT	217	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccttcccaaactctctccctgacctgtg cgatctctggggattcggtgctgtcgaatagcgacacctggaactggatcagacagtcaccctc ccggggcctggagtggctcgggagaacttaccaccggtccacttggtacgacgactatgccag ctcagtgcgcggaagggtgtccattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagtt gaacgctgtgaccccggaagataccggagcctactactgcgcccgcgaccggctgcaggac ggaaactcctggtccgatgccttcgacgtctggggccagggaaccatggtcactgtgtcatccg gcggtggcggttcgggcggtggtggcagcggtggaggcggctcccagtcggcactgactcag ccagcttcagtctccggctcgccgggacagtccatcaccatttcctgcactggaaccagctccg atgtcgggggggtataactacgtgtcgtggtaccagcaacatcctggaaaggcccccaagctca tgatctacgacgtgtccaatcgccctagcggagtgtcaaaccggttttccggctccaagtccggg aacaccgcgtccctgacaatcagcggactgcaggccgaggacgaagccgactactactgct cgagctacaccagctcgtccacgccgtacgtgttcggaactgggacccagctgaccgtgctgg gatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-3 AA	218	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgayycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvgg ynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyt ssstpyvfgtgtqltvlgshhhhhhhh
CAR22-3 completo AA	219	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgayycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvgg ynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyt ssstpyvfgtgtqltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapl agtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeays eigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-3 completo NT lentivirus	220	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactccaacagagcggacccggacttgtgaaaccttcccaaactctctccctgacctgtg cgatctctggggattcggtgctgtcgaatagcgacacctggaactggatcagacagtcaccctc ccggggcctggagtggctcgggagaacttaccaccggtccacttggtacgacgactatgccag ctcagtgcgcggaagggtgtccattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcctgcagtt gaacgctgtgaccccggaagataccggagcctactactgcgcccgcgaccggctgcaggac ggaaactcctggtccgatgccttcgacgtctggggccagggaaccatggtcactgtgtcatccg gcggtggcggttcgggcggtggtggcagcggtggaggcggctcccagtcggcactgactcag ccagcttcagtctccggctcgccgggacagtccatcaccatttcctgcactggaaccagctccg atgtcgggggggtataactacgtgtcgtggtaccagcaacatcctggaaaggcccccaagctca tgatctacgacgtgtccaatcgccctagcggagtgtcaaaccggttttccggctccaagtccggg aacaccgcgtccctgacaatcagcggactgcaggccgaggacgaagccgactactactgct cgagctacaccagctcgtccacgccgtacgtgttcggaactgggacccagctgaccgtgctga ccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccc tgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgc ctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatca ctctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-4 AA	221	evqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkglewvsgiswnsgsigyads vkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakglsswhfhdaldiwgqgtmvtvssggggs

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviygknnr psgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhlwvfgggtkltvl
scFv CAR22-4 NT	222	gaagtgcagttggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaagatctctcagactctcgt gtgcggcctccggtttcaccttcgacgactacgccatgcattgggtcagacaggccccgggaa agggcctggagtgggtgtcaggcatctcatggaacagcggctccattggctacgccgactcgg tcaagggaaggttcactatctcccgggacaacgccaagaactccctgtacctccaaatgaaca gcctgcgcgccgaggatactgccctgtactactgcgccaaggggctgtccagctggcactttca cgacgcacttgatatctggggacagggtaccatggtcaccgtgtcctccggtggcggaggctca gggggaggaggaagcgggggcggtggttcctcctccgaactgacccaggacccggccgtgt ccgtggcgctgggacaaaccgtgcgcattacttgccagggcgacagcttgcggtcgtactacg cctcgtggtaccagcagaagcccggccaggctcccgtgctggtcatctatggcaaaaacaac cgcccgagcggaattccagaccggttctccgggagctcgtccgggaacaccgcttcgctcacc atcacgggggcccaggcggaggacgaagcagattactactgcaactcgcgggattccagcg gcaatcacctctgggtgttcgggggcggaaccaagctgactgtgctg
scFv soluble CAR22-4 NT	223	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaagatctctcagactctcgtgtgc ggcctccggtttcaccttcgacgactacgccatgcattgggtcagacaggccccgggaaaggg cctggagtgggtgtcaggcatctcatggaacagcggctccattggctacgccgactcggtcaag ggaaggttcactatctcccgggacaacgccaagaactccctgtacctccaaatgaacagcctg cgcgccgaggatactgccctgtactactgcgccaaggggctgtccagctggcactttcacgac gcacttgatatctggggacagggtaccatggtcaccgtgtcctccggtggcggaggctcaggg ggaggaggaagcgggggcggtggttcctcctccgaactgacccaggacccggccgtgtccgt ggcgctgggacaaaccgtgcgcattacttgccagggcgacagcttgcggtcgtactacgcctc gtggtaccagcagaagcccggccaggctcccgtgctggtcatctatggcaaaaacaaccgcc cgagcggaattccagaccggttctccgggagctcgtccgggaacaccgcttcgctcaccatca cgggggcccaggcggaggacgaagcagattactactgcaactcgcgggattccagcggca atcacctctgggtgttcgggggcggaaccaagctgactgtgctgggatcgcaccaccatcacc atcatcatcac
scFv soluble CAR22-4 AA	224	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkgle wvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakglsswhfhdaldi wgqgtmvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyq qkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhlwvf gggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-4 completo AA	225	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkgle wvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakglsswhfhdaldi wgqgtmvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyq qkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhlwvf gggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlll slvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgq nqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkge rrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-4 completo NT lentivirus	226	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaagatctctcagactctcgtgtgc ggcctccggtttcaccttcgacgactacgccatgcattgggtcagacaggccccgggaaaggg cctggagtgggtgtcaggcatctcatggaacagcggctccattggctacgccgactcggtcaag ggaaggttcactatctcccgggacaacgccaagaactccctgtacctccaaatgaacagcctg cgcgccgaggatactgccctgtactactgcgccaaggggctgtccagctggcactttcacgac gcacttgatatctggggacagggtaccatggtcaccgtgtcctccggtggcggaggctcaggg ggaggaggaagcgggggcggtggttcctcctccgaactgacccaggacccggccgtgtccgt ggcgctgggacaaaccgtgcgcattacttgccagggcgacagcttgcggtcgtactacgcctc gtggtaccagcagaagcccggccaggctcccgtgctggtcatctatggcaaaaacaaccgcc cgagcggaattccagaccggttctccgggagctcgtccgggaacaccgcttcgctcaccatca cgggggcccaggcggaggacgaagcagattactactgcaactcgcgggattccagcggca atcacctctgggtgttcgggggcggaaccaagctgactgtgctgaccactaccccagcaccga ggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtag acccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg cccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt cggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagagg aggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaa attcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-5 AA	227	evqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkglewvsgiswnsgsigyads vkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakdkgggyydfwsgsdywgqgtlvtvssggg gsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviygkn nrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgwvfgggtkltvl
scFv CAR22-5 NT	116	gaagtgcaacttgtggaatctggtggaggacttgtgcaacctggaagatcactgagactgtcat gtgcagcctcggggtttaccttcgacgactacgccatgcactgggtgcgccaggctccgggga agggcctcgaatgggtgtcgggcatcagctggaactccggttccattggctatgcggactccgt gaaaggacgcttcacaatttcccgggataacgccaagaacagcctgtacttgcagatgaactc cctgcgggccgaggataccgccctgtactactgcgctaaggacaagggcggtggatactacg acttctggagcggaagcgactactggggacagggaactctggtcaccgtgtcctccggcgga gggggctccggcggcggtggtagcgggggtggagggtcgtcgtcggagctgacccaggacc ccgcagtgtccgtcgccctggggcagactgtgcggatcacttgccaaggagacagcctgcggt cctactacgcgtcctggtatcagcagaagccggggcaggccccagtcctcgtcatctacggaa agaacaataggcccagcggaatccctgaccgcttctcgggctcatcctccggcaacaccgcct ccctgaccatcacgggcgcgcaggccgaggacgaagccgattactactgcaactcacgggga ttccagcggatgggtgttcggaggaggaaccaagctcactgtgctc
scFv soluble CAR22-5 NT	228	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaacttgtggaatctggtggaggacttgtgcaacctggaagatcactgagactgtcatgtgc agcctcggggtttaccttcgacgactacgccatgcactgggtgcgccaggctccggggaaggg cctcgaatgggtgtcgggcatcagctggaactccggttccattggctatgcggactccgtgaaa ggacgcttcacaatttcccgggataacgccaagaacagcctgtacttgcagatgaactccctgc gggccgaggataccgccctgtactactgcgctaaggacaagggcggtggatactacgacttct ggagcggaagcgactactggggacagggaactctggtcaccgtgtcctccggcggaggggg ctccggcggcggtggtagcgggggtggagggtcgtcgtcggagctgacccaggaccccgca gtgtccgtcgccctggggcagactgtgcggatcacttgccaaggagacagcctgcggtcctact acgcgtcctggtatcagcagaagccggggcaggccccagtcctcgtcatctacggaaagaac aataggcccagcggaatccctgaccgcttctcgggctcatcctccggcaacaccgcctccctg accatcacgggcgcgcaggccgaggacgaagccgattactactgcaactcacgggattcca gcggatgggtgttcggaggaggaaccaagctcactgtgctcggatcgcaccaccatcaccatc atcatcac
scFv soluble CAR22-5 AA	229	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkgle wvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakdkgggyydfws gsdywgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyas wyqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgwv fgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-5 completo AA	230	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslrlscaasgftfddyamhwvrqapgkgle wvsgiswnsgsigyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtalyycakdkgggyydfws gsdywgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyas wyqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgwv fgggtkltvlttt paprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvll lslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-5 completo NT lentivirus	231	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaacttgtggaatctggtggaggacttgtgcaacctggaagatcactgagactgtcatgtgc agcctcggggtttaccttcgacgactacgccatgcactgggtgcgccaggctccggggaaggg cctcgaatgggtgtcgggcatcagctggaactccggttccattggctatgcggactccgtgaaa ggacgcttcacaatttcccgggataacgccaagaacagcctgtacttgcagatgaactccctgc gggccgaggataccgccctgtactactgcgctaaggacaagggcggtggatactacgacttct ggagcggaagcgactactggggacagggaactctggtcaccgtgtcctccggcggaggggg ctccggcggcggtggtagcgggggtggagggtcgtcgtcggagctgacccaggaccccgca gtgtccgtcgccctggggcagactgtgcggatcacttgccaaggagacagcctgcggtcctact acgcgtcctggtatcagcagaagccggggcaggccccagtcctcgtcatctacggaaagaac aataggcccagcggaatccctgaccgcttctcgggctcatcctccggcaacaccgcctccctg accatcacgggcgcgcaggccgaggacgaagccgattactactgcaactcacgggattcca gcggatgggtgttcggaggaggaaccaagctcactgtgctcaccactaccccagcaccgagg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagac ccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcc cctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcg gaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaatt cagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaact caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccaga aatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaa aggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggca aaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctct tcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-6 AA	232	evqlqqsgpglvkpsltlsltcaisgdsvssnsatwtwirqspsrglewlgrtyyrstwyndyavs vksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycaregsgsyyaywgqgtlvtvssggggsggggs ggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrp sgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlyvfgtgtkvtvl
scFv CAR22-6 NT	233	gaagtgcaactccaacaatcaggtccaggactcgtcaaaccctcgcttactctgtcgctgacttg tgctatctcgggagactccgtgagctccaacagcgccacctggacttggattagacagtccccg tcacggggcctcgaatggctgggaaggacctactaccggagcacctggtacaacgactatgct gtgtccgtgaagtcccgcatcaccatcaaccccgatacctccaagaaccagttcagcttgcaac tgaactccgtgacccctgaggatacggccgtctattactgcgcccgcgaggggtccggttccta ctacgcctactggggacagggtactctggtcaccgtgtcgagcggaggggggggtccggcg gaggaggatctggtggcggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgcgtccgtgtccggct caccgggccagtctatcaccattagctgcaccggcactagctcagacgtgggagggtacaact acgtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgacgtgtcca accggcccagcggggtgtcgaatcgcttctccggctcaaagtccggcaacacagccagcctg accattagcggactgcaggccgaggatgaagcagactactactgctcgtcctacacctcctcct cgactctctacgtgtttggcaccggaactaaggtcaccgtgctg
scFv soluble CAR22-6 NT	234	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactccaacaatcaggtccaggactcgtcaaaccctcgcttactctgtcgctgacttgtgct atctcgggagactccgtgagctccaacagcgccacctggacttggattagacagtccccgtca cggggcctcgaatggctgggaaggacctactaccggagcacctggtacaacgactatgctgt gtccgtgaagtcccgcatcaccatcaaccccgatacctccaagaaccagttcagcttgcaactg aactccgtgacccctgaggatacggccgtctattactgcgcccgcgaggggtccggttcctact acgcctactggggacagggtactctggtcaccgtgtcgagcggaggggggggtccggcgg aggaggatctggtggcggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgcgtccgtgtccggctc accgggccagtctatcaccattagctgcaccggcactagctcagacgtgggagggtacaacta cgtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaa ccggcccagcggggtgtcgaatcgcttctccggctcaaagtccggcaacacagccagcctga ccattagcggactgcaggccgaggatgaagcagactactactgctcgtcctacacctcctcctc gactctctacgtgtttggcaccggaactaaggtcaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccat catcatcac
scFv soluble CAR22-6 AA	235	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsltlsltcaisgdsvssnsatwtwirqspsrgle wlgrtyyrstwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycaregsgsyyaywgq gtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqq hpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlyvfgtgt kvtvlgshhhhhhhhh
CAR22-6 AA completo	236	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsltlsltcaisgdsvssnsatwtwirqspsrgle wlgrtyyrstwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycaregsgsyyaywgq gtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqq hpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlyvfgtgt kvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvit lyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqly nelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgk ghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-6 completo NT lentivirus	237	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactccaacaatcaggtccaggactcgtcaaaccctcgcttactctgtcgctgacttgtgct atctcgggagactccgtgagctccaacagcgccacctggacttggattagacagtccccgtca cggggcctcgaatggctgggaaggacctactaccggagcacctggtacaacgactatgctgt gtccgtgaagtcccgcatcaccatcaaccccgatacctccaagaaccagttcagcttgcaactg aactccgtgacccctgaggatacggccgtctattactgcgcccgcgaggggtccggttcctact

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		acgcctactggggacagggtactctggtcaccgtgtcgagcggaggggggggtccggcgg aggaggatctggtggcggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgcgtccgtgtccggctc accgggccagtctatcaccattagctgcaccggcactagctcagacgtgggagggtacaacta cgtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaa ccggcccagcggggtgtcgaatcgcttctccggctcaaagtccggcaacacagccagcctga ccattagcggactgcaggccgaggatgaagcagactactactgctcgtcctacacctcctcctc gactctctacgtgtttggcaccggaactaaggtcaccgtgctgaccactaccccagcaccgag gccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtaga cccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggc ccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtc ggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagagga ggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaat tcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaact caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccaga aatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaa aggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggca aaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctct tcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-7 AA	238	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapgqglewmgwinpnsggtny aqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycardywgyygsgtldywgqgtlvtvssggg gsggggsggggsqsaltqpgsvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapkliiy dvssrpsgvsnrfsgsqsgntasltisglqaedeadyscssyagsntlvfgtgtkvtvl
scFv CAR22-7 NT	239	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaagccaggagcgtccgtgaaagtgtc ctgcaaagcctcgggctacaccttcaccggatactacatgcactgggtgcgccaggctcccgg acaaggattggagtggatgggttggatcaacccgaactccggcggaaccaactacgcccag aagttccagggacgcgtgactatgactcgggacacgtccatcagcactgcctacatggaactg agccggcttagatcagacgacaccgccgtgtactactgcgcccgcgattactggggctactac ggaagcggaaccctcgactactggggacagggaactctcgtgactgtgtcgagcggtggagg cggctccggcggaggggggttccggtggtggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgggt cggtgtccggctcacctggccaatccatcaccatttcctgcaccggcacttcctccgacgtggga gggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagcatccgggaaaggcccccaagctgatcatctac gatgtgtcgtcccggccgagcggagtgtcaaacaggtttagcgggagccagtccgggaatact gcctcgctgacaattagcgggctgcaggctgaggacgaggccgattattcgtgttcctcatatgc gggctctaacaccctggtgttcggcaccgggaccaaggtcaccgtgctg
scFv soluble CAR22-7 NT	240	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaagccaggagcgtccgtgaaagtgtcctgc aaagcctcgggctacaccttcaccggatactacatgcactgggtgcgccaggctcccggaca aggattggagtggatgggttggatcaacccgaactccggcggaaccaactacgcccagaagt tccagggacgcgtgactatgactcgggacacgtccatcagcactgcctacatggaactgagcc ggcttagatcagacgacaccgccgtgtactactgcgcccgcgattactggggctactacggaa gcggaaccctcgactactggggacagggaactctcgtgactgtgtcgagcggtggaggcggc tccggcggaggggggttccggtggtggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgggtcggtg tccggctcacctggccaatccatcaccatttcctgcaccggcacttcctccgacgtgggagggta caactacgtgtcgtggtaccagcagcatccgggaaaggcccccaagctgatcatctacgatgt gtcgtcccggccgagcggagtgtcaaacaggtttagcgggagccagtccgggaatactgcctc gctgacaattagcgggctgcaggctgaggacgaggccgattattcgtgttcctcatatgcgggct ctaacaccctggtgttcggcaccgggaccaaggtcaccgtgctgggatcgcaccaccatcacc atcatcatcac
scFv soluble CAR22-7 AA	241	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapgq glewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycardywgyygs gtldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpgsvsgspgqsitisctgtssdvggy nyvswyqqhpgkapkliiydvssrpsgvsnrfsgsqsgntasltisglqaedeadyscssyag sntlvfgtgtkvtvlgshhhhhhhhh
CAR22-7 completo AA	242	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapgq glewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycardywgyygs gtldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpgsvsgspgqsitisctgtssdvggy nyvswyqqhpgkapkliiydvssrpsgvsnrfsgsqsgntasltisglqaedeadyscssyag sntlvfgtgtkvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagt cgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

Nombre	SEQ ID	Sequencias
CAR22-7 Completo NT lentivirus	243	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaagccaggagcgtccgtgaaagtgtcctgc aaagcctcgggctacaccttcaccggatactacatgcactgggtgcgccaggctcccggaca aggattggagtggatgggttggatcaacccgaactccggcggaaccaactacgcccagaagt tccagggacgcgtgactatgactcgggacacgtccatcagcactgcctacatggaactgagcc ggcttagatcagacgacaccgccgtgtactactgcgcccgcgattactggggctactacggaa gcggaaccctcgactactggggacagggaactctcgtgactgtgtcgagcggtggaggcggc tccggcggaggggggttccggtggtggaggctcccagtccgcgctgacccagcctgggtcggtg tccggctcacctggccaatccatcaccatttcctgcaccggcacttcctccgacgtgggagggta caactacgtgtcgtggtaccagcagcatccgggaaaggcccccaagctgatcatctacgatgt gtcgtcccggccgagcggagtgtcaaacaggtttagcgggagccagtccgggaatactgcctc gctgacaattagcgggctgcaggctgaggacgaggccgattattcgtgttcctcatatgcgggct ctaacaccctggtgttcggcaccgggaccaaggtcaccgtgctgaccactaccccagcaccg aggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgta gacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgg gcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcgg tcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagag gaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtga aattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacga actcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccca gaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctcca aaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagagg caaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc tcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-8 AA	244	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqglewmgwisayngntnya qklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycaraglalysnyvpyyyygmdvwgqgttvtv ssggggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtisctrssgsiasnyvqwyqqrpgssp ttviyednqrpsgvpdrfsgsidsssnsasltisglktedeadyycqsydssnpwvfgggtkltvl
scFv CAR22-8 NT	245	caagtccaactggtgcagtcgggagccgaagtcaagaagccgggggcctccgtcaaagtgt cctgcaaagccagcggctacactttcacctcctatgggatctcatgggtcagacaggctcccgg ccaaggactggaatggatgggttggatctccgcctacaacggcaacactaactacgcccaga agctgcaggggagagtgaccatgacaactgacacctcgacctcaaccgcgtacatggaactg cgcagccttaggtccgacgatacggcggtgtactattgtgcacgggccggcttggccctctactc gaactacgtgccctactactactacggaatggacgtctggggacagggaaccactgtgaccgt gtcctccgggggtggaggctcaggcggaggaggaagcggcgggggtggaagcaactttatg ctgacccagcctcactcggtgtcggagagccctggaaagactgtgaccatctcctgcactcgg agctcgggctccattgcgtcaaactacgtgcagtggtaccagcagcgccccggttcctcgccaa ccaccgtgatctacgaggacaaccaacgcccgtccggggtgcctgaccggttctccggctcca tcgattcctcttccaactccgcttccctgaccattagcggcctcaagaccgaggatgaagccgac tactactgccagtcctacgactcaagcaatccgtgggtgttcggtggaggaactaagctgaccg tgctc
scFv soluble CAR22-8 NT	246	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactggtgcagtcgggagccgaagtcaagaagccgggggcctccgtcaaagtgtcctg caaagccagcggctacactttcacctcctatgggatctcatgggtcagacaggctcccggcca aggactggaatggatgggttggatctccgcctacaacggcaacactaactacgcccagaagc tgcaggggagagtgaccatgacaactgacacctcgacctcaaccgcgtacatggaactgcgc agccttaggtccgacgatacggcggtgtactattgtgcacgggccggcttggccctctactcgaa ctacgtgccctactactactacggaatggacgtctggggacagggaaccactgtgaccgtgtcc tccgggggtggaggctcaggcggaggaggaagcggcgggggtggaagcaactttatgctga cccagcctcactcggtgtcggagagccctggaaagactgtgaccatctcctgcactcggagctc gggctccattgcgtcaaactacgtgcagtggtaccagcagcgccccggttcctcgccaaccac cgtgatctacgaggacaaccaacgcccgtccggggtgcctgaccggttctccggctccatcgat tcctcttccaactccgcttccctgaccattagcggcctcaagaccgaggatgaagccgactacta ctgccagtcctacgactcaagcaatccgtgggtgttcggtggaggaactaagctgaccgtgctc ggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-8 AA	247	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqgl ewmgwisayngntnyaqklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycaraglalysnyvp yyyygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtisctrssgs iasnyvqwyqqrpgssptviyednqrpsgvpdrfsgsidsssnsasltisglktedeadyycqs ydssnpwvfgggtkltvlgshhhhhhhh

Nombre	SEQ ID	Sequencias
CAR22-8 completo AA	248	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqgl ewmgwisayngntnyaqklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycaraglalysnyvp yyyygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtisctrssgs iasnyvqwyqqrpgssptviyedngrpsgvpdrfsgsidsssnsasltisglktedeadyycqs ydssnpwvfgggtkltvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiw aplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsa dapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaea yseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-8 completo NT lentivirus	249	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactggtgcagtcgggagccgaagtcaagaagccgggggcctccgtcaaagtgtcctg caaagccagcggctacactttcacctcctatgggatctcatgggtcagacaggctcccggcca aggactggaatggatgggttggatctccgcctacaacggcaacactaactacgcccagaagc tgcaggggagagtgaccatgacaactgacacctcgacctcaaccgcgtacatggaactgcgc agccttaggtccgacgatacggcggtgtactattgtgcacgggccggcttggccctctactcgaa ctacgtgccctactactactacggaatggacgtctggggacagggaaccactgtgaccgtgtcc tccgggggtggaggctcaggcggaggaggaagcggcgggggtggaagcaactttatgctga cccagcctcactcggtgtcggagagccctggaaagactgtgaccatctcctgcactcggagctc gggctccattgcgtcaaactacgtgcagtggtaccagcagcgccccggttcctcgccaaccac cgtgatctacgaggacaaccaacgcccgtccggggtgcctgaccggttctccggctccatcgat tcctcttccaactccgcttccctgaccattagcggcctcaagaccgaggatgaagccgactacta ctgccagtcctacgactcaagcaatccgtgggtgttcggtggaggaactaagctgaccgtgctc accactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcg cctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcg gctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggca gaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagc ggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag gggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-9 AA	250	evqlvesggglvkpggslrlscvasgftfsnawmnwvrqapgkglewvgriksktdggtadya apvkgrftisrddsknmylqmnslktedtgvyycitgatdvwgqgttvtvssggggsggggsg gggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigsnyvywyqqlpgtapklliyrnnqrpsgvpd rfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddslsgpvfgggtkltvl
scFv CAR22-9 NT	251	gaagtgcagctcgtggaatcgggcggtggactggtcaagccaggaggttccctgcggctgtcc tgcgtggcctccggtttcacattctccaacgcgtggatgaattgggtgcgccaagcccctggaaa gggacttgaatgggtcggacggatcaagagcaaaaccgacggaggaactgccgattacgcc gcacccgtgaagggcagattcaccatttcgcgggatgactcgaagaacaccatgtacctccag atgaactcgctcaagaccgaggataccggcgtctactactgcatcaccggcgctactgacgtct ggggacagggaactaccgtgactgtgtcctccggcggaggcggaagcggaggaggggca gcgggggcgggggatcatcctacgtgctcactcagccgccttcagcctccggtaccccgggcc agcgcgtgaccatttcatgctcgggctcctcctcaaacatcgggagcaactacgtgtactggtac cagcagctgcccggtactgcccccaagctgctgatctaccggaacaaccaacgcccgagcg gagtgccggacagattctccgggtccaagtctgggacctccgctagcctggcgatctccggtct gaggagcgaggacgaggcagactactattgtgcggcctgggacgattccctgtcggggcctgt gtttggaggcggcacgaagttgaccgtgctg
scFv soluble CAR22-9 NT	252	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagctcgtggaatcgggcggtggactggtcaagccaggaggttccctgcggctgtcctgc gtggcctccggtttcacattctccaacgcgtggatgaattgggtgcgccaagcccctggaaagg gacttgaatgggtcggacggatcaagagcaaaaccgacggaggaactgccgattacgccgc acccgtgaagggcagattcaccatttcgcgggatgactcgaagaacaccatgtacctccagat gaactcgctcaagaccgaggataccggcgtctactactgcatcaccggcgctactgacgtctg gggacagggaactaccgtgactgtgtcctccggcggaggcggaagcggaggaggggcag cgggggcgggggatcatcctacgtgctcactcagccgccttcagcctccggtaccccgggcca gcgcgtgaccatttcatgctcgggctcctcctcaaacatcgggagcaactacgtgtactggtacc agcagctgcccggtactgcccccaagctgctgatctaccggaacaaccaacgcccgagcgg agtgccggacagattctccgggtccaagtctgggacctccgctagcctggcgatctccggtctg aggagcgaggacgaggcagactactattgtgcggcctgggacgattccctgtcggggcctgtg tttggaggcggcacgaagttgaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac

Nombre	SEQ ID	Sequencias
scFv soluble CAR22-9 AA	253	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscvasgftfsnawmnwvrqapgkgl ewvgriksktdggtadyaapvkgrftisrddsknmylqmnslktedtgvyycitgatdvwgqgt tvtvssggggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigsnyvywyqqlpg tapklliyrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddslsgpvfgggtklt vlgshhhhhhhh
CAR22-9 completo AA	254	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscvasgftfsnawmnwvrqapgkgl ewvgriksktdggtadyaapvkgrftisrddsknmylqmnslktedtgvyycitgatdvwgqgt tvtvssggggsggggsggggssyvltqppsasgtpgqrvtiscsgsssnigsnyvywyqqlpg tapklliyrnnqrpsgvpdrfsgsksgtsaslaisglrsedeadyycaawddslsgpvfgggtklt vltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyc krgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlyne lnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkgh dglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-9 completo NT lentivirus	255	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagctcgtggaatcgggcggtggactggtcaagccaggaggttccctgcggctgtcctgc gtggcctccggtttcacattctccaacgcgtggatgaattgggtgcgccaagcccctggaaagg gacttgaatgggtcggacggatcaagagcaaaaccgacggaggaactgccgattacgccgc acccgtgaagggcagattcaccatttcgcgggatgactcgaagaacaccatgtacctccagat gaactcgctcaagaccgaggataccggcgtctactactgcatcaccggcgctactgacgtctg gggacagggaactaccgtgactgtgtcctccggcggaggcggaagcggaggaggggcagc cgggggcgggggatcatcctacgtgctcactcagccgccttcagcctccggtaccccgggcca gcgcgtgaccatttcatgctcgggctcctcctcaaacatcgggagcaactacgtgtactggtacc agcagctgcccggtactgcccccaagctgctgatctaccggaacaaccaacgcccgagcgg agtgccggacagattctccgggtccaagtctgggacctccgctagcctggcgatctccggtctg aggagcgaggacgaggcagactactattgtgcggcctgggacgattccctgtcggggcctgtg tttggaggcggcacgaagttgaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccacccc ggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggt ggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggt acttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgc tgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttca tgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcg cagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgg agagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcggga agccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatgg cagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgac ggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggc cctgccgcctcgg
scFv CAR22-10 AA	256	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrglewlgrtyhrstwyddyass vrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnswsdafdvwgqgtmvtvssgg ggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapkl miydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvyvfgtgtkvtvl
scFv CAR22-10 NT	257	gaagtgcagcttcagcagtctggtcccgggcttgtcaaaccatcgcagaccctgtccctgacttg cgcgatcagcggcgatagcgtgctgtcaaactcggacacctggaactggatcaggcagtccc cttcccgcggactggaatggttgggccggacgtaccatcgctccacttggtacgacgactatgc cagctccgtgagaggccgggtgtcgatcaacgtggatacttcaaagaaccagtactccctcca actcaatgctgtgaccccggaggacaccggagtgtactactgtgcccgggatagactgcagg acggaaactcatggagcgacgccttcgacgtgtggggacagggcaccatggtcaccgtgtcc agcggtggaggaggctccggcggtggaggttcgggggaggagggagccaatcggctctg acccaaccggcctcagtcagcggttcgcccggacagtccattactattagctgcaccggaacct ccagcgacgtgggcggctacaactatgtgtcgtggtaccagcagcacccggggaaggcccct aagctgatgatctacgacgtgtccaatcggccctccggggtgtccaaccgcttctccggctcga agtccggcaacactgcatcactgacaatcagcggactgcaagccgaggacgaagcggatta ctactgctcctcctacacctcctcctccactctcgtctacgtgtttggaaccgggaccaaggtcacc gtgctg
scFv soluble CAR22-10 NT	258	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagcttcagcagtctggtcccgggcttgtcaaaccatcgcagaccctgtccctgacttgcgc gatcagcggcgatagcgtgctgtcaaactcggacacctggaactggatcaggcagtccccttc ccgcggactggaatggttgggccggacgtaccatcgctccacttggtacgacgactatgccag ctccgtgagaggccgggtgtcgatcaacgtggatacttcaaagaaccagtactccctccaactc aatgctgtgaccccggaggacaccggagtgtactactgtgcccgggatagactgcaggacgg aaactcatggagcgacgccttcgacgtgtggggacagggcaccatggtcaccgtgtccagcg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		gtggaggaggctccggcggtggaggttcgggggggaggagggagccaatcggctctgaccca accggcctcagtcagcggttcgcccggacagtccattactattagctgcaccggaacctccagc gacgtgggcggctacaactatgtgtcgtggtaccagcagcacccggggaaggcccctaagct gatgatctacgacgtgtccaatcggccctccggggtgtccaaccgcttctccggctcgaagtccg gcaacactgcatcactgacaatcagcggactgcaagccgaggacgaagcggattactactgc tcctcctacacctcctcctccactctcgtctacgtgtttggaaccgggaccaaggtcaccgtgctg gatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-10 AA	259	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvgg ynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyt ssstlvyvfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-10 completo AA	260	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvgg ynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyt ssstlvyvfgtgtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwap lagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeays eigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-10 completo NT lentivirus	261	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagcttcagcagtctggtcccgggcttgtcaaaccatcgcagaccctgtccctgacttgcgc gatcagcggcgatagcgtgctgtcaaactcggacacctggaactggatcaggcagtccccttc ccgcggactggaatggttgggccggacgtaccatcgctccacttggtacgacgactatgccag ctccgtgagaggccgggtgtcgatcaacgtggatacttcaaagaaccagtactccctccaactc aatgctgtgaccccggaggacaccggagtgtactactgtgcccgggatagactgcaggacgg aaactcatggagcgacgccttcgacgtgtggggacagggcaccatggtcaccgtgtccagcg gtggaggaggctccggcggtggaggttcgggggggaggagggagccaatcggctctgaccca accggcctcagtcagcggttcgcccggacagtccattactattagctgcaccggaacctccagc gacgtgggcggctacaactatgtgtcgtggtaccagcagcacccggggaaggcccctaagct gatgatctacgacgtgtccaatcggccctccggggtgtccaaccgcttctccggctcgaagtccg gcaacactgcatcactgacaatcagcggactgcaagccgaggacgaagcggattactactgc tcctcctacacctcctcctccactctcgtctacgtgtttggaaccgggaccaaggtcaccgtgctg accactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcg cctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcg gctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggca gaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagc ggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag gggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-11 AA	262	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrglewlgrtyyrskwyndya vsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycareesssgwyegnwfdpwgqgtlvtvssg gggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviyg knhrpsgipdrfsgsssgdtdsltitgaqaedeadyychsrdssgnhlfgggtkltvl
scFv CAR22-11 NT	263	gaagtgcaacttcagcagtccggtcctggcttggtcaagccgtcacagaccctgtcgctgacttg tgctattagcggggactctgtgtcctcaaactccgccgcatggaactggattagacagtcgccct cccggggactggagtggctgggccgcacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgcc gtgtccgtgaagtcccgcattactatcaaccccgacacttcgaagaaccagttttcgctgcaact caactccgtcacccctgaggataccgccgtgtactattgcgcccgggaagaatcctccagcggt tggtacgaaggaaactggttcgacccatggggccagggcaccctggtcactgtgtcctcggga ggaggggcagcggtggcggaggaagcggaggaggaggctccagctccgagctcaccca ggacccggcggtgtcagtggccctgggccaaacggtccgcatcacatgccaggggattccc tgaggtcatactacgcgagctggtatcagcagaaacccggacaagcccctgtgctcgtgatcta cgggaagaaccacaggccgagcggaatcccggatagattctccgggtcctcatcgggagac actgacagcctcaccatcaccggcgcgcaggccgaggacgaagctgattactactgccattcc cgggactcgagcgggaaccacctttcggtggcggaaccaagctgaccgtgctg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
scFv soluble CAR22-11 NT	264	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaacttcagcagtccggtcctggcttggtcaagccgtcacagaccctgtcgctgacttgtgct attagcggggactctgtgtcctcaaactccgccgcatggaactggattagacagtcgccctccc ggggactggagtggctgggccgcacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccgtgt ccgtgaagtcccgcattactatcaaccccgacacttcgaagaaccagttttcgctgcaactcaac tccgtcacccctgaggataccgccgtgtactattgcgcccgggaagaatcctccagcggttggt acgaaggaaactggttcgacccatggggccagggcaccctggtcactgtgtcctcgggagga gggggcagcggtggcggaggaagcggaggaggaggctccagctccgagctcacccagga cccggcggtgtcagtggccctgggccaaacggtccgcatcacatgccaggggattccctga ggtcatactacgcgagctggtatcagcagaaacccggacaagcccctgtgctcgtgatctacg ggaagaaccacaggccgagcggaatcccggatagattctccgggtcctcatcgggagacact gacagcctcaccatcaccggcgcgcaggccgaggacgaagctgattactactgccattcccg ggactcgagcgggaaccacctttttcggtggcggaaccaagctgaccgtgctgggatcgcacc accatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-11 AA	265	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrg lewlgrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycareesssgwyeg nwfdpwgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyya swyqqkpgqapvlviygknhrpsgipdrfsgsssgdtdsltitgaqaedeadyychsrdssgn hlfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-11 completo AA	266	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrg lewlgrtyyrskwyndyavsvksritinpdtsknqfslqlnsvtpedtavyycareesssgwyeg nwfdpwgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyya swyqqkpgqapvlviygknhrpsgipdrfsgsssgdtdsltitgaqaedeadyychsrdssgn hlfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcg vlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmk gerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-11 completo NT lentivirus	267	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaacttcagcagtccggtcctggcttggtcaagccgtcacagaccctgtcgctgacttgtgct attagcggggactctgtgtcctcaaactccgccgcatggaactggattagacagtcgccctccc ggggactggagtggctgggccgcacctactaccggtccaagtggtacaatgactacgccgtgt ccgtgaagtcccgcattactatcaaccccgacacttcgaagaaccagttttcgctgcaactcaac tccgtcacccctgaggataccgccgtgtactattgcgcccgggaagaatcctccagcggttggt acgaaggaaactggttcgacccatggggccagggcaccctggtcactgtgtcctcgggagga gggggcagcggtggcggaggaagcggaggaggaggctccagctccgagctcacccagga cccggcggtgtcagtggccctgggccaaacggtccgcatcacatgccaggggattccctga ggtcatactacgcgagctggtatcagcagaaacccggacaagcccctgtgctcgtgatctacg ggaagaaccacaggccgagcggaatcccggatagattctccgggtcctcatcgggagacact gacagcctcaccatcaccggcgcgcaggccgaggacgaagctgattactactgccattcccg ggactcgagcgggaaccacctttttcggtggcggaaccaagctgaccgtgctgaccactaccc cagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccgg aggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatat ctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgt aagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagacta ctcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaact gcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctc tacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggac gggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgca gaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacc tatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-12 AA	268	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrglewlgrtyhrstwyddyass vrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnswsdafdvwgqgtmvtvssgg ggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapkl miydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlyvfgtgtqltvl
scFv CAR22-12 NT	269	gaagtgcagctgcagcagagcggaccgggcctggtcaaaccctcccaaaccctgtccctcac ttgcgcgatctccggggactccgtgctctcgaactccgacacctggaactggattcggcagagc ccatcgaggggcctggaatggctgggaagaacctaccaccggtccacttggtacgatgactac gcgagctcagtgcgcggacgcgtgtcgattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcttg caactgaacgccgtgacccctgaggacaccggagtgtactattgcgcccgggatagacttcag gacggaaacagctggtccgacgcctttgacgtctggggacagggcaccatggtcactgtgtcct

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		cgggtggcgggggtccggtggaggaggttcaggcggaggcggctcacagtcagcactgac gcagccggcttccgcttccgggagccctggacagagcgtgaccatctcgtgtaccgggacttcc agcgatgtcggcgggtacaactacgtgtcttggtaccaacagcatccgggaaaggcccccaa gctcatgatctacgacgtgtcaaaccggcccagcggagtgtccaatcgcttctccggctccaag tcgggcaatactgcctcgctgactatcagcggtctgcaagccgaagatgaggccgactattact gctcctcctacacctcgtcctccacactctacgtgttcggaaccggtactcagctgaccgtgctt
scFv soluble CAR22-12 NT	270	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagctgcagcagagcggaccgggcctggtcaaaccctcccaaaccctgtccctcacttgc gcgatctccggggactccgtgctctcgaactccgacacctggaactggattcggcagagccca tcgaggggcctggaatggctgggaagaacctaccaccggtccacttggtacgatgactacgc gagctcagtgcgcggacgcgtgtcgattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcttgca actgaacgccgtgacccctgaggacaccggagtgtactattgcgcccgggatagacttcagga cggaaacagctggtccgacgcctttgacgtctggggacagggcaccatggtcactgtgtcctcg ggtggcgggggtccggtggaggaggttcaggcggaggcggctcacagtcagcactgacgc agccggcttccgcttccgggagccctggacagagcgtgaccatctcgtgtaccgggacttcca gcgatgtcggcgggtacaactacgtgtcttggtaccaacagcatccgggaaaggcccccaag ctcatgatctacgacgtgtcaaaccggcccagcggagtgtccaatcgcttctccggctccaagtc gggcaatactgcctcgctgactatcagcggtctgcaagccgaagatgaggccgactattactgc tcctcctacacctcgtcctccacactctacgtgttcggaaccggtactcagctgaccgtgcttggat cgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-12 AA	271	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvg gynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycss ytssstlyvfgtgtqltvlgshhhhhhhh
CAR22-12 completo AA	272	malpvtalllplalllhaarpevqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvlsnsdtwnwirqspsrgl ewlgrtyhrstwyddyassvrgrvsinvdtsknqyslqlnavtpedtgvyycardrlqdgnsws dafdvwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvg gynyvswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycss ytssstlyvfgtgtqltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwap lagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeays eigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-12 completo NT lentivirus	273	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagctgcagcagagcggaccgggcctggtcaaaccctcccaaaccctgtccctcacttgc gcgatctccggggactccgtgctctcgaactccgacacctggaactggattcggcagagccca tcgaggggcctggaatggctgggaagaacctaccaccggtccacttggtacgatgactacgc gagctcagtgcgcggacgcgtgtcgattaacgtggacacctccaagaaccagtacagcttgca actgaacgccgtgacccctgaggacaccggagtgtactattgcgcccgggatagacttcagga cggaaacagctggtccgacgcctttgacgtctggggacagggcaccatggtcactgtgtcctcg ggtggcgggggtccggtggaggaggttcaggcggaggcggctcacagtcagcactgacgc agccggcttccgcttccgggagccctggacagagcgtgaccatctcgtgtaccgggacttcca gcgatgtcggcgggtacaactacgtgtcttggtaccaacagcatccgggaaaggcccccaag ctcatgatctacgacgtgtcaaaccggcccagcggagtgtccaatcgcttctccggctccaagtc gggcaatactgcctcgctgactatcagcggtctgcaagccgaagatgaggccgactattactgc tcctcctacacctcgtcctccacactctacgtgttcggaaccggtactcagctgaccgtgcttacc actaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctg cgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcct gcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtg cagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaa ccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgga gaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaa ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-13 AA	274	qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsggsisssyywgwirqppgkglewigsiyysgstyynpsl ksrvtisvdtsknqfslklssvtaadtavyycargrmdtamaqiwgqgtmvtvssgdggsggg gsggggsnfmltqphsvsespgktvtipctgssgsfassyvqwyqqrpgsapatviyednqrp sgvpdrfsgsvdsssnsasltisglktedeavyycqsydgatwvfgggtkltvl

Nombre	SEQ ID	Sequencias
scFv CAR22-13 NT	275	caagtgcagctccaagaatcaggtcccggcctcgtgaagccttccgaaaccctctcccttacttg taccgtgtccgggggaagcatctcgagcagctcctattactggggatggatcaggcagcctccc ggaaagggactggagtggattggctccatctactactcggggtccacctactacaacccgtcac tgaagtcccgcgtgaccatctcggtggatacctccaagaaccagttcagcctgaagctgtcctc cgtgactgccgccgacactgccgtgtactactgcgcgcggggtcggatggacacagcgatgg ctcagatttggggacagggcaccatggtcactgtgtcctccggggatggaggctccgggggcg gaggatctggtggcgggggtcgaacttcatgttgacccagccacactccgtgtcggaaagcc caggaaagaccgtcaccatcccttgcactggaagcagcggttcgttcgcatcaagctacgtgc agtggtaccagcaaagacccggcagcgctccggccaccgtcatctatgaggacaatcagcg gccgtccggcgtgccggaccgcttcagcggatcggtggactcatcctcaaactccgcctccctg acgatttccggtctgaaaaccgaggacgaagccgtctactactgccagtcgtacgatggcgcc acttgggtgtttggaggaggcaccaagctgaccgtgctg
scFv soluble CAR22-13 NT	276	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcagctccaagaatcaggtcccggcctcgtgaagccttccgaaaccctctcccttacttgtac cgtgtccgggggaagcatctcgagcagctcctattactggggatggatcaggcagcctcccgg aaagggactggagtggattggctccatctactactcggggtccacctactacaacccgtcactg aagtcccgcgtgaccatctcggtggatacctccaagaaccagttcagcctgaagctgtcctccg tgactgccgccgacactgccgtgtactactgcgcgcggggtcggatggacacagcgatggctc agatttggggacagggcaccatggtcactgtgtcctccggggatggaggctccgggggcgga ggatctggtggcgggggtcgaacttcatgttgacccagccacactccgtgtcggaaagccca ggaaagaccgtcaccatcccttgcactggaagcagcggttcgttcgcatcaagctacgtgcagt ggtaccagcaaagacccggcagcgctccggccaccgtcatctatgaggacaatcagcggcc gtccggcgtgccggaccgcttcagcggatcggtggactcatcctcaaactccgcctccctgacg atttccggtctgaaaaccgaggacgaagccgtctactactgccagtcgtacgatggcgccactt gggtgtttggaggaggcaccaagctgaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacc caccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgca gctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctg gctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaaga agctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacgg ctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagcc gcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatctt ggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatggg cgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggata agatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcc
scFv soluble CAR22-13 AA	277	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsggsissssyywgwirqppgkgl ewigsiyysgstyynpslksrvtisvdtsknqfslklssvtaadtavyycargrmdtamaqiwgq gtmvtvssgdggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtipctgssgsfassyvqwyq qrpgsapatviyednqrpsgvpdrfsgsvdsssnsasltisglktedeavyycqsydgatwvfg ggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-13 completo AA	278	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsggsissssyywgwirqppgkgl ewigsiyysgstyynpslksrvtisvdtsknqfslklssvtaadtavyycargrmdtamaqiwgq gtmvtvssgdggsggggsggggsnfmltqphsvsespgktvtipctgssgsfassyvqwyq qrpgsapatviyednqrpsgvpdrfsgsvdsssnsasltisglktedeavyycqsydgatwvfg ggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllls lvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerr rgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-13 completo NT	279	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcagctccaagaatcaggtcccggcctcgtgaagccttccgaaaccctctcccttacttgtac cgtgtccgggggaagcatctcgagcagctcctattactggggatggatcaggcagcctcccgg aaagggactggagtggattggctccatctactactcggggtccacctactacaacccgtcactg aagtcccgcgtgaccatctcggtggatacctccaagaaccagttcagcctgaagctgtcctccg tgactgccgccgacactgccgtgtactactgcgcgcggggtcggatggacacagcgatggctc agatttggggacagggcaccatggtcactgtgtcctccggggatggaggctccgggggcgga ggatctggtggcgggggtcgaacttcatgttgacccagccacactccgtgtcggaaagccca ggaaagaccgtcaccatcccttgcactggaagcagcggttcgttcgcatcaagctacgtgcagt ggtaccagcaaagacccggcagcgctccggccaccgtcatctatgaggacaatcagcggcc gtccggcgtgccggaccgcttcagcggatcggtggactcatcctcaaactccgcctccctgacg atttccggtctgaaaaccgaggacgaagccgtctactactgccagtcgtacgatggcgccactt gggtgtttggaggaggcaccaagctgaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacc caccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgca gctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctg gctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaaga agctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacgg ctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagcc gcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatctt ggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatggg cgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggata agatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggcc

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		acgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatg caggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-14 AA	280	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardldvsldiwgqgtmvtvssggggsgggg sggggsqsaltqpasvsgspgqsitiscsgtssdvggynsvswyqqypgkapklmiydvnnr psgvssrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlffgagtkvtvl
scFv CAR22-14 NT	281	caagtgcaacttgtccagagcggagcagaagtcaagaaaccaggagcaagcgtgaaggtg tcctgcaaagcgtcaggctacactttcacctcctactatatgcactgggtccgccaggcccctgg acaaggcctggaatggatgggtatcatcaacccgtccggtggaagcaccagctacgcccaga agtttcagggaagagtgaccatgactcgggacacttcaacctcgacggtgtacatggagctgtc ctccctgcggtcggaggacaccgccgtgtactactgcgcgagggatctcgatgtgtccctggac atttggggacagggcaccatggtcaccgtgtcctccgggggggggcggatcaggcggcggag gttcaggggggcgggggctcccagtccgcgctgactcagccggctagcgtgtccggctcgccg ggacagagcattaccatctcgtgctcgggtaccagctccgacgtgggaggctataactccgtgt cctggtaccagcagtaccccggaaaggcccccaagctgatgatctacgacgtgaacaatcgc ccttctggggtgtcctctcggttctccgggtcaaagagcggaaacaccgcctccctgaccatctc gggactccaagctgaggatgaagccgactactactgttcgagctacacctcctcctccactctctt cttcggtgccggaactaaggtcacagtgttg
scFv soluble CAR22-14 NT	282	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaacttgtccagagcggagcagaagtcaagaaaccaggagcaagcgtgaaggtgtcct gcaaagcgtcaggctacactttcacctcctactatatgcactgggtccgccaggcccctggaca aggcctggaatggatgggtatcatcaacccgtccggtggaagcaccagctacgcccagaagt ttcagggaagagtgaccatgactcgggacacttcaacctcgacggtgtacatggagctgtcctc cctgcggtcggaggacaccgccgtgtactactgcgcgagggatctcgatgtgtccctggacattt ggggacagggcaccatggtcaccgtgtcctccgggggggggcggatcaggcggcggaggttc aggggcgggggctcccagtccgcgctgactcagccggctagcgtgtccggctcgccggga cagagcattaccatctcgtgctcgggtaccagctccgacgtgggaggctataactccgtgtcctg gtaccagcagtaccccggaaaggcccccaagctgatgatctacgacgtgaacaatcgccctt ctggggtgtcctctcggttctccgggtcaaagagcggaaacaccgcctccctgaccatctcggg actccaagctgaggatgaagccgactactactgttcgagctacacctcctcctccactctcttcttc ggtgccggaactaaggtcacagtgttgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-14 AA	283	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardldvsldiwg qgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitiscsgtssdvggynsvsw yqqypgkapklmiydvnnrpsgvssrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlffg agtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-14 completo AA	284	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardldvsldiwg qgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitiscsgtssdvggynsvsw yqqypgkapklmiydvnnrpsgvssrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlffg agtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlll slvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgq nqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkge rrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-14 completo NT	285	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaacttgtccagagcggagcagaagtcaagaaaccaggagcaagcgtgaaggtgtcct gcaaagcgtcaggctacactttcacctcctactatatgcactgggtccgccaggcccctggaca aggcctggaatggatgggtatcatcaacccgtccggtggaagcaccagctacgcccagaagt ttcagggaagagtgaccatgactcgggacacttcaacctcgacggtgtacatggagctgtcctc cctgcggtcggaggacaccgccgtgtactactgcgcgagggatctcgatgtgtccctggacattt ggggacagggcaccatggtcaccgtgtcctccgggggggggcggatcaggcggcggaggttc aggggcgggggctcccagtccgcgctgactcagccggctagcgtgtccggctcgccggga cagagcattaccatctcgtgctcgggtaccagctccgacgtgggaggctataactccgtgtcctg gtaccagcagtaccccggaaaggcccccaagctgatgatctacgacgtgaacaatcgccctt ctggggtgtcctctcggttctccgggtcaaagagcggaaacaccgcctccctgaccatctcggg actccaagctgaggatgaagccgactactactgttcgagctacacctcctcctccactctcttcttc ggtgccggaactaaggtcacagtgttgaccactaccccagcaccgaggccacccaccccgg ctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtgg ggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtact tgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgt

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		acatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatg ccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgc agatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgga gagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaa gccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggc agaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacg gactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggcc ctgccgcctcgg
scFv CAR22-15 AA	286	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamhwvrqapgkgleyvsaissnggstyyans vkdrftisrdnskntlylqmgslraedmavyycarvhssgyyhpgpndywgqgtlvtvssggg gsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrtyyatwyqqkpgqapvlvfydenn rpsgipdrfsgsssgntasltitgtqaedeadyycssrdssgnpscvfgggtkltvl
scFv CAR22-15 NT	287	gaagtgcagttggtggagagcggtggaggacttgtgcaacctggaggatcattgagactgtcgt gtgcggcctccggctttaccttctcgtcctacgctatgcattgggtccgccaggcccccgggaaa ggactcgaatacgtcagcgccatctcctcaaacgggggatcaacctactacgccaattccgtg aaggatcggttcaccatctcccgggataacagcaagaacaccctgtatctgcaaatggggtcc ctgagggcagaggacatggccgtctactactgcgcgcgcgtgcacagctctggatactaccac cctggaccgaacgattactggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcgggggtggtgga agcggcggcggaggatcgggggggaggcggctcctcgagcgaactgacacaggaccctgcc gtgtccgtggctctgggtcagactgtgcgcattacgtgtcaaggagactccctgagaacttattac gcgacctggtaccagcagaagccgggacaggcaccggtgctggtgttctacgacgaaaaca accggccatccgggattcccgaccggttctccggctcatcgagcggcaacactgcctccctga ccatcaccgggacccaggccgaggacgaggccgattactactgctcctcgcgggactcctcc ggcaacccctcctgcgtgttcggcggtggaaccaagctgactgtcctc
scFv soluble CAR22-15 NT	288	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggagagcggtggaggacttgtgcaacctggaggatcattgagactgtcgtgtg cggcctccggctttaccttctcgtcctacgctatgcattgggtccgccaggcccccgggaaagga ctcgaatacgtcagcgccatctcctcaaacgggggatcaacctactacgccaattccgtgaag gatcggttcaccatctcccgggataacagcaagaacaccctgtatctgcaaatggggtccctga gggcagaggacatggccgtctactactgcgcgcgcgtgcacagctctggatactaccaccctg gaccgaacgattactggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcgggggtggtggaagc ggcggcggaggatcgggggggaggcggctcctcgagcgaactgacacaggaccctgccgtg tccgtggctctgggtcagactgtgcgcattacgtgtcaaggagactccctgagaacttattacgc gacctggtaccagcagaagccgggacaggcaccggtgctggtgttctacgacgaaaacaac cggccatccgggattcccgaccggttctccggctcatcgagcggcaacactgcctccctgacc atcaccgggacccaggccgaggacgaggccgattactactgctcctcgcgggactcctccgg caaccctcctgcgtgttcggcggtggaaccaagctgactgtcctcggatcgcaccaccatcac catcatcatcac
scFv soluble CAR22-15 AA	289	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamhwvrqapgkgl eyvsaissnggstyyansvkdrftisrdnskntlylqmgslraedmavyycarvhssgyyhpg pndywgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrtyyatw yqqkpgqapvlvfydennrpsgipdrfsgsssgntasltitgtqaedeadyycssrdssgnpsc vfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-15 completo AA	290	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamhwvrqapgkgl eyvsaissnggstyyansvkdrftisrdnskntlylqmgslraedmavyycarvhssgyyhpg pndywgqgtlvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrtyyatw yqqkpgqapvlvfydennrpsgipdrfsgsssgntasltitgtqaedeadyycssrdssgnpsc vfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-15 completo NT	291	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggagagcggtggaggacttgtgcaacctggaggatcattgagactgtcgtgtg cggcctccggctttaccttctcgtcctacgctatgcattgggtccgccaggcccccgggaaagga ctcgaatacgtcagcgccatctcctcaaacgggggatcaacctactacgccaattccgtgaag gatcggttcaccatctcccgggataacagcaagaacaccctgtatctgcaaatggggtccctga gggcagaggacatggccgtctactactgcgcgcgcgtgcacagctctggatactaccaccctg gaccgaacgattactggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcgggggtggtggaagc ggcggcggaggatcgggggggaggcggctcctcgagcgaactgacacaggaccctgccgtg tccgtggctctgggtcagactgtgcgcattacgtgtcaaggagactccctgagaacttattacgc

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		gacctggtaccagcagaagccgggacaggcaccggtgctggtgttctacgacgaaaacaac cggccatccgggattcccgaccggttctccggctcatcgagcggcaacactgcctccctgacc atcaccgggacccaggccgaggacgaggccgattactactgctcctcgcgggactcctccgg caacccctcctgcgtgttcggcggtggaaccaagctgactgtcctcaccactaccccagcacc gaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgt agacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttg ggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcg gtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaaga ggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtg aaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctcc aaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagag gcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacg ctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-16 AA	292	evqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststaymelsslrsedtavyycareagvvavdywgqgtlvtvssggggsgg ggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiydvs nrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstwvfgggtkltvl
scFv CAR22-16 NT	293	gaagtgcaactcgtcgaatctggagcggaagtcaagaagcctggagcaagcgtgaaagtgt cctgtaaagcgtccggttacaccttcacttcgtattacatgcactgggtccgccaagctccggga cagggactggaatggatgggcatcatcaaccctagcggaggatcgacctcctacgcccaaaa gttccagggcagagtgaccatgacccgggacaccagcacatcaactgcctacatggagctgt catcactgaggtccgaggataccgccgtgtactattgcgcccgcgaggccggcgtggtggccg tcgactactggggacagggcactctcgtgaccgtgtcatcgggaggcggcggttccgggggg ggagggtcgggggcggaggctcccagtccgcactgacgcagccggcttccgtgtctggttcg cccggacagtccatcaccatttcctgcactggaaccagcagcgacgtgggcggttacaactac gtgtcatggtaccagcagcatcccggaaaggccccaaagcttatgatctacgacgtgtccaatc ggccgtcgggcgtcagcaaccggttctccggctccaagtccgggaacactgccagcctgacc attagcgggctgcaggccgaggacgaagcggattactactgctcctcctacacttcctcctcga cctgggtgtttggtggaggcaccaagttgactgtgctg
scFv soluble CAR22-16 NT	294	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactcgtcgaatctggagcggaagtcaagaagcctggagcaagcgtgaaagtgtcctgt aaagcgtccggttacaccttcacttcgtattacatgcactgggtccgccaagctccgggacagg gactggaatggatgggcatcatcaaccctagcggaggatcgacctcctacgcccaaaagttcc agggcagagtgaccatgacccgggacaccagcacatcaactgcctacatggagctgtcatca ctgaggtccgaggataccgccgtgtactattgcgcccgcgaggccggcgtggtggccgtcgac tactggggacagggcactctcgtgaccgtgtcatcgggaggcggcggttccgggggggggagg gtcgggggggcggaggctcccagtccgcactgacgcagccggcttccgtgtctggttcgcccgg acagtccatcaccatttcctgcactggaaccagcagcgacgtgggcggttacaactacgtgtca tggtaccagcagcatcccggaaaggccccaaagcttatgatctacgacgtgtccaatcggccg tcgggcgtcagcaaccggttctccggctccaagtccgggaacactgccagcctgaccattagc gggctgcaggccgaggacgaagcggattactactgctcctcctacacttcctcctcgacctggg tgtttggtggaggcaccaagttgactgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-16 AA	295	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststaymelsslrsedtavyycareagvvavdy wgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvs wyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstw vfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-16 completo AA	296	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststaymelsslrsedtavyycareagvvavdy wgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvs wyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstw vfgggtkltvlttttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-16 completo NT	297	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactcgtcgaatctggagcggaagtcaagaagcctggagcaagcgtgaaagtgtcctgt aaagcgtccggttacaccttcacttcgtattacatgcactgggtccgccaagctccgggacagg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		gactggaatggatgggcatcatcaaccctagcggaggatcgacctcctacgcccaaaagttcc agggcagagtgaccatgacccgggacaccagcacatcaactgcctacatggagctgtcatca ctgaggtccgaggataccgccgtgtactattgcgcccgcgaggccggcgtggtggccgtcgac tactggggacagggcactctcgtgaccgtgtcatcgggaggcggcggttccgggggggggagg gtcgggggcggaggctcccagtccgcactgacgcagccggcttccgtgtctggttcgcccgg acagtccatcaccatttcctgcactggaaccagcagcgacgtgggcggttacaactacgtgtca tggtaccagcagcatcccggaaaggccccaaagcttatgatctacgacgtgtccaatcggccg tcgggcgtcagcaaccggttctccggctccaagtccgggaacactgccagcctgaccattagc gggctgcaggccgaggacgaagcggattactactgctcctcctacacttcctcctcgacctggg tgtttggtggaggcaccaagttgactgtgctgaccactaccccagcaccgaggccacccaccc cggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctgg tggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggt acttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgc tgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttca tgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcg cagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgg agagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcggga agccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatgg cagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgac ggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggc cctgccgcctcgg
scFv CAR22-17 AA	298	qvqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstyyads vkgrftisrdnsknt lylqmnslraedtavyycakeplfgvveedvdywgqgtlvtvssggggsg gggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllagnghnyldwylqkpgqspqlliyl gsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqnpltfgggtkleikr
scFv CAR22-17 NT	299	caagtgcagttggtccagagcggaggaggagtggtgcaacccggaagatcattgaggctctc atgtgctgcaagcggattcaccttctcgagctacgcaatgtcctgggtgcgccaggcccctgga aagggactggaatgggtgtccgccatctcgggctccggcggatcaacgtactacgccgactcc gtgaagggccgctttactatttcaagagacaactccaagaacactctgtacctccaaatgaactc tctgcgggccgaggacaccgccgtgtactactgcgcgaaggagccgctgttcggcgtggtgga ggaagatgtggactactggggccagggcactctcgtcaccgtgtcctccggcggtggaggatc gggaggcggaggcagcgggggtggtggctccgacgtcgtgatgacccagtcgcccctgtccc tgcccgtgaccctggggaaccggcctccatttcctgccggtccagccagtcgctgctggctgg aaacggacacaattaccttgattggtatctgcaaaagcctgggcagtcaccgcagctgctgatc tacctcggaagcaaccgggcgtccggggtgccggaccggttctccggttccgggagcggcac cgacttcaccctgaaaatctcgagggtggaggccgaagatgtcggagtgtactattgcatgcag gcgcttcagaacccactcactttcgggggcggtactaagctggaaatcaagcgc
scFv soluble CAR22-17 NT	300	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcagttggtccagagcggaggaggagtggtgcaacccggaagatcattgaggctctcatgt gctgcaagcggattcaccttctcgagctacgcaatgtcctgggtgcgccaggcccctggaaag ggactggaatgggtgtccgccatctcgggctccggcggatcaacgtactacgccgactccgtg aagggccgctttactatttcaagagacaactccaagaacactctgtacctccaaatgaactctct gcgggccgaggacaccgccgtgtactactgcgcgaaggagccgctgttcggcgtggtggag gaagatgtggactactggggccagggcactctcgtcaccgtgtcctccggcggtggaggatcg ggaggcggaggcagcgggggtggtggctccgacgtcgtgatgacccagtcgcccctgtccct gcccgtgaccctggggaaccggcctccatttcctgccggtccagccagtcgctgctggctgga aacggacacaattaccttgattggtatctgcaaaagcctgggcagtcaccgcagctgctgatct acctcggaagcaaccgggcgtccggggtgccggaccggttctccggttccgggagcggcac cgacttcaccctgaaaatctcgagggtggaggccgaagatgtcggagtgtactattgcatgcag gcgcttcagaacccactcactttcgggggcggtactaagctggaaatcaagcgcggatcgcac caccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-17 AA	301	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssyamswvrqapgkgl ewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnsknt lylqmnslraedtavyycakeplfgvveedvd ywgqgtlvtvssggggsggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllagngh nyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqnpl tfgggtkleikrgshhhhhhhh
CAR22-17 completo AA	302	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgggvvqpgrslrlscaasgftfssyamswvrqapgkgl ewvsaisgsggstyyadsvkgrftisrdnsknt lylqmnslraedtavyycakeplfgvveedvd ywgqgtlvtvssggggsggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllagngh nyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqnpl tfgggtkleikrtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		vlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmk gerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-17 completo NT	303	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcagttggtccagagcggaggaggagtggtgcaacccggaagatcattgaggctctcatgt gctgcaagcggattcaccttctcgagctacgcaatgtcctgggtgcgccaggcccctggaaag ggactggaatgggtgtccgccatctcgggctccggcggatcaacgtactacgccgactccgtg aagggccgctttactatttcaagagacaactccaagaacactctgtacctccaaatgaactctct gcgggccgaggacaccgccgtgtactactgcgcgaaggagccgctgttcggcgtggtggag gaagatgtggactactggggccagggcactctcgtcaccgtgtcctccggcggtggaggatcg ggaggcggaggcagcgggggtggtggctccgacgtcgtgatgacccagtcgcccctgtccct gcccgtgacccctggggaaccggcctccatttcctgccggtccagccagtcgctgctggctgga aacggacacaattaccttgattggtatctgcaaaagcctgggcagtcaccgcagctgctgatct acctcggaagcaaccgggcgtccggggtgccggaccggttctccggttccgggagcggcac cgacttcaccctgaaaatctcgagggtggaggccgaagatgtcggagtgtactattgcatgcag gcgcttcagaacccactcactttcgggggcggtactaagctggaaatcaagcgcaccactacc ccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccg gaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgata tctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactg taagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagact actcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagct ctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagagga cgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaa cgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacac ctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-18 AA	304	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsgslgdafdiwgqgtmvtvssggggs ggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgsssdvggynyvswyqqhpgkapklmiy evsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvfgtgtkvtvl
scFv CAR22-18 NT	305	caagtccaactcgtccaaagcggagctgaagtcaagaagcctggagcgtcagtgaaagtgtc ctgcaaggcctccggctacacgtttacttcctactacatgcattgggtgcggcaggccccaggtc aaggactggaatggatgggcatcattaacccttccgggggtccacctcgtatgcgcagaagtt ccagggcagagtgaccatgacccgcgacacctccacctccactgtgtacatggaactgtccag cctgaggtctgaggacactgccgtgtactactgtgcgcgcggtagcggatcactgggcgatgcc ttcgacatctggggccagggaactatggtcaccgtgtcctccgggggaggggctcgggtgga ggaggttcaggcggaggaggctcccagagcgcattgacacagcccgcttcggtgtccggctc cccgggacagtccattaccatctcgtgcaccggaagctcaagcgatgtcggagggtacaacta cgtgtcgtggtatcagcagcacccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgaagtgtccaa tcggccgtccggggtgtcgaaccggttcagcggttccaagtcgggcaacactgccagcctgac catcagcgggctgcaggccgaggacgaggccgactactactgctcctcgtacacctcctcctc aaccctggtgttcggcactggaactaaggtcaccgtgctt
scFv soluble CAR22-18 NT	306	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccaaagcggagctgaagtcaagaagcctggagcgtcagtgaaagtgtcctg caaggcctccggctacacgtttacttcctactacatgcattgggtgcggcaggccccaggtcaa ggactggaatggatgggcatcattaacccttccgggggtccacctcgtatgcgcagaagttcc agggcagagtgaccatgacccgcgacacctccacctccactgtgtacatggaactgtccagcc tgaggtctgaggacactgccgtgtactactgtgcgcgcggtagcggatcactgggcgatgcctt cgacatctggggccagggaactatggtcaccgtgtcctccgggggaggggctcgggtggag gaggttcaggcggaggaggctcccagagcgcattgacacagcccgcttcggtgtccggctcc ccgggacagtccattaccatctcgtgcaccggaagctcaagcgatgtcggagggtacaactac gtgtcgtggtatcagcagcacccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgaagtgtccaat cggccgtccggggtgtcgaaccggttcagcggttccaagtcgggcaacactgccagcctgac catcagcgggctgcaggccgaggacgaggccgactactactgctcctcgtacacctcctcctc aaccctggtgttcggcactggaactaaggtcaccgtgcttggatcgcaccaccatcaccatcat catcac
scFv soluble CAR22-18 AA	307	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsgslgdafdi wgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgsssdvggynyv

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		swyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstl vfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-18 completo AA	308	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsgslgdafdi wgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgsssdvggynyv swyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstl vfgtgtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-18 completo NT	309	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccaaagcggagctgaagtcaagaagcctggagcgtcagtgaaagtgtcctg caaggcctccggctacacgtttacttcctactacatgcattgggtgcggcaggccccaggtcaa ggactggaatggatgggcatcattaacccttccgggggtccacctcgtatgcgcagaagttcc agggcagagtgaccatgacccgcgacacctccacctccactgtgtacatggaactgtccagcc tgaggtctgaggacactgccgtgtactactgtgcgcgcggtagcggatcactgggcgatgcctt cgacatctggggccagggaactatggtcaccgtgtcctccgggggaggggctcgggtggag gaggttcaggcggaggaggctcccagagcgcattgacacagcccgcttcggtgtccggctcc ccgggacagtccattaccatctcgtgcaccggaagctcaagcgatgtcggagggtacaactac gtgtcgtggtatcagcagcacccgggaaaggcccccaagctcatgatctacgaagtgtccaat cggccgtccggggtgtcgaaccggttcagcggttccaagtcgggcaacactgccagcctgac catcagcgggctgcaggccgaggacgaggccgactactactgctcctcgtacacctcctcctc aaccctggtgttcggcactggaactaaggtcaccgtgcttaccactaccccagcaccgaggcc acccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccc gcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccct ctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaa gaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggac ggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcag ccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaat cttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatg ggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggga taagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcaca tgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-19 AA	310	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardgfgelsgafdiwgqgtmvtvssggggs ggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiyd vsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyassstlvfgggtkvtvl
scFv CAR22-19 NT	311	caagtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtc ctgcaaggcctccggctacacgttcacttcatactacatgcactgggtccgccaggcgcccgga cagggactggagtggatgggcatcatcaacccttccggcggctcgacctcctacgcccaaaa gttccagggaagagtgacaatgaccagggatacttcaaccagcactgtctacatggaactgtct agcttgcggtccgaggacactgccgtgtactattgcgctcgggacggtttcggggagctgtccg gggcctttgacatctggggccaggggactatggtgaccgtgtcctcgggcggaggcggcagc ggaggaggaggttcgggaggcggaggaagccagtcagcactgacccagccagcctcggtg tccgggagcccgggccagagcatcactatttcctgtaccgggacctcctccgacgtgggaggg tacaattacgtgtcatggtatcaacagcatccgggaaaggcgccgaagctgatgatctacgac gtgtcgaaccgccctagcggagtgtccaaccggttctccggttcgaagtccgggaacaccgcg agcctgaccattagcggactccaggccgaggatgaagccgactactactgctcctcctacgctt catcgtccaccctggtgttcggtggtggcaccaaggtcaccgtgctt
scFv soluble CAR22-19 NT	312	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctgc aaggcctccggctacacgttcacttcatactacatgcactgggtccgccaggcgcccggacag ggactggagtggatgggcatcatcaacccttccggcggctcgacctcctacgcccaaaagttc cagggaagagtgacaatgaccagggatacttcaaccagcactgtctacatggaactgtctagc ttgcggtccgaggacactgccgtgtactattgcgctcgggacggtttcggggagctgtccgggg cctttgacatctggggccaggggactatggtgaccgtgtcctcgggcggaggcggcagcgga ggaggaggttcgggaggcggaggaagccagtcagcactgacccagccagcctcggtgtcc gggagcccgggccagagcatcactatttcctgtaccgggacctcctccgacgtgggagggtac aattacgtgtcatggtatcaacagcatccgggaaaggcgccgaagctgatgatctacgacgtgt cgaaccgccctagcggagtgtccaaccggttctccggttcgaagtccgggaacaccgcgagc

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ctgaccattagcggactccaggccgaggatgaagccgactactactgctcctcctacgcttcatc gtccaccctggtgttcggtggtggcaccaaggtcaccgtgcttggatcgcaccaccatcaccatc atcatcac
scFv soluble CAR22-19 AA	313	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardgfgelsgaf diwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggyny vswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyass stlvfgggtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-19 completo AA	314	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardgfgelsgaf diwgqgtmvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggyny vswyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyass stlvfgggtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagt cgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-19 completo NT	315	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctgc aaggcctccggctacacgttcacttcatactacatgcactgggtccgccaggcgcccggacag ggactggagtggatgggcatcatcaacccttccggcggctcgacctcctacgcccaaaagttc cagggaagagtgacaatgaccagggatacttcaaccagcactgtctacatggaactgtctagc ttgcggtccgaggacactgccgtgtactattgcgctcgggacggtttcggggagctgtccgggg cctttgacatctggggccaggggactatggtgaccgtgtcctcgggcggaggcggcagcgga ggaggaggttcgggaggcggaggaagccagtcagcactgacccagccagcctcggtgtcc gggagcccgggccagagcatcactatttcctgtaccgggacctcctccgacgtgggagggtac aattacgtgtcatggtatcaacagcatccgggaaaggcgccgaagctgatgatctacgacgtgt cgaaccgccctagcggagtgtccaaccggttctccggttcgaagtccgggaacaccgcgagc ctgaccattagcggactccaggccgaggatgaagccgactactactgctcctcctacgcttcatc gtccaccctggtgttcggtggtggcaccaaggtcaccgtgcttaccactaccccagcaccgagg ccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagac ccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcc cctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcg gaagaagctgctgtacatctttaagcaaccccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaatt cagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaact caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccaga aatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaa aggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggca aaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctct tcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-20 AA	316	evqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargpigcsggscldywgqgtlvtvssgggg sggggsggggsqsaltqpayvsgspgqsitisctgtnsdvgrynyvswyqqhpgkapklmiy evsyrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyttsstldfgtgtkvtvl
scFv CAR22-20 NT	317	gaagtgcaactcgtcgaatcaggagcagaagtcaagaaaccaggagcctccgtgaaagtca gctgcaaggcctcgggctacactttcacttcctactacatgcattgggtgcgccaggccccgggc cagggactggaatggatgggcatcatcaatccctcgggaggttccactagctacgcgcagaa gttccagggaagagtgaccatgaccagagacacctcgacttcgacggtgtacatggagctga gctccctgaggagcgaggacactgccgtgtactactgcgcccggggcccgatcggatgcagc gggggtcctgtctcgattactggggccagggcacactcgtgaccgtgtccagcgggggcggt ggtagcggaggaggggatcgggcggtggaggatcgcagtccgccctgacccaaccggcg tacgtgtctggatcacccggacagtccattaccatctcctgcaccggaaccaactcggacgtgg gccgctacaactacgtgtcatggtaccagcagcaccccgggaaggctcctaagctgatgatct acgaggtgtcctatcggcctagcggtgtcagcaaccggttctccggctccaagtccggcaaca ctgcttcccttaccatttccgggttgcaagccgaggacgaggccgattactactgttcctcctatac cacttcatccaccctggactttggaaccggcaccaaggtcaccgtgctg
scFv soluble CAR22-20 NT	318	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactcgtcgaatcaggagcagaagtcaagaaaccaggagcctccgtgaaagtcagct gcaaggcctcgggctacactttcacttcctactacatgcattgggtgcgccaggccccgggcca gggactggaatggatgggcatcatcaatccctcgggaggttccactagctacgcgcagaagtt

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ccagggaagagtgaccatgaccagagacacctcgacttcgacggtgtacatggagctgagct ccctgaggagcgaggacactgccgtgtactactgcgcccggggcccgatcggatgcagcgg ggggtcctgtctcgattactggggccagggcacactcgtgaccgtgtccagcgggggcggtgg tagcggaggaggggatcgggcggtggaggatcgcagtccgccctgacccaaccggcgta cgtgtctggatcacccggacagtccattaccatctcctgcaccggaaccaactcggacgtgggc cgctacaactacgtgtcatggtaccagcagcaccccgggaaggctcctaagctgatgatctac gaggtgtcctatcggcctagcggtgtcagcaaccggttctccggctccaagtccggcaacactg cttcccttaccatttccgggttgcaagccgaggacgaggccgattactactgttcctcctataccac ttcatccaccctggactttggaaccggcaccaaggtcaccgtgctgggatcgcaccaccatcac catcatcatcac
scFv soluble CAR22-20 AA	319	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargpigcsggsc ldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpayvsgspgqsitisctgtnsdvgryny vswyqqhpgkapklmiyevsyrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyttsst ldfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-20 completo AA	320	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargpigcsggsc ldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpayvsgspgqsitisctgtnsdvgryny vswyqqhpgkapklmiyevsyrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssyttsst ldfgtgtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcg vlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmk gerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-20 completo NT	321	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaactcgtcgaatcaggagcagaagtcaagaaaccaggagcctccgtgaaagtcagct gcaaggcctcgggctacactttcacttcctactacatgcattgggtgcgccaggccccgggcca gggactggaatggatgggcatcatcaatccctcgggaggttccactagctacgcgcagaagtt ccagggaagagtgaccatgaccagagacacctcgacttcgacggtgtacatggagctgagct ccctgaggagcgaggacactgccgtgtactactgcgcccggggcccgatcggatgcagcgg ggggtcctgtctcgattactggggccagggcacactcgtgaccgtgtccagcgggggcggtgg tagcggaggaggggatcgggcggtggaggatcgcagtccgccctgacccaaccggcgta cgtgtctggatcacccggacagtccattaccatctcctgcaccggaaccaactcggacgtgggc cgctacaactacgtgtcatggtaccagcagcaccccgggaaggctcctaagctgatgatctac gaggtgtcctatcggcctagcggtgtcagcaaccggttctccggctccaagtccggcaacactg cttcccttaccatttccgggttgcaagccgaggacgaggccgattactactgttcctcctataccac ttcatccaccctggactttggaaccggcaccaaggtcaccgtgctgaccactaccccagcacc gaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgt agacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttg ggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcg gtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaaga ggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtg aaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacg aactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccc agaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctcc aaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagag gcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacg ctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-21 AA	322	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsygdygdafdiwgqgttvtvssggggs ggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggykyvswyqqhpgkapklmiyd vsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvfgggtkltvl
scFv CAR22-21 NT	323	caagtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtc ctgcaaggcctcgggctacaccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggcgccggg ccagggacttgagtggatgggtatcatcaacccgtccggcggaagcacctcgtacgcccaaa agtttcaggggagagtgaccatgaccagggacacttcaaccagcaccgtgtacatggaactgt caagcttgcgctccgaggatactgccgtctactactgcgcccggggatcgtacggagactacg gcgacgctttcgatatctggggacagggcacaaccgtgaccgtgtcctccggcggaggggggct cgggcggaggaggctcaggttccggcgggagccagtccgcactgactcagccagcgtccgt gagcggtagccctgggcagtctatcacgatttcgtgcactggcacctcctccgacgtgggaggc tataagtacgtcagctggtaccaacagcatccgggaaaggcgcctaagctgatgatctatgac gtcagcaaccggccctccggggtgtcaaaccggttcagcggttccaagtcgggaaataccgc

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ctccctgaccattagcgggctgcaggccgaagatgaggctgactactactgttcctcctacactt catcgtccactctcgtgttcgggggaggaactaagctcaccgtgctg
scFv soluble CAR22-21 NT	324	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcgggctacaccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggcgccgggccag ggacttgagtggatgggtatcatcaacccgtccggcggaagcacctcgtacgcccaaaagtttc aggggagagtgaccatgaccagggacacttcaaccagcaccgtgtacatggaactgtcaag cttgcgctccgaggatactgccgtctactactgcgcccggggatcgtacggagactacggcga cgctttcgatatctggggacagggcacaaccgtgaccgtgtcctccggcggaggggctcggg cggaggaggctcaggttccggcgggagccagtccgcactgactcagccagcgtccgtgagc ggtagccctgggcagtctatcacgatttcgtgcactggcacctcctccgacgtgggaggctataa gtacgtcagctggtaccaacagcatccgggaaaggcgcctaagctgatgatctatgacgtcag caaccggccctccggggtgtcaaaccggttcagcggttccaagtcgggaaataccgcctcct gaccattagcgggctgcaggccgaagatgaggctgactactactgttcctcctacacttcatcgt ccactctcgtgttcgggggaggaactaagctcaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatc atcatcac
scFv soluble CAR22-21 AA	325	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsygdygdaf diwgqgttvtvssggggsggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggykyv swyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstl vfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-21 completo AA	326	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargsygdygdaf diwgqgttvtvssggggsggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggykyv swyqqhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstl vfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-21 completo NT	327	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcctccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcgggctacaccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggcgccgggccag ggacttgagtggatgggtatcatcaacccgtccggcggaagcacctcgtacgcccaaaagtttc aggggagagtgaccatgaccagggacacttcaaccagcaccgtgtacatggaactgtcaag cttgcgctccgaggatactgccgtctactactgcgcccggggatcgtacggagactacggcga cgctttcgatatctggggacagggcacaaccgtgaccgtgtcctccggcggaggggctcggg cggaggaggctcaggttccggcgggagccagtccgcactgactcagccagcgtccgtgagc ggtagccctgggcagtctatcacgatttcgtgcactggcacctcctccgacgtgggaggctataa gtacgtcagctggtaccaacagcatccgggaaaggcgcctaagctgatgatctatgacgtcag caaccggccctccggggtgtcaaaccggttcagcggttccaagtcgggaaataccgcctcct gaccattagcgggctgcaggccgaagatgaggctgactactactgttcctcctacacttcatcgt ccactctcgtgttcgggggaggaactaagctcaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggc cacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacc cgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggccc ctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggagg acggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattc agccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactc aatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaa atgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaa ggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaa aggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttc acatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-22 AA	328	evqlvesgaevkkpgssvkvsckasggtfssyaiswvrqapgqglewmggiipifgtanyaq kfqgrvtitadeststaymelsslrsedtavyycardhkvvrfgywgqgtlvtvsssggggsgggg sggggshviltqppsasaslgasvkltctlssghssyaiawhqqqpekgprylmkvnsdgsls kgdgipdrfsgstsgaeryltisslqsedeadyycqtwgsgmaifgggtkltvl
scFv CAR22-22 NT	329	gaagtgcaattggtggaatcaggcgcagaagtcaagaaacccggaagcagcgtgaaagtgt cctgcaaggcctcaggaggcaccttctcgtcctatgccatttcctgggtccgccaggccccggg acagggcctggaatggatgggcggaattatccctatcttcggaaccgcgaactacgcccaga

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		agtttcagggacgcgtgaccatcactgccgatgaatcaacctccactgcgtacatggaactgtc ctccctgcggagcgaggacaccgccgtgtactactgcgcaagggatcataaggtcgtgcggtt cggatactggggacagggaacccttgtgaccgtgtcctccggcggcgggggtccggcgga gggggttccgggggaggcggatcgcacgtgatcctgactcaaccaccctcagcctccgcctct ctgggagccagcgtgaagctcacctgtactctgagctcgggacactcgtcgtacgccatcgctt ggcaccagcagcagccggagaaggggcctagatacctgatgaaggtcaactccgacggttc gctgagcaagggcgacggcatcccggatcggttcagcggttccacgtccggcgcggagagat acctcacaatctcctcgctccaatccgaggacgaggctgactactactgccagacctggggta gcggcatggcgattttcgggggtggaactaagctgaccgtgctg
scFv soluble CAR22-22 NT	330	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaattggtggaatcaggcgcagaagtcaagaaacccggaagcagcgtgaaagtgtcct gcaaggcctcaggaggcaccttctcgtcctatgccatttcctgggtccgccaggccccgggaca gggcctggaatggatgggcggaattatccctatcttcggaaccgcgaactacgcccagaagttt cagggacgcgtgaccatcactgccgatgaatcaacctccactgcgtacatggaactgtcctccc tgcggagcgaggacaccgccgtgtactactgcgcaagggatcataaggtcgtgcggttcggat actggggacagggaacccttgtgaccgtgtcctccggcggcgggggtccggcggaggggg ttccgggggaggcggatcgcacgtgatcctgactcaaccaccctcagcctccgcctctctggga gccagcgtgaagctcacctgtactctgagctcgggacactcgtcgtacgccatcgcttggcacc agcagcagccggagaaggggcctagatacctgatgaaggtcaactccgacggttcgctgag caagggcgacggcatcccggatcggttcagcggttccacgtccggcgcggagagatacctca caatctcctcgctccaatccgaggacgaggctgactactactgccagacctggggtagcggca tggcgattttcgggggtggaactaagctgaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcatcat cac
scFv soluble CAR22-22 AA	331	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgssvkvsckasggtfssyaiswvrqapgqg lewmggiipifgtanyaqkfqgrvtitadeststaymelsslrsedtavyycardhkvvrfgywgq gtlvtvssggggsggggsggggshviltqppsasaslgasvkltctlssghssyaiawhqqqpe kgprylmkvnsdgslskgdgipdrfsgstsgaeryltisslqsedeadyycqtwgsgmaifggg tkltvlgshhhhhhhh
CAR22-22 completo AA	332	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgssvkvsckasggtfssyaiswvrqapgqg lewmggiipifgtanyaqkfqgrvtitadeststaymelsslrsedtavyycardhkvvrfgywgq gtlvtvssggggsggggsggggshviltqppsasaslgasvkltctlssghssyaiawhqqqpe kgprylmkvnsdgslskgdgipdrfsgstsgaeryltisslqsedeadyycqtwgsgmaifggg tkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvit lyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqly nelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgk ghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-22 completo NT	333	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaattggtggaatcaggcgcagaagtcaagaaacccggaagcagcgtgaaagtgtcct gcaaggcctcaggaggcaccttctcgtcctatgccatttcctgggtccgccaggccccgggaca gggcctggaatggatgggcggaattatccctatcttcggaaccgcgaactacgcccagaagttt cagggacgcgtgaccatcactgccgatgaatcaacctccactgcgtacatggaactgtcctccc tgcggagcgaggacaccgccgtgtactactgcgcaagggatcataaggtcgtgcggttcggat actggggacagggaacccttgtgaccgtgtcctccggcggcgggggtccggcggaggggg ttccgggggaggcggatcgcacgtgatcctgactcaaccaccctcagcctccgcctctctggga gccagcgtgaagctcacctgtactctgagctcgggacactcgtcgtacgccatcgcttggcacc agcagcagccggagaaggggcctagatacctgatgaaggtcaactccgacggttcgctgag caagggcgacggcatcccggatcggttcagcggttccacgtccggcgcggagagatacctca caatctcctcgctccaatccgaggacgaggctgactactactgccagacctggggtagcggca tggcgattttcgggggtggaactaagctgaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggccac ccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgc agctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctct ggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaag aagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacg gctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagc cgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatc ttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgg gcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggat aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggc cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacat gcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
scFv CAR22-23 AA	334	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargdyymdvwgkgttvtvssggggsggg gsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiyevs krpsgvpdrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssgtlvfgggtkltvl
scFv CAR22-23 NT	335	caagtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcct gcaaggcctcaggttacaccttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggaca aggcctggagtggatgggaattatcaacccgtccggcggcagcacaagctacgcccagaag ttccagggacgcgtgactatgaccagagatacctccacctccaccgtgtacatggaactgtcct cactccggtcggaagataccgccgtgtactactgtgcccggggagactactatatggacgtctg gggaaagggcaccaccgtgactgtgtcgtcgggcggcgggggttcgggaggaggaggaag cggtggcgggggaagccagtccgcactgactcagcccgcgtcggccagcgggagccctgg ccagagcgtgaccatttcgtgcaccggaacttcctctgacgtcggcggatacaactacgtgtcct ggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgaggtgtccaagaggcc atccggcgtgccggaccggttttcgggatcaaagtccgggaacacggccagcctgaccatca gcgggcttcaggctgaggacgaagcggattactactgctcctcctatacttcatccggcaccttg gtgttcggcggagggactaagctgactgtgctc
scFv soluble CAR22-23 NT	336	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgca aggcctcaggttacaccttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggacaagg cctggagtggatgggaattatcaacccgtccggcggcagcacaagctacgcccagaagttcc agggacgcgtgactatgaccagagatacctccacctccaccgtgtacatggaactgtcctcact ccggtcggaagataccgccgtgtactactgtgccccggggagactactatatggacgtctgggg aaagggcaccaccgtgactgtgtcgtcgggcggcgggggttcgggaggaggaggaagcgg tggcgggggaagccagtccgcactgactcagcccgcgtcggccagcgggagccctggcca gagcgtgaccatttcgtgcaccggaacttcctctgacgtcggcggatacaactacgtgtcctggt accagcagcaccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgaggtgtccaagaggccatc cggcgtgccggaccggttttcgggatcaaagtccgggaacacggccagcctgaccatcagcg ggcttcaggctgaggacgaagcggattactactgctcctcctatacttcatccggcaccttggtgtt cggcggagggactaagctgactgtgctcggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-23 AA	337	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargdyymdvw gkgttvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvsw yqqhpgkapklmiyevskrpsgvpdrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssgtlvfg ggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-23 completo AA	338	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycargdyymdvw gkgttvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasasgspgqsvtisctgtssdvggynyvsw yqqhpgkapklmiyevskrpsgvpdrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssgtlvfg ggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlls lvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerr rgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-23 completo NT	339	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgca aggcctcaggttacaccttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggacaagg cctggagtggatgggaattatcaacccgtccggcggcagcacaagctacgcccagaagttcc agggacgcgtgactatgaccagagatacctccacctccaccgtgtacatggaactgtcctcact ccggtcggaagataccgccgtgtactactgtgcccggggagactactatatggacgtctgggg aaagggcaccaccgtgactgtgtcgtcgggcggcgggggttcgggaggaggaggaagcgg tggcgggggaagccagtccgcactgactcagcccgcgtcggccagcgggagccctggcca gagcgtgaccatttcgtgcaccggaacttcctctgacgtcggcggatacaactacgtgtcctggt accagcagcaccctggaaaggccccgaagctgatgatctacgaggtgtccaagaggccatc cggcgtgccggaccggttttcgggatcaaagtccgggaacacggccagcctgaccatcagcg ggcttcaggctgaggacgaagcggattactactgctcctcctatacttcatccggcaccttggtgtt cggcggagggactaagctgactgtgctcaccactaccccagcaccgaggccacccaccccg gctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtg gggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgct gtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcat gccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcg cagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		agagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcggga agccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatgg cagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgac ggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggc cctgccgcctcgg
scFv CAR22-24 AA	340	evqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsyissssstiyyadsv kgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycardgpiryfdhskafdiwgqgtmvtvssggggs ggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviygknnr psgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyyrnsrdssgnpyvfgtgtkvtvl
scFv CAR22-24 NT	341	gaagtgcaattggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaggatctctgagactgtcat gcgccgcgtcgggattcactttctcctcctacgcaatgtcgtgggtcagacaggccccggaaa gggcctggaatgggtgtcatacatcagctcctcctcctccacgatctactacgccgactctgtga aggggcggttcaccattagccgggacaacgcaaagaactccctgtatctgcaaatgaacagc ctcagggcggaagataccgccgtgtactactgtgcgcgcgatggtccgattcgctatttcgacca ctccaaggccttcgatatctggggccagggaaccatggtcaccgtgtcgtccggtggaggcgg cagcgggggggggcggaagcggcggcgggggttcatcctcggagctgactcaggaccccgc cgtgtccgtggctctgggacagaccgtgcgcatcacatgccagggagattccctgcggtcgtac tacgcctcctggtaccagcagaaaccgggccaggcccccgtcctcgtgatctacggaaagaa caacaggccttcgggtatcccagaccggttcagcggcagctccagcggaaacaccgcaagc ctcactattaccggggcccaggctgaggacgaggccgactactaccggaactcccgcgactc ctcgggcaatccgtacgtctttggtactgggaccaaggtcaccgtgctg
scFv soluble CAR22-24 NT	342	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaattggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaggatctctgagactgtcatgcg ccgcgtcgggattcactttctcctcctacgcaatgtcgtgggtcagacaggcccccggaaaggg cctggaatgggtgtcatacatcagctcctcctcctccacgatctactacgccgactctgtgaagg ggcggttcaccattagccgggacaacgcaaagaactccctgtatctgcaaatgaacagcctca gggcggaagataccgccgtgtactactgtgcgcgcgatggtccgattcgctatttcgaccactcc aaggccttcgatatctggggccagggaaccatggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggcag cgggggggcggaagcggcggcgggggttcatcctcggagctgactcaggaccccgccgtg tccgtggctctgggacagaccgtgcgcatcacatgccagggagattccctgcggtcgtactacg cctcctggtaccagcagaaaccgggccaggcccccgtcctcgtgatctacggaaagaacaac aggccttcgggtatcccagaccggttcagcggcagctccagcggaaacaccgcaagcctcac tattaccggggcccaggctgaggacgaggccgactactaccggaactcccgcgactcctcgg gcaatccgtacgtctttggtactgggaccaaggtcaccgtgctgggatcgcaccaccatcacca tcatcatcac
scFv soluble CAR22-24 AA	343	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkgl ewvsyissssstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycardgpiryfdhskaf diwgqgtmvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyasw yqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyyrnsrdssgnpyv fgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-24 completo AA	344	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkgl ewvsyissssstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycardgpiryfdhskaf diwgqgtmvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyasw yqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyyrnsrdssgnpyv fgtgtkvtvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvll lslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-24 completo NT	345	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcaattggtggaatcaggaggaggacttgtgcaacctggaggatctctgagactgtcatgcg ccgcgtcgggattcactttctcctcctacgcaatgtcgtgggtcagacaggcccccggaaaggg cctggaatgggtgtcatacatcagctcctcctcctccacgatctactacgccgactctgtgaagg ggcggttcaccattagccgggacaacgcaaagaactccctgtatctgcaaatgaacagcctca gggcggaagataccgccgtgtactactgtgcgcgcgatggtccgattcgctatttcgaccactcc aaggccttcgatatctggggccagggaaccatggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggcag cgggggggcggaagcggcggcgggggttcatcctcggagctgactcaggaccccgccgtg tccgtggctctgggacagaccgtgcgcatcacatgccagggagattccctgcggtcgtactacg cctcctggtaccagcagaaaccgggccaggcccccgtcctcgtgatctacggaaagaacaac aggccttcgggtatcccagaccggttcagcggcagctccagcggaaacaccgcaagcctcac tattaccggggcccaggctgaggacgaggccgactactaccggaactcccgcgactcctcgg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		gcaatccgtacgtctttggtactgggaccaaggtcaccgtgctgaccactaccccagcaccga ggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtag acccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg cccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt cggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagagg aggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaa attcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-25 AA	346	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycaremddssgpdywgqgtlvtvssggggsg gggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiyev snrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvfgtgtkltvl
scFv CAR22-25 NT	347	caagtgcagctcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcct gcaaggcatccggctacacgttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggcc aaggcctggagtggatggggatcattaacccaagcggaggaagcactagctacgcgcagaa gtttcagggccgcgtgaccatgaccagggatacttccatctccaccgcttacatggaactgtcgc ggctgagaagcgacgacacagccgtgtactactgtgcccgggaaatggacgactcctccggg cctgattactggggacaggggactctggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggatcgggggc ggaggttccggcggaggggggctcacagtccgcgctgacccagccggccagcgtgtcaggat caccgggccagagcatcaccatttcctgcaccggaacctcatcggacgtcggcggatataact acgtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctcatgatctacgaggtgtcca atagacccagcggagtgtcgaaccggttcagcgggtccaagtcgggaaacaccgccagcttg accatctctggactgcaagccgaggacgaagccgattactactgctcctcgtatacttcctcctca accttgtgttcggaactggcactaagctgaccgtgctc
scFv soluble CAR22-25 NT	348	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcagctcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgca aggcatccggctacacgttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggccaag gcctggagtggatggggatcattaacccaagcggaggaagcactagctacgcgcagaagttt cagggccgcgtgaccatgaccagggatacttccatctccaccgcttacatggaactgtcgcgg ctgagaagcgacgacacagccgtgtactactgtgcccgggaaatggacgactcctccgggcc tgattactggggacaggggactctggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggatcgggggcgg aggttccggcggaggggggctcacagtccgcgctgacccagccggccagcgtgtcaggatca ccgggccagagcatcaccatttcctgcaccggaacctcatcggacgtcggcggatataactac gtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctcatgatctacgaggtgtccaat agacccagcggagtgtcgaaccggttcagcgggtccaagtcgggaaacaccgccagcttga ccatctctggactgcaagccgaggacgaagccgattactactgctcctcgtatacttcctcctcaa cccttgtgttcggaactggcactaagctgaccgtgctcggatcgcaccaccatcaccatcatcat cac
scFv soluble CAR22-25 AA	349	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycaremddssgpd ywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvs wyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlv fgtgtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-25 completo AA	350	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycaremddssgpd ywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvs wyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlv fgtgtkltvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlll slvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgq nqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkge rrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-25 completo NT	351	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcagctcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggtgcttccgtgaaagtgtcctgca aggcatccggctacacgttcacctcctactacatgcattgggtccgccaagcccccggccaag gcctggagtggatggggatcattaacccaagcggaggaagcactagctacgcgcagaagttt cagggccgcgtgaccatgaccagggatacttccatctccaccgcttacatggaactgtcgcgg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ctgagaagcgacgacacagccgtgtactactgtgcccgggaaatggacgactcctccgggcc tgattactggggacaggggactctggtcaccgtgtcgtccggtggaggcggatcgggggcgg aggttccggcggaggggctcacagtccgcgctgacccagccggccagcgtgtcaggatca ccgggccagagcatcaccatttcctgcaccggaacctcatcggacgtcggcggatataactac gtgtcgtggtaccagcagcaccctggaaaggccccgaagctcatgatctacgaggtgtccaat agacccagcggagtgtcgaaccggttcagcgggtccaagtcgggaaacaccgccagcttga ccatctctggactgcaagccgaggacgaagccgattactactgctcctcgtatacttcctcctcaa cccttgtgttcggaactggcactaagctgaccgtgctcaccactaccccagcaccgaggccac ccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagacccgc agctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctct ggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaag aagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacg gctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagc cgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatc ttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgg gcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggat aagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggc cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacat gcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-26 AA	352	evqlvesgaevkkpgeslkisckgsgysftgswigwgrqmpgkglewmgiiypgdsdtrysp sfqgqvtisadksistaylqwsslkasdtamyycargflrggdccgaldiwgqgtmvtvssggg gsggggsggggsdivmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylqkpgqspqll iylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtppwtfgqgtkleikr
scFv CAR22-26 NT	353	gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagaaagcctgaagatct cgtgcaaagggagcggatactcgttcaccggatcatggattggatggggccgccagatgcctg gaaagggtctggaatggatgggaatcatctacccgggggactccgatactcggtactccccga gctttcagggccaggtcaccatctccgccgacaagtccatctccactgcgtatttgcagtggagc tcactgaaggcctcggacaccgctatgtactactgcgcccgcggtttcctgaggggcggagatt gttgcggcgcccttgatatctggggccaggggaccatggtgaccgtgtcctccggtggtggcgg ctccggcggaggagggtccgggggaggaggctccgacattgtgatgacccagagccccctgt ccctgcccgtgactcctggggagccagcctcgatcagctgccggtcgtcccagtccttctgcac tccaacggctacaactatctcgattggtacctccagaagcctggtcaaagcccgcagctgctga tctacctcggttcaaacagagcttccggggtgccggacagattcagcggatctggatcgggcac agacttcacgctcaagatttcccgcgtggaggccgaggacgtcggcgtgtactactgtatgcaa gcgctgcagaccccgccctggactttcggacaaggaaccaagctggagattaagcgg
scFv soluble CAR22-26 NT	354	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagaaagcctgaagatctcgt gcaaagggagcggatactcgttcaccggatcatggattggatggggccgccagatgcctgga aagggtctggaatggatgggaatcatctacccgggggactccgatactcggtactccccgagc tttcagggccaggtcaccatctccgccgacaagtccatctccactgcgtatttgcagtggagctc actgaaggcctcggacaccgctatgtactactgcgcccgcggtttcctgaggggcggagattgtt gcggcgcccttgatatctggggccaggggaccatggtgaccgtgtcctccggtggtggcggctc cggcggaggagggtccgggggaggaggctccgacattgtgatgacccagagccccctgtcc ctgcccgtgactcctggggagccagcctcgatcagctgccggtcgtcccagtcccttctgcactc caacggctacaactatctcgattggtacctccagaagcctggtcaaagcccgcagctgctgatc tacctcggttcaaacagagcttccggggtgccggacagattcagcggatctggatcgggcaca gacttcacgctcaagatttcccgcgtggaggccgaggacgtcggcgtgtactactgtatgcaag cgctgcagaccccgccctggactttcggacaaggaaccaagctggagattaagcggggatcg caccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-26 AA	355	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgeslkisckgsgysftgswigwgrqmpgkg lewmgiiypgdsdtryspsfqgqvtisadksistaylqwsslkasdtamyycargflrggdccga ldiwgqgtmvtvssggggsggggsggggsdivmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsng ynyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtp pwtfgqgtkleikrgshhhhhhhh
CAR22-26 completo AA	356	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgeslkisckgsgysftgswigwgrqmpgkg lewmgiiypgdsdtryspsfqgqvtisadksistaylqwsslkasdtamyycargflrggdccga ldiwgqgtmvtvssggggsggggsggggsdivmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsng ynyldwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtp pwtfgqgtkleikrtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplag tcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapa

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseig mkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-26 completo NT	357	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagaaagcctgaagatctcgt gcaaagggagcggatactcgttcaccggatcatggattggatggggccgccagatgcctgga aagggtctggaatggatgggaatcatctacccgggggactccgatactcggtactccccgagc tttcagggccaggtcaccatctccgccgacaagtccatctccactgcgtatttgcagtggagctc actgaaggcctcggacaccgctatgtactactgcgcccgcggtttcctgaggggcggagattgtt gcggcgcccttgatatctggggccaggggaccatggtgaccgtgtcctccggtggtggcggctc cggcggaggagggtccgggggaggaggctccgacattgtgatgacccagagccccctgtcc ctgcccgtgactcctggggagccagcctcgatcagctgccggtcgtcccagtcccttctgcactc caacggctacaactatctcgattggtacctccagaagcctggtcaaagcccgcagctgctgatc tacctcggttcaaacagagcttccggggtgccggacagattcagcggatctggatcgggcaca gacttcacgctcaagatttcccgcgtggaggccgaggacgtcggcgtgtactactgtatgcaag cgctgcagaccccgccctggactttcggacaaggaaccaagctggagattaagcggaccact accccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgt ccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgc gatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctt actgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacc agctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggaga ggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgta caacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaa cgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagga cacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-27 AA	358	qvqlqesgpglvkpsetlsltcsvsggsinsyywswirqapgkglewiaftshsgnvkynpsltg rvtiavdtsknqfylevtsvtaadtavyfcargldplfaydafeiwglgtmvtvssggggsggggs ggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylqkpgqspqlliylgsnrasg vpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqvlqtppltfgggtkvdikr
scFv CAR22-27 NT	359	caagtgcaacttcaggaatcaggccccggacttgtgaaaccatcagaaactctctccctcactt gctccgtgagcgggggtccatcaactcctactactggtcgtggattagacaggcccctggaaa ggggctggagtggatcgcgttcacttcgcactccggcaacgtcaagtacaacccgtccctgac cggaagagtgaccattgccgtggatacctccaagaaccagttctacctggaagtcacgtcggt gaccgctgctgacaccgccgtgtacttctgcgcacgggggctggacccattgtttgcctacgatg cgttcgaaatctgggggctcggaaccatggtcactgtgtcctccggcggaggcggcagcggtg gaggaggcagcggaggaggaggttccgagatcgtgctgacccagagcccccctgtccctccc cgtgacccctggagaaccggccagcatttcctgccggtcgagccagtcaccgcaactgctcatctacc tgggaagcaaccgcgcctcgggtgtcccggaccgcttctccggctcggggtctggcactgactt cacactgaagatctccagggtggaggccgaggacgtgggagtgtattactgtatgcaagtgctgcagac gcgcctctgaccttcggcggtggaactaaggtcgacatcaagcgg
scFv soluble CAR22-27 NT	360	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaacttcaggaatcaggccccggacttgtgaaaccatcagaaactctctccctcacttgctc cgtgagcgggggtccatcaactcctactactggtcgtggattagacaggcccctggaaaggg gctggagtggatcgcgttcacttcgcactccggcaacgtcaagtacaacccgtccctgaccgg aagagtgaccattgccgtggatacctccaagaaccagttctacctggaagtcacgtcggtgacc gctgctgacaccgccgtgtacttctgcgcacgggggctggacccattgtttgcctacgatgcgttc gaaatctgggggctcggaaccatggtcactgtgtcctccggcggaggcggcagcggtggagg aggcagcggaggaggaggttccgagatcgtgctgacccagagcccccctgtccctccccgtga cccctggagaaccggccagcatttcctgccggtcgagccagtccctgttgcattcaaatggctac aactacctggattggtatctgcagaagcccggccagtcaccgcaactgctcatctacctgggaa gcaaccgcgcctcgggtgtcccggaccgcttctccggctcggggtctggcactgacttcacact gaagatctccagggtggaggccgaggacgtgggagtgtattactgtatgcaagtgctgcagac cccgcctctgaccttcggcggtggaactaaggtcgacatcaagcggggatcgcaccaccatc accatcatcatcac
scFv soluble CAR22-27 AA	361	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsetlsltcsvsggsinsyywswirqapgkgle wiaftshsgnvkynpsltgrvtiavdtsknqfylevtsvtaadtavyfcargldplfaydafeiwglgt mvtvssggggsggggsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylq kpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqvlqtppltfgggtkv dikrgshhhhhhhh

Nombre	SEQ ID	Sequencias
CAR22-27 completo AA	362	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsetlsltcsvsggsinsyywswirqapgkgle wiaftshsgnvkynpsltgrvtiavdtsknqfylevtsvtaadtavyfcargldplfaydafeiwglgt mvtvssggggsggggsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylq kpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqvlqtppltfgggtkv dikrtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitl yckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqly nelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgk ghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-27 completo NT	363	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcaacttcaggaatcaggccccggacttgtgaaaccatcagaaactctctccctcacttgctc cgtgagcgggggtccatcaactcctactactggtcgtggattagacaggcccctggaaaggg gctggagtggatcgcgttcacttcgcactccggcaacgtcaagtacaacccgtccctgaccgg aagagtgaccattgccgtggatacctccaagaaccagttctacctggaagtcacgtcggtgacc gctgctgacaccgccgtgtacttctgcgcacgggggctggacccattgtttgcctacgatgcgttc gaaatctgggggctcggaaccatggtcactgtgtcctccggcggaggcggcagcggtggagg aggcagcggaggaggaggttccgagatcgtgctgacccagagccccctgtccctccccgtga cccctggagaaccggccagcatttcctgccggtcgagccagtccctgttgcattcaaatggctac aactacctggattggtatctgcagaagcccggccagtcaccgcaactgctcatctacctgggaa gcaaccgcgcctcgggtgtcccggaccgcttctccggctcggggtctggcactgacttcacact gaagatctccagggtggaggccgaggacgtgggagtgtattactgtatgcaagtgctgcagac cccgcctctgaccttcggcggtggaactaaggtcgacatcaagcggaccactaccccagcac cgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcat gtagacccgcagctggtggggccgtgcataccccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacattt gggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgc ggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaag aggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgt gaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaac gaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggac ccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagct ccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaag aggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatga cgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-28 AA	364	evqlvesggglvkpggslrlscaasgftfsdyymswirqapgkglewvsyisssgstiyyadsv kgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycarddfwsgsvdywgqgtlvtvssggggsgggg sggggsggggssyvltqppsvsvapgktatitcggtnigsknvhwyqqkpgqapvlaiyydsd rpsgiperfsgsnsgntatltisrveagdeadyfcqvwdsssdhwvfgggtkltvl
scFv CAR22-28 NT	365	gaagtgcagttggtggaatctggtggtggactcgtgaaacctggaggaagcttgcgcctgtcttg cgcggcctccggcttcactttctcggattactacatgtcctggattagacaggctccggggaagg gactcgaatgggtgtcctacatttcatcaagcggcagcaccatctactatgcggactccgtgaag gggcggttcactatttcccgggataacgcaaagaacagcctgtaccttcaaatgaattcactgc gcgccgaggacaccgccgtgtactattgcgcccgggatgacttctggtcggggtccgtggacta ctggggccaggggaccctggtcaccgtgtcctcgggaggaggaggaagcgggggaggcgg ttccgggggcggcggctcgggcggcggtggctccagctacgtgctcacccagccgccctccgt gtccgtggccccgggaaagaccgccaccatcacctgtggaggaacgaacatcggctccaag aacgtccattggtaccagcagaagcccggacaggcccccgtgctggcaatctactacgactcc gaccgcccaagcggtatccctgaaaggttctccggctccaacagcggaaacactgcgactct gaccatctcaagagtggaggctggcgatgaggccgactacttctgccaagtctgggactcgtcc tcggaccactgggtgtttgggggaggcaccaagctgactgtcctg
scFv soluble CAR22-28 NT	366	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggaatctggtggtggactcgtgaaacctggaggaagcttgcgcctgtcttgcgc ggcctccggcttcactttctcggattactacatgtcctggattagacaggctccggggaagggact cgaatgggtgtcctacatttcatcaagcggcagcaccatctactatgcggactccgtgaagggg cggttcactatttcccgggataacgcaaagaacagcctgtaccttcaaatgaattcactgcgcgc cgaggacaccgccgtgtactattgcgcccgggatgacttctggtcggggtccgtggactactgg ggccaggggaccctggtcaccgtgtcctcgggaggaggaggaagcgggggaggcggttcc gggggcggcggctcgggcggcggtggctccagctacgtgctcacccagccgccctccgtgtc cgtggccccgggaaagaccgccaccatcacctgtggaggaacgaacatcggctccaagaa cgtccattggtaccagcagaagcccggacaggcccccgtgctggcaatctactacgactccga ccgcccaagcggtatccctgaaaggttctccggctccaacagcggaaacactgcgactctgac catctcaagagtggaggctggcgatgaggccgactacttctgccaagtctgggactcgtcctcg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		gaccactgggtgtttgggggaggcaccaagctgactgtcctgggatcgcaccaccatcaccat catcatcac
scFv soluble CAR22-28 NT	367	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscaasgftfsdyymswirqapgkgle wvsyisssgstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycarddfwsgsvdywg qgtlvtvssggggsggggsggggsggggssyvltqppsvsvapgktatitcggtnigsknvhw yqqkpgqapvlaiyydsdrpsgiperfsgsnsgntatltisrveagdeadyfcqvwdsssdhw vfgggtkltvlghhhhhhhh
CAR22-28 completo AA	368	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvkpggslrlscaasgftfsdyymswirqapgkgle wvsyisssgstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyycarddfwsgsvdywg qgtlvtvssggggsggggsggggsggggssyvltqppsvsvapgktatitcggtnigsknvhw yqqkpgqapvlaiyydsdrpsgiperfsgsnsgntatltisrveagdeadyfcqvwdsssdhw vfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgv lllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-28 completo NT	369	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggaatctggtggtggactcgtgaaacctggaggaagcttgcgcctgtcttgcgc ggcctccggcttcactttctcggattactacatgtcctggattagacaggctccggggaagggact cgaatgggtgtcctacatttcatcaagcggcagcaccatctactatgcggactccgtgaagggg cggttcactatttcccgggataacgcaaagaacagcctgtaccttcaaatgaattcactgcgcgc cgaggacaccgccgtgtactattgcgcccgggatgacttctggtcggggtccgtggactactgg ggccaggggaccctggtcaccgtgtcctcgggaggaggaggaagcgggggaggcggttcc gggggcggcggctcgggcggcggtggctccagctacgtgctcacccagccgccctccgtgtc cgtggccccgggaaagaccgccaccatcacctgtggaggaacgaacatcggctccaagaa cgtccattggtaccagcagaagcccggacaggcccccgtgctggcaatctactacgactccga ccgcccaagcggtatccctgaaaggttctccggctccaacagcggaaacactgcgactctgac catctcaagagtggaggctggcgatgaggccgactacttctgccaagtctgggactcgtcctcg gaccactgggtgtttgggggaggcaccaagctgactgtcctgaccactaccccagcaccgag gccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtaga cccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggc ccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtc ggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagagga ggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaat tcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaact caatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccaga aatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaa aggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggca aaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctct tcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-29 AA	370	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycareddssgytspfdywgqgtlvtvssgggg sggggsggggsgggrssyeltqppsvsvapgetasiacgghnirsknvhwyqqkpgqapvl visydgdrpsgiperfsgsnlgstatltisrveagdeadyycqvwdsdsdhyvfgtgtkvtvl
scFv CAR22-29 NT	371	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcggggtacacattcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggc cagggactggaatggatgggaatcattaacccgtccggcggatcgaccagctacgcccaga agtttcagggacgcgtgaccatgacccgggacactagcaccagcactgtgtacatggaactg agctcactgcggtccgaggacactgcggtgtactattgcgcccgggaggacgattcctccgggt acacttcgcccttcgactattggggacagggaaccttggtcaccgtgtcatcgggtggtggagg aagcggaggaggcggctccggcggcgggggttcaggcggtggcagaagctcctacgaact gacccagcctccgtccgtgtccgtggcccccggcgaaaccgcctcgatcgcgtgtggagggc acaatattcggagcaagaacgtgcattggtaccagcagaagccgggacaggcaccagtgct cgtgatctcctacgatggggacaggccttctggcatccctgagagattcagcgggtccaacctg ggctccactgctaccctgaccatctcgcgcgtggaagccggggatgaggccgactactactgc caagtctgggactccgacagcgatcactacgtgttcggaactggaaccaaggtcacggtgctt
scFv soluble CAR22-29 - nt	372	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcggggtacacattcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccag ggactggaatggatgggaatcattaacccgtccggcggatcgaccagctacgcccagaagttt cagggacgcgtgaccatgacccgggacactagcaccagcactgtgtacatggaactgagctc

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		actgcggtccgaggacactgcggtgtactattgcgcccgggaggacgattcctccgggtacact tcgcccttcgactattggggacagggaaccttggtcaccgtgtcatcgggtggtggaggaagcg gaggaggcggctccggcggcgggggttcaggcggtggcagaagctcctacgaactgaccc agcctccgtccgtgtccgtggccccccggcgaaaccgcctcgatcgcgtgtggagggcacaata ttcggagcaagaacgtgcattggtaccagcagaagccgggacaggcaccagtgctcgtgatc tcctacgatggggacaggccttctggcatccctgagagattcagcgggtccaacctgggctcca ctgctaccctgaccatctcgcgcgtggaagccggggatgaggccgactactactgccaagtct gggactccgacagcgatcactacgtgttcggaactggaaccaaggtcacggtgcttggatcgc accaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-29 AA	373	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycareddssgytsp fdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsgggrssyeltqppsvsvapgetasiacgghnir sknvhwyqqkpgqapvlvisydgdrpsgiperfsgsnlgstatltisrveagdeadyycqvwd sdsdhyvfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-29 completo AA	374	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycareddssgytsp fdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsgggrssyeltqppsvsvapgetasiacgghnir sknvhwyqqkpgqapvlvisydgdrpsgiperfsgsnlgstatltisrveagdeadyycqvwd sdsdhyvfgtgtkvtvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwap lagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeays eigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-29 completo NT	375	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcggggtacacattcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccag ggactggaatggatgggaatcattaacccgtccggcggatcgaccagctacgcccagaagttt cagggacgcgtgaccatgacccgggacactagcaccagcactgtgtacatggaactgagctc actgcggtccgaggacactgcggtgtactattgcgcccgggaggacgattcctccgggtacact tcgcccttcgactattggggacagggaaccttggtcaccgtgtcatcgggtggtggaggaagcg gaggaggcggctccggcggcgggggttcaggcggtggcagaagctcctacgaactgaccc agcctccgtccgtgtccgtggccccccggcgaaaccgcctcgatcgcgtgtggagggcacaata ttcggagcaagaacgtgcattggtaccagcagaagccgggacaggcaccagtgctcgtgatc tcctacgatggggacaggccttctggcatccctgagagattcagcgggtccaacctgggctcca ctgctaccctgaccatctcgcgcgtggaagccggggatgaggccgactactactgccaagtct gggactccgacagcgatcactacgtgttcggaactggaaccaaggtcacggtgcttaccacta ccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcg aactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtac aacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaac gcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggac acctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-30 AA	376	evqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapgqglewmgwinpnsggtny aqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycarepassswygyyyymdvwgkgtlvtvs sggggsggggsggggsggggsdiqmtqspssllsasvgdrvtitcrasqsintylnwyqqkpg kppkllivaasnlqsgvpsrfsgsgsgthftltisslqpddfatyycqqsysslltfgggtkleik
scFv CAR22-30 NT	377	gaagtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagcatcagtcaaagtgt cctgcaaggcctccgggtacactttcactggttactacatgcattgggtgcgccaggcgcccgg acaaggactcgagtggatgggctggattaaccccaactccggcggaaccaactacgcccag aagttccagggtagagtgacgatgactcgggacaccagcatctccaccgcgtacatggagct gtcgagactgaggtccgacgataccgccgtgtactactgcgcccgggaaccggcttcctcgtct tggtacggatattactattacatggatgtctggggaaagggaacacttgtcactgtgtccagcggt ggcggaggcagcggcggtggagggtccggcggcggcggatcgggaggggaggcagcg acatccagatgactcagtccccatcctcgctgtcggctagcgtgggcgaccgcgtgaccattac ctgtcgggccagccaatccatcaacacctacctgaactggtaccagcagaagccggggaag cctccaaagctgctcatctacgcggcctcaaatctgcaatccggggtgccttcccggttctccggt tccggttcggggacccacttcactctgaccattagctcactgcaaccggacgactttgccaccta

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ctactgccagcagagctactcctccctcctgaccttcggcggaggaaccaagctcgagatcaa g
scFv soluble CAR22-30 NT	378	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagcatcagtcaaagtgtcctg caaggcctccgggtacactttcactggttactacatgcattgggtgcgccaggcgcccggacaa ggactcgagtggatgggctggattaaccccaactccggcggaaccaactacgcccagaagtt ccagggtagagtgacgatgactcgggacaccagcatctccaccgcgtacatggagctgtcga gactgaggtccgacgataccgccgtgtactactgcgcccgggaaccggcttcctcgtcttggta cggatattactattacatggatgtctggggaaagggaacacttgtcactgtgtccagcggtggcg gaggcagcggcggtggagggtccggcggcggcggatcgggaggggggaggcagcgacatc cagatgactcagtccccatcctcgctgtcggctagcgtgggcgaccgcgtgaccattacctgtcg ggccagccaatccatcaacacctacctgaactggtaccagcagaagccggggaagcctcca aagctgctcatctacgcggcctcaaatctgcaatccggggtgccttcccggttctccggttccggtt cggggacccacttcactctgaccattagctcactgcaaccggacgactttgccacctactactgc cagcagagctactcctccctcctgaccttcggcggaggaaccaagctcgagatcaagggatc gcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-30 AA	379	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapgq glewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycarepassswy gyyyymdvwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsslsasvgdrvtit crasqsintylnwyqqkpgkppklliyaasnlqsgvpsrfsgsgsgthftltisslqpddfatyycq qsyssslltfgggtkleikgshhhhhhhh
CAR22 -30 completo AA	380	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgaevkkpgasvkvsckasgytftgyymhwvrqapgq glewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsddtavyycarepassswy gyyyymdvwgkgtlvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsslsasvgdrvtit crasqsintylnwyqqkpgkppklliyaasnlqsgvpsrfsgsgsgthftltisslqpddfatyycq qsyssslltfgggtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwap lagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsada paykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeays eigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-30 completo NT	381	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaa gtgcagttggtggaatcaggagcagaagtcaagaaacccggagcatcagtcaaagtgtcctg caaggcctccgggtacactttcactggttactacatgcattgggtgcgccaggcgcccggacaa ggactcgagtggatgggctggattaaccccaactccggcggaaccaactacgcccagaagtt ccagggtagagtgacgatgactcgggacaccagcatctccaccgcgtacatggagctgtcga gactgaggtccgacgataccgccgtgtactactgcgcccgggaaccggcttcctcgtcttggta cggatattactattacatggatgtctggggaaagggaacacttgtcactgtgtccagcggtggcg gaggcagcggcggtggagggtccggcggcggcggatcgggaggggggaggcagcgacatc cagatgactcagtccccatcctcgctgtcggctagcgtgggcgaccgcgtgaccattacctgtcg ggccagccaatccatcaacacctacctgaactggtaccagcagaagccggggaagcctcca aagctgctcatctacgcggcctcaaatctgcaatccggggtgccttcccggttctccggttccggtt cggggacccacttcactctgaccattagctcactgcaaccggacgactttgccacctactactgc cagcagagctactcctccctcctgaccttcggcggaggaaccaagctcgagatcaagaccact accccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgt ccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgc gatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttt actgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacc agctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggaga ggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgta caacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaa cgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagga cacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-31 AA	382	Qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsydinwvrqatgqglewmgwmnpnsgntgy aqkfqgrvtmtrntsistaymelsslrsedtavyycargdsnywsyygmdvwgqgtlvtvssg gggsggggsggggsggggsqsvltqprsvsgspgqsvtisctgtssdvggynyvswyqqhp geapkliiydadkrpsgisnrfssgksgntasltisglqvedeadyyccsyaggstwvfgggtkvt vl
scFv CAR22-31 NT	383	Caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtc ctgcaaggcctcgggttacaccttcacctcctacgacattaactgggtgcgccaggccactggg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		cagggactggaatggatgggctggatgaaccctaactcgggcaacaccggctatgcccaga agtttcagggacgcgtgacgatgacccggaatacctccatctcaaccgcctacatggaactga gcagcctgaggtccgaggatactgcagtgtactactgcgctcggggagactccaactattggtc ctactacggaatggacgtgtggggccagggaaccctcgtcactgtgtcgagcgggggaggcg gttcagggggcggcggaagcggaggcggagggtccggcggaggaggttctcagagcgtgc tgactcaaccgagatccgtgtccgggagcccgggccagtcagtgactatctcgtgcaccggga ccagctccgacgtgggagggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagcaccccggagaggc gccaaagttgattatctacgacgccgataagcgcccttcgggaatctccaaccggttctcctccg ggaagtccggcaacactgcctccctgaccatcagcggacttcaagtggaggacgaagcggat tactactgctgttcatacgccggcggatcgacctgggtgttcggcggtggtaccaaggtcacagt gctg
scFv soluble CAR22-31 NT	384	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcgggttacaccttcacctcctacgacattaactgggtgcgccaggccactgggcag ggactggaatggatgggctggatgaaccctaactcgggcaacaccggctatgcccagaagttt cagggacgcgtgacgatgacccggaatacctccatctcaaccgcctacatggaactgagcag cctgaggtccgaggatactgcagtgtactactgcgctcggggagactccaactattggtcctact acggaatggacgtgtggggccagggaaccctcgtcactgtgtcgagcgggggaggcggttca gggggcggcggaagcggaggcggagggtccggcggaggaggttctcagagcgtgctgact caaccgagatccgtgtccgggagcccgggccagtcagtgactatctcgtgcaccgggaccag ctccgacgtgggagggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagcaccccggagaggcgcca aagttgattatctacgacgccgataagcgcccttcgggaatctccaaccggttctcctccgggaa gtccggcaacactgcctccctgaccatcagcggacttcaagtggaggacgaagcggattacta ctgctgttcatacgccggcggatcgacctgggtgttcggcggtggtaccaaggtcacagtgctg gatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-31 AA	385	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsydinwvrqatgqgl ewmgwmnpnsgntgyaqkfqgrvtmtrntsistaymelsslrsedtavyycargdsnywsy ygmdvwgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsqsvltqprsvsgspgqsvtisctgts sdvggynyvswyqqhpgeapkliiydadkrpsgisnrfssgksgntasltisglqvedeadyyc csyaggstwvfgggtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-31 completo AA	386	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsydinwvrqatgqgl ewmgwmnpnsgntgyaqkfqgrvtmtrntsistaymelsslrsedtavyycargdsnywsy ygmdvwgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsqsvltqprsvsgspgqsvtisctgts sdvggynyvswyqqhpgeapkliiydadkrpsgisnrfssgksgntasltisglqvedeadyyc csyaggstwvfgggtkvtvlttttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyi waplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsr sadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkma eayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-31 completo NT	387	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcgggttacaccttcacctcctacgacattaactgggtgcgccaggccactgggcag ggactggaatggatgggctggatgaaccctaactcgggcaacaccggctatgcccagaagttt cagggacgcgtgacgatgacccggaatacctccatctcaaccgcctacatggaactgagcag cctgaggtccgaggatactgcagtgtactactgcgctcggggagactccaactattggtcctact acggaatggacgtgtggggccagggaaccctcgtcactgtgtcgagcgggggaggcggttca gggggcggcggaagcggaggcggagggtccggcggaggaggttctcagagcgtgctgact caaccgagatccgtgtccgggagcccgggccagtcagtgactatctcgtgcaccgggaccag ctccgacgtgggagggtacaactacgtgtcgtggtaccagcagcaccccggagaggcgcca aagttgattatctacgacgccgataagcgcccttcgggaatctccaaccggttctcctccgggaa gtccggcaacactgcctccctgaccatcagcggacttcaagtggaggacgaagcggattacta ctgctgttcatacgccggcggatcgacctgggtgttcggcggtggtaccaaggtcacagtgctg accactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcg cctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcg gctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggca gaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagc ggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		gggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-32 AA	388	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqglewmgwisayngntnya qklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycasfsssdsydywgqgtlvtvssggggsggg gsggggsggggseivltqspatlsvspgeratlscrasqsvtsnlawyqqkpgqaprlliyaastr atgiparfsgsgsgteftltissmqsedfavyfcqqyhtwppltfgggtkveikt
scFv CAR22-32 NT	389	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtc gtgcaaggcctccgggtataccttcacttcctacggcattagctgggtgcggcaggcccccggc caagggctggagtggatgggctggatcagcgcctacaacggaaacaccaactacgcccag aagctgcagggacgcgtgaccatgaccactgacacctccacttcgaccgcgtacatggagct cagatcactgcgctccgacgataccgccgtgtactactgcgcctccttctcctcctccgactccta cgactactggggacaggggactctggtcactgtgtcgtccggcggcggcggaagcggtggcg gaggcagcggtggaggcggttcgggaggaggagggtccgaaatcgtgctgacccagtcccc cgctacccctttccgtgagcccgggggaacgggccaccctgtcttgccgcgcgtcacaaagcgt gacttcgaacctggcctggtaccagcagaagccggggcaggccccgagattgctcatctatgc cgcgagcaccagggcaaccggaattcctgcccggttttccggttccgggtcgggcactgagttc accctgacaatcagctcaatgcagtccgaggatttcgctgtgtacttctgtcaacagtaccacac ctggcctcccctgacgttcggaggcggaaccaaggtcgaaatcaagacc
scFv soluble CAR22-32 NT	390	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgc aaggcctccgggtataccttcacttcctacggcattagctgggtgcggcaggcccccggccaa gggctggagtggatgggctggatcagcgcctacaacggaaacaccaactacgcccagaag ctgcagggacgcgtgaccatgaccactgacacctccacttcgaccgcgtacatggagctcag atcactgcgctccgacgataccgccgtgtactactgcgcctccttctcctcctccgactcctacga ctactggggacaggggactctggtcactgtgtcgtccggcggcggcggaagcggtggcggag gcagcggtggaggcggttcgggaggaggagggtccgaaatcgtgctgacccagtccccgc tacccctttccgtgagcccgggggaacgggccaccctgtcttgccgcgcgtcacaaagcgtgact tcgaacctggcctggtaccagcagaagccggggcaggccccgagattgctcatctatgccgc gagcaccagggcaaccggaattcctgcccggttttccggttccgggtcgggcactgagttcacc ctgacaatcagctcaatgcagtccgaggatttcgctgtgtacttctgtcaacagtaccacacctgg cctcccctgacgttcggaggcggaaccaaggtcgaaatcaagaccggatcgcaccaccatc accatcatcatcac
scFv soluble CAR22-32 AA	391	Malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqgl ewmgwisayngntnyaqklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycasfsssdsydyw gqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivltqspatlsvspgeratlscrasqsvtsnla wyqqkpgqaprlliyaastratgiparfsgsgsgteftltissmqsedfavyfcqqyhtwppltfgg gtkveiktgshhhhhhhh
CAR22-32 completo AA	392	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsygiswvrqapgqgl ewmgwisayngntnyaqklqgrvtmttdtststaymelrslrsddtavyycasfsssdsydyw gqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivltqspatlsvspgeratlscrasqsvtsnla wyqqkpgqaprlliyaastratgiparfsgsgsgteftltissmqsedfavyfcqqyhtwppltfgg gtkveiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlls lvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerr rgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-32 completo NT	393	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgc aaggcctccgggtataccttcacttcctacggcattagctgggtgcggcaggcccccggccaa gggctggagtggatgggctggatcagcgcctacaacggaaacaccaactacgcccagaag ctgcagggacgcgtgaccatgaccactgacacctccacttcgaccgcgtacatggagctcag atcactgcgctccgacgataccgccgtgtactactgcgcctccttctcctcctccgactcctacga ctactggggacaggggactctggtcactgtgtcgtccggcggcggcggaagcggtggcggag gcagcggtggaggcggttcgggaggaggagggtccgaaatcgtgctgacccagtccccgc tacccctttccgtgagcccgggggaacgggccaccctgtcttgccgcgcgtcacaaagcgtgact tcgaacctggcctggtaccagcagaagccggggcaggccccgagattgctcatctatgccgc gagcaccagggcaaccggaattcctgcccggttttccggttccgggtcgggcactgagttcacc ctgacaatcagctcaatgcagtccgaggatttcgctgtgtacttctgtcaacagtaccacacctgg cctcccctgacgttcggaggcggaaccaaggtcgaaatcaagaccactaccccagcaccga ggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtag acccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt cggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagagg aggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaa attcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccag aaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgct cttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-33 AA	394	qvnlresgpalvkptqtltltctfsgfslntfgmsvswirqppgkalewlalidwdddkyystslrtrlti skdtaknqvvlrmtnmdpmdtatyycariyggdrtntqapyffdlwgqgtlvtvssggggsggg gsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyldwylqkpgqspqlliylgsn rasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtpwtfgqgtkleik
scFv CAR22-33 NT	395	caagtcaacctcagagaatcaggtcctgccctcgtcaaacctacccagaccctcaccttgacct gtaccttctccgggttctcgctgaacaccttcgggatgtccgtgagctggattaggcagcccccg ggaaaggccctggagtggctggccctgatcgattgggatgacgacaagtactactccacctca ctccgcactcgcctgaccatctcaaaggacactgccaagaaccaagtggtgctgcggatgact aacatggacccgatggacaccgccacctattactgcgcccggatctacggaggcgacagaa ccaacactcaggccccctacttcttcgatctgtggggacagggcactcttgtgaccgtgtcctcgg gcggaggaggctccggtggaggggatcaggaggaggcggcagcgacgtcgtgatgactc aatccccgctgtccttgcctgtgaccctggcgaacccgcgtccattagctgccggagcagcca gtccctcctgcactcgaacggatacaactacctggattggtatctgcagaagcccggccagtcc ccacaactcctgatctacctgggctctaatcgggcatccggggtcccggatcgcttcagcggttc gggctcgggtaccgacttcacgctgaagatttccagggtggaagctgaggacgtgggagtgta ctactgcatgcaggcgcttcagactccatggacatttggacaggggaccaagctggagatcaa g
CAR22-33 - scFv soluble NT	396	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtcaacctcagagaatcaggtcctgccctcgtcaaacctacccagaccctcaccttgacctgta ccttctccgggttctcgctgaacaccttcgggatgtccgtgagctggattaggcagcccccggga aaggccctggagtggctggccctgatcgattgggatgacgacaagtactactccacctcactcc gcactcgcctgaccatctcaaaggacactgccaagaaccaagtggtgctgcggatgactaac atggacccgatggacaccgccacctattactgcgcccggatctacggaggcgacagaacca acactcaggcccctacttcttcgatctgtggggacagggcactcttgtgaccgtgtcctcgggc ggaggaggctccggtggaggggatcaggaggaggcggcagcgacgtcgtgatgactcaa tccccgctgtccttgcctgtgaccctggcgaacccgcgtccattagctgccggagcagccagt ccctcctgcactcgaacggatacaactacctggattggtatctgcagaagcccggccagtcccc acaactcctgatctacctgggctctaatcgggcatccggggtcccggatcgcttcagcggttcgg gctcgggtaccgacttcacgctgaagatttccagggtggaagctgaggacgtgggagtgtacta ctgcatgcaggcgcttcagactccatggacatttggacaggggaccaagctggagatcaagg gatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-33 AA	397	malpvtalllplalllhaarpqvnlresgpalvkptqtltltctfsgfslntfgmsvswirqppgkalewl alidwdddkyystslrtrltiskdtaknqvvlrmtnmdpmdtatyycariyggdrtntqapyffdlw gqgtlvtvssggggsggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyl dwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtpwtf gqgtkleikgshhhhhhhh
CAR22-33 AA completo	398	malpvtalllplalllhaarpqvnlresgpalvkptqtltltctfsgfslntfgmsvswirqppgkalewl alidwdddkyystslrtrltiskdtaknqvvlrmtnmdpmdtatyycariyggdrtntqapyffdlw gqgtlvtvssggggsggggsggggsdvvmtqsplslpvtpgepasiscrssqsllhsngynyl dwylqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtpwtf gqgtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvll lslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-33 completo NT	399	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtcaacctcagagaatcaggtcctgccctcgtcaaacctacccagaccctcaccttgacctgta ccttctccgggttctcgctgaacaccttcgggatgtccgtgagctggattaggcagcccccggga aaggccctggagtggctggccctgatcgattgggatgacgacaagtactactccacctcactcc gcactcgcctgaccatctcaaaggacactgccaagaaccaagtggtgctgcggatgactaac atggacccgatggacaccgccacctattactgcgcccggatctacggaggcgacagaacca acactcaggcccctacttcttcgatctgtggggacagggcactcttgtgaccgtgtcctcgggc

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ggaggaggctccggtggaggggatcaggaggaggcggcagcgacgtcgtgatgactcaa tccccgctgtccttgcctgtgacccctggcgaacccgcgtccattagctgccggagcagccagt ccctcctgcactcgaacggatacaactacctggattggtatctgcagaagcccggccagtcccc acaactcctgatctacctgggctctaatcgggcatccggggtcccggatcgcttcagcggttcgg gctcgggtaccgacttcacgctgaagatttccagggtggaagctgaggacgtgggagtgtacta ctgcatgcaggcgcttcagactccatggacatttggacaggggaccaagctggagatcaaga ccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccc tgcgtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgc ctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatca ctctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-34 AA	400	qvqlqesgpglvkpsgtlsltcavsgasitsrhwwnwvrhspgkglewigqiyhsgtttynpslg srvtisvdksknqislelrsvtaadtatyycvrdylelatyygmdvwgqgttvtvssggggsgggg sggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllysdgynyldwylqkpgqspqlliylgsnras gvpdrfsgsgsgtdftlqisgvetedvgvyycmqalqtqsfgqgtkleik
scFv CAR22-34 NT	401	caagtgcagcttcaagaatcaggacctggcctcgtcaaaccctccggtaccctctccctcacct gtgccgtgtccggggcatctatcacctcccgccactggtggaactgggtcagacactccccggg aaagggattggagtggattggccagatctaccattccggcaccactacttacaacccgtccctg ggctcccgcgtcactatctccgtggacaagtccaagaatcagattagcctggagctgcggtccg tgaccgctgccgataccgcgacctattactgcgtgcgggactacctggagctcgccacgtacta cggaatggacgtctggggccagggcactaccgtgaccgtgtcaagcgggggggcggatcg ggtggtggaggatcgggaggaggagggtcggaaatcgtgctgactcagtccccctgtcgctg cctgtgactcctggggaaccagcctcaattagctgccgctcgagccagtccctgctgtattccga cggatacaactacctggattggtaccttcaaaagcccggccagagcccgcagctgctgatcta cctgggttcaaacagggcctccggcgtgccggatcggttctcgggaagcggtagcgggacag acttcaccctgcaaatcagcggagtggaaactgaggacgtgggcgtgtactactgcatgcagg cgttgcagacccagtcctttggacaaggcaccaagctcgaaatcaag
scFv soluble CAR22-34 NT	402	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcagcttcaagaatcaggacctggcctcgtcaaaccctccggtaccctctccctcacctgtgc cgtgtccggggcatctatcacctcccgccactggtggaactgggtcagacactccccgggaaa gggattggagtggattggccagatctaccattccggcaccactacttacaacccgtccctgggct cccgcgtcactatctccgtggacaagtccaagaatcagattagcctggagctgcggtccgtgac cgctgccgataccgcgacctattactgcgtgcgggactacctggagctcgccacgtactacgg aatggacgtctggggccagggcactaccgtgaccgtgtcaagcgggggggcggatcgggt ggtggaggatcgggaggaggagggtcggaaatcgtgctgactcagtccccctgtcgctgcct gtgactcctggggaaccagcctcaattagctgccgctcgagccagtccctgctgtattccgacg gatacaactacctggattggtaccttcaaaagcccggccagagcccgcagctgctgatctacct gggttcaaacagggcctccggcgtgccggatcggttctcgggaagcggtagcgggacagact tcaccctgcaaatcagcggagtggaaactgaggacgtgggcgtgtactactgcatgcaggcgt tgcagacccagtcctttggacaaggcaccaagctcgaaatcaagggatcgcaccaccatcac catcatcatcac
scFv soluble CAR22-34 AA	403	Malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsgtlsltcavsgasitsrhwwnwvrhspgkgl ewigqiyhsgtttynpslgsrvtisvdksknqislelrsvtaadtatyycvrdylelatyygmdvwg qgttvtvssggggsggggsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllysdgynyldwy lqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlqisgvetedvgvyycmqalqtqsfgqgtkl eikgshhhhhhhh
CAR22-34 completo AA	404	malpvtalllplalllhaarpqvqlqesgpglvkpsgtlsltcavsgasitsrhwwnwvrhspgkgl ewigqiyhsgtttynpslgsrvtisvdksknqislelrsvtaadtatyycvrdylelatyygmdvwg qgttvtvssggggsggggsggggseivltqsplslpvtpgepasiscrssqsllysdgynyldwy lqkpgqspqlliylgsnrasgvpdrfsgsgsgtdftlqisgvetedvgvyycmqalqtqsfgqgtkl eiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlyn elnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkg hdglyqglstatkdtydalhmqalppr

Nombre	SEQ ID	Sequencias
CAR22-34 NT completo	405	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtgcagcttcaagaatcaggacctggcctcgtcaaaccctccggtaccctctccctcacctgtgc cgtgtccggggcatctatcacctcccgccactggtggaactgggtcagacactccccgggaaa gggattggagtggattggccagatctaccattccggcaccactacttacaacccgtccctgggct cccgcgtcactatctccgtggacaagtccaagaatcagattagcctggagctgcggtccgtgac cgctgccgataccgcgacctattactgcgtgcgggactacctggagctcgccacgtactacgg aatggacgtctggggccagggcactaccgtgaccgtgtcaagcgggggggcggatcgggt ggtggaggatcgggaggaggagggtcggaaatcgtgctgactcagtccccctgtcgctgcct gtgactcctggggaaccagcctcaattagctgccgctcgagccagtccctgctgtattccgacg gatacaactacctggattggtaccttcaaaagcccggccagagcccgcagctgctgatctacct gggttcaaacagggcctccggcgtgccggatcggttctcgggaagcggtagcgggacagact tcaccctgcaaatcagcggagtggaaactgaggacgtgggcgtgtactactgcatgcaggcgt tgcagacccagtcctttggacaaggcaccaagctcgaaatcaagaccactaccccagcaccg aggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgta gacccgcagctggtggggccgtgcataccccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgg gcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcgg tcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagag gaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtga aattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacga actcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccca gaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctcca aaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagagg caaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc tcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-35 AA	406	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardlaaagnyyyygmdvwgqgttvtvssg gggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtaritcqgdslrsyftswyhqkpgqapvlviygn nnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedegdyycdsrdssgdhlvfgggtkltvl
scFv CAR22-35 NT	407	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtc gtgcaaggcctccggctataccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggc cagggactggagtggatgggaattatcaacccttcgggcggctccactagctacgcccaaaa gtttcaggggagagtgaccatgactcgggacacctcaacctcgaccgtgtacatggaactgtc gtcactgcggtccgaggacaccgccgtgtactactgcgcgcgcgacttggccgccgcgggga attactactactacggaatggatgtctggggacagggaaccactgtgactgtgtcgtctggtggt ggtggaagcgggggaggaggttcgggcggcggcggaagctcctccgaactgacccaggac cctgcggtgtccgtggccctgggacagaccgcaaggatcacgtgtcagggagacagcctccg ctcctacttcacatcctggtatcatcagaagcccggccaggctccggtgctggtcatctacggaa acaacaacagaccgtccgggattcccgaccggttcagcggctcctcatccggcaacaccgcc tccctgaccatcaccggcgcccaggccgaggacgagggagattactactgcgactcccggg atagcagcggcgatcacctcgtgttcgggggagggactaagcttactgtgctg
scFv soluble CAR22-35 NT	408	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgc aaggcctccggctataccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccag ggactggagtggatgggaattatcaacccttcgggcggctccactagctacgcccaaaagtttc aggggagagtgaccatgactcgggacacctcaacctcgaccgtgtacatggaactgtcgtcac tgcggtccgaggacaccgccgtgtactactgcgcgcgcgacttggccgccgcggggaattact actactacggaatggatgtctggggacagggaaccactgtgactgtgtcgtctggtggtggtgg aagcgggggaggaggttcgggcggcggcggaagctcctccgaactgacccaggaccctgc ggtgtccgtggccctgggacagaccgcaaggatcacgtgtcagggagacagcctccgctcct acttcacatcctggtatcatcagaagcccggccaggctccggtgctggtcatctacggaaacaa caacagaccgtccgggattcccgaccggttcagcggctcctcatccggcaacaccgcctccct gaccatcaccggcgcccaggccgaggacgagggagattactactgcgactcccgggatagc agcggcgatcacctcgtgttcgggggagggactaagcttactgtgctgggatcgcaccaccatc accatcatcatcac
scFv soluble CAR22-35 AA	409	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardlaaagnyyy ygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtaritcqgdslrsyfts wyhqkpgqapvlviygnnnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedegdyycdsrdssgdh lvfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-35 completo AA	410	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardlaaagnyyy

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		ygmdvwgqgttvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtaritcqgdslrsyfts wyhqkpgqapvlviygnnnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedegdyycdsrdssgdh lvfgggtkltvlttttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcg vlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmk gerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-35 completo NT	411	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaaccaggagcttcagtgaaagtgtcgtgc aaggcctccggctataccttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggccag ggactggagtggatgggaattatcaacccttcgggcggctccactagctacgcccaaaagtttc aggggagagtgaccatgactcgggacacctcaacctcgaccgtgtacatggaactgtcgtcac tgcggtccgaggacaccgccgtgtactactgcgcgcgcgacttggccgccgcggggaattact actactacggaatggatgtctggggacagggaaccactgtgactgtgtcgtctggtggtggtgg aagcgggggaggaggttcgggcggcggcggaagctcctccgaactgacccaggaccctgc ggtgtccgtggccctgggacagaccgcaaggatcacgtgtcagggagacagcctccgctcct acttcacatcctggtatcatcagaagcccggccaggctccggtgctggtcatctacggaaacaa caacagaccgtccgggattcccgaccggttcagcggctcctcatccggcaacaccgcctccct gaccatcaccggcgcccaggccgaggacgagggagattactactgcgactcccgggatagc agcggcgatcacctcgtgttcgggggagggactaagcttactgtgctgaccactaccccagca ccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggca tgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatt tgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcg cggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaa gaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcg tgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaa cgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggga cccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagc tccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaag aggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatga cgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-36 AA	412	Qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsy aqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardddfwsgsgafdiwgqgttvtvssggg gsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyaswyqqkpgqapvlviygkn nrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhpvvfgggtkltvl
scFv CAR22-36 NT	413	caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcttccgtgaaagtgtcct gcaaggcgtcaggctacacctttacgtcctactacatgcactgggtccgccaggccccgggcc agggcttggagtggatgggaatcattaaccccagcggcggcagcactagctatgcccagaag ttccagggtcgggtcaccatgactagagacacatccacctccaccgtgtacatggaactgagct ccctgcggtccgaggataccgcggtgtactactgcgcccgcgatgacgacttctggtccggctc gggggcattcgacatctggggacagggcaccaccgtgactgtgtcctccggcggtggaggat cgggtggcggaggaagcggtggaggcggatcttcgtccgaactgactcaggaccctgccgtg tcggtggccctgggacagactgtgcgcatcacctgtcaaggagatagcctgaggtcgtactatg cctcctggtaccagcagaagcccggacaggccccggtgcttgtgatctacgggaagaacaac agaccgtcagggattccagaccggttcagcgggtcatccagcgggaataccgcttccctcact atcaccggagcccaggcggaggacgaggccgattactactgcaactcgcgggactcatccg gcaaccatcccgtggtgttcggaggggcactaagctgaccgtgctg
scFv soluble CAR22-36 NT	414	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcttccgtgaaagtgtcctgca aggcgtcaggctacacctttacgtcctactacatgcactgggtccgccaggccccgggccagg gcttggagtggatgggaatcattaaccccagcggcggcagcactagctatgcccagaagttcc agggtcgggtcaccatgactagagacacatccacctccaccgtgtacatggaactgagctccc tgcggtccgaggataccgcggtgtactactgcgcccgcgatgacgacttctggtccggctcggg ggcattcgacatctggggacagggcaccaccgtgactgtgtcctccggcggtggaggatcgg gtggcggaggaagcggtggaggcggatcttcgtccgaactgactcaggaccctgccgtgtcg gtggccctgggacagactgtgcgcatcacctgtcaaggagatagcctgaggtcgtactatgcct cctggtaccagcagaagcccggacaggccccggtgcttgtgatctacgggaagaacaacag accgtcagggattccagaccggttcagcgggtcatccagcgggaataccgcttccctcactatc accggagcccaggcggaggacgaggccgattactactgcaactcgcgggactcatccggca accatcccgtggtgttcggaggggcactaagctgaccgtgctgggatcgcaccaccatcacc atcatcatcac

Nombre	SEQ ID	Sequencias
CAR22-36 - scFv soluble AA	415	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardddfwsgsg afdiwgqgttvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyasw yqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhp vvfgggtkltvlgshhhhhhhh
CAR22-36 completo AA	416	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycardddfwsgsg afdiwgqgttvtvssggggsggggsggggssseltqdpavsvalgqtvritcqgdslrsyyasw yqqkpgqapvlviygknnrpsgipdrfsgsssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssgnhp vvfgggtkltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcg vlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq gqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmk gerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-36 completo NT	417	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcttccgtgaaagtgtcctgca aggcgtcaggctacacctttacgtcctactacatgcactgggtccgccaggccccgggccaggg gcttggagtggatgggaatcattaaccccagcggcggcagcactagctatgcccagaagttcc agggtcgggtcaccatgactagagacacatccacctccaccgtgtacatggaactgagctccc tgcggtccgaggataccgcggtgtactactgcgcccgcgatgacgacttctggtccggctcggg ggcattcgacatctggggacagggcaccaccgtgactgtgtcctccggcggtggaggatcgg gtggcggaggaagcggtggaggcggatcttcgtccgaactgactcaggaccctgccgtgtcg gtggccctgggacagactgtgcgcatcacctgtcaaggagatagcctgaggtcgtactatgcct cctggtaccagcagaagcccggacaggccccggtgcttgtgatctacgggaagaacaacag accgtcagggattccagaccggttcagcgggtcatccagcgggaataccgcttccctcactatc accggagcccaggcggaggacgaggccgattactactgcaactcgcgggactcatccggca accatcccgtggtgttcggaggggcactaagctgaccgtgctgaccactaccccagcaccg aggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgta gacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgg gcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcgg tcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagag gaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtga aattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacga actcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccca gaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctcca aaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagagg caaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgc tcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-37 AA	418	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycarpegvsyydssvldywgqgtlvtvssggg gsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggykhvswyqhhpgkapklmi ydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltvsglqaedeahyycvsyrnfnslvfgtgtkvtvl
scFv CAR22-37 NT	117	caagtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcc tgcaaggcctcggggtataccttcacttcctactacatgcactgggtccggcaggcgccgggac agggactggaatggatgggtatcatcaacccctcgggcggttccactagctacgcccagaagt tccagggaagagtgaccatgacccgggacacttccacttcgaccgtgtacatggaactgagca gcctgaggagcgaggacaccgccgtgtactactgtgcccggcccgagggagtgtcctactac gattcctccgtgctggattactggggacagggaacacttgtgaccgtgtcctcgggaggaggcg gaagcgggggcggagggtctgggggaggcggctcccagtccgctctgacgcagcctgcgtc cgtgtccgggagccctggccagagcattactatttcatgcaccggtaccagctccgacgtgggc ggatataagcacgtgtcatggtaccagcatcacccgggaaaggccccaaagctgatgatcta cgacgtgtcgaacagaccgagcggggtgtcaaatcgcttttccggttcaaagtcgggcaacac tgcctcactcaccgtgtcgggcctccaagcggaggacgaagcccactactactgcgtgtcctac cgcaacttcaactccttggtgttcggcaccggcaccaaggtcaccgtcctg
scFv soluble CAR22-37 NT	419	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcggggtataccttcacttcctactacatgcactgggtccggcaggcgccgggacag ggactggaatggatgggtatcatcaacccctcgggcggttccactagctacgcccagaagttcc agggaagagtgaccatgacccgggacacttccacttcgaccgtgtacatggaactgagcagc ctgaggagcgaggacaccgccgtgtactactgtgcccggcccgagggagtgtcctactacgat tcctccgtgctggattactggggacagggaacacttgtgaccgtgtcctcgggaggaggcgga agcgggggcggagggtctgggggaggcggctcccagtccgctctgacgcagcctgcgtccgt

Nombre	SEQ ID	Sequencias
		gtccgggagccctggccagagcattactatttcatgcaccggtaccagctccgacgtgggcgg atataagcacgtgtcatggtaccagcatcacccgggaaaggccccaaagctgatgatctacg acgtgtcgaacagaccgagcggggtgtcaaatcgcttttccggttcaaagtcgggcaacactg cctcactcaccgtgtcgggcctccaagcggaggacgaagcccactactactgcgtgtcctacc gcaacttcaactccttggtgttcggcaccggcaccaaggtcaccgtcctgggatcgcaccacca tcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR22-37 AA	420	Malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycarpegvsyyds svldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggy khvswyqhhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltvsglqaedeahyycvsyr nfnslvfgtgtkvtvlgshhhhhhhh
CAR22-37 completo AA	421	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslrsedtavyycarpegvsyyds svldywgqgtlvtvssggggsggggsggggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggy khvswyqhhpgkapklmiydvsnrpsgvsnrfsgsksgntasltvsglqaedeahyycvsyr nfnslvfgtgtkvtvlttttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadap aykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-37 completo NT	422	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccagtccggtgcagaagtcaagaaacccggagcttccgtgaaagtgtcctgc aaggcctcggggtataccttcacttcctactacatgcactgggtccggcaggcgccgggacag ggactggaatggatgggtatcatcaacccctcgggcggttccactagctacgcccagaagttcc agggaagagtgaccatgacccgggacacttccacttcgaccgtgtacatggaactgagcagc ctgaggagcgaggacaccgccgtgtactactgtgcccggcccgagggagtgtcctactacgat tcctccgtgctggattactggggacagggaacacttgtgaccgtgtcctcgggaggaggcgga agcgggggcggagggtctgggggaggcggctcccagtccgctctgacgcagcctgcgtccgt gtccgggagccctggccagagcattactatttcatgcaccggtaccagctccgacgtgggcgg atataagcacgtgtcatggtaccagcatcacccgggaaaggccccaaagctgatgatctacg acgtgtcgaacagaccgagcggggtgtcaaatcgcttttccggttcaaagtcgggcaacactg cctcactcaccgtgtcgggcctccaagcggaggacgaagcccactactactgcgtgtcctacc gcaacttcaactccttggtgttcggcaccggcaccaaggtcaccgtcctgaccactaccccagc accgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggc atgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctaca tttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagc gcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctaca acgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacggg acccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaa gaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
scFv CAR22-38 AA	423	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgqglewmgiinpsggstsya qkfqgrvtmtrdtststvymelsslraedtavyycarggygdyldafdiwgqgttvtvssggggs ggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyvswyqqhpgkapklmiye vsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstlvfgtgtqltvl
scFv CAR22-38 NT	424	caagtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccgtgaaagtgtcc tgcaaggcgtccgggtatacgttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccggga cagggactggaatggatgggaatcatcaatcctagcggcggcagcaccagctacgcccaga agtttcagggccgcgtgaccatgaccagggacactagcacctccaccgtgtacatggaattgtc cagcctgagagccgaggatactgctgtgtactactgcgcccggggcggatacggagattatct ggacgccttcgacatttggggacagggcactactgtgaccgtgtcctcgggggaggcggctc gggggcggcggatcaggatcaggcggttcccagtccgcgctgacacagcccgcttccgtga gcggttcgcccgggcagtccatcaccatttcgtgtaccggaacttcctccgacgtcggtggctac aactacgtgtcgtggtaccagcaacatccgggaaaggccccaaagctcatgatctacgaggt gtccaaccggccgtccggggtgtcaaaccggttcagcggctcaaagagcggaaacaccgcc tccctcaccatctcgggactgcaggccgaggatgaagcggactactactgctcgagctacactt cctcatctaccctggtgttcgggactggtacccagcttaccgtgctg

Nombre	SEQ ID	Sequencias
scFv soluble CAR22-38 NT	425	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccgtgaaagtgtcctgc aaggcgtccgggtatacgttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggacag ggactggaatggatgggaatcatcaatcctagcggcggcagcaccagctacgcccagaagtt tcagggccgcgtgaccatgaccagggacactagcacctccaccgtgtacatggaattgtccag cctgagagccgaggatactgctgtgtactactgcgccccggggcggatacggagattatctgga cgccttcgacatttggggacagggcactactgtgaccgtgtcctcgggggggaggcggctcggg gggcggcggatcaggatcaggcggttcccagtccgcgctgacacagcccgcttccgtgagcg gttcgcccgggcagtccatcaccatttcgtgtaccggaacttcctccgacgtcggtggctacaact acgtgtcgtggtaccagcaacatccgggaaaggccccaaagctcatgatctacgaggtgtcca accggccgtccggggtgtcaaaccggttcagcggctcaaagagcggaaacaccgcctccctc accatctcgggactgcaggccgaggatgaagcggactactactgctcgagctacacttcctcat ctaccctggtgttcgggactggtacccagcttaccgtgctgggatcgcaccaccatcaccatcat catcac
scFv soluble CAR22-38 AA	426	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslraedtavyycarggygdyldaf diwgqgttvtvssggggsggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyv swyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstl vfgtgtqltvlgshhhhhhhh
CAR22-38 completo AA	427	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgytftsyymhwvrqapgq glewmgiinpsggstsyaqkfqgrvtmtrdtststvymelsslraedtavyycarggygdyldaf diwgqgttvtvssggggsggggsgsggsqsaltqpasvsgspgqsitisctgtssdvggynyv swyqqhpgkapklmiyevsnrpsgvsnrfsgsksgntasltisglqaedeadyycssytssstl vfgtgtqltvltttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvl llslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqg qnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkg errrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
CAR22-38 completo NT	428	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccccaa gtccaactcgtccaatccggtgcagaagtcaagaaacctggagcatccgtgaaagtgtcctgc aaggcgtccgggtatacgttcacctcctactacatgcactgggtgcgccaggccccgggacag ggactggaatggatgggaatcatcaatcctagcggcggcagcaccagctacgcccagaagtt tcagggccgcgtgaccatgaccagggacactagcacctccaccgtgtacatggaattgtccag cctgagagccgaggatactgctgtgtactactgcgccccggggcggatacggagattatctgga cgccttcgacatttggggacagggcactactgtgaccgtgtcctcgggggggaggcggctcggg gggcggcggatcaggatcaggcggttcccagtccgcgctgacacagcccgcttccgtgagcg gttcgcccgggcagtccatcaccatttcgtgtaccggaacttcctccgacgtcggtggctacaact acgtgtcgtggtaccagcaacatccgggaaaggccccaaagctcatgatctacgaggtgtcca accggccgtccggggtgtcaaaccggttcagcggctcaaagagcggaaacaccgcctccctc accatctcgggactgcaggccgaggatgaagcggactactactgctcgagctacacttcctcat ctaccctggtgttcgggactggtacccagcttaccgtgctgaccactaccccagcaccgaggcc acccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccc gcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccct ctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaa gaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggac ggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcag ccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaat cttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatg ggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaagga taagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcaca tgcaggccctgccgcctcgg

Se generaron varias secuencias adicionales de scFv CD22 y se describen en la **tabla 6B** a continuación. Los clones CD22-64 y CD22-65 se basaron en la maduración por afinidad del clon CD22-12 anterior. En algunas realizaciones, la afinidad de un dominio de unión madurado por afinidad por CD22 es más fuerte que la de CD22-12 por CD22. En algunas realizaciones, la tasa de asociación de un dominio de unión madurado por afinidad por CD22 es más fuerte que la de CD22-12 por CD22.

Tabla 6B: Secuencias de scFv de CD22 humano

Nombre	SEQ ID	Secuencia
Dominio scFv CAR22-53 AA	131	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGL EWLGRTYYRSKWYSDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA VYYCARDPYDFWSGYPDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPG KAPKVIISEVNNRPSGVSHRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCS SYTSGRTLYVFGTGSKVTVLG
scFv CAR22-53 NT	1108	GAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTC GCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTC TAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAG AGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTA TAGTGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAG ACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTC CCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCTTACGATTT TTGGAGTGGTTATCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACA ATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGTGGTGGCAGCGGCGGCGGCGG CTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTC CGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGG AACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTACAACTATGTCTCCTGGTACCAA CAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAGGTCATAATTTCTGAGGTCAATA ATCGGCCCTCAGGGGTTTCTCATCGCTTCTCTGGGTCCAAGTCTG GCAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGAC GAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAGTGGCAGGACTCTTTA TGTCTTCGGAACTGGGAGCAAGGTCACCGTCCTAGGT
CAR22-53 completo AA	1109	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDS VSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYSDYAVSVKSRITINP DTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPYDFWSGYPDAFDIWGQGT MVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKVIISEVNNRPSGVSHRFSGSKSGN TASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSGRTLYVFGTGSKVTVLGTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR22-53 completo NT (scFv CD22-53 + CD8 alfa humano + 41-BB + CD3zeta)	1110	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTG CTCCACGCCGCTCGGCCCGAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCC AGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCAT CTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGAT CAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT ACTACAGGTCCAAGTGGTATAGTGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGT CGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGC AGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CAAGAGATCCTTACGATTTTTGGAGTGGTTATCCTGATGCTTTTGAT ATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGTGGT GGCAGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAGTCTG CCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTACA ACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAGG TCATAATTTCTGAGGTCAATAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTCATCG CTTCTCTGGGTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACCATCTC TGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATAT ACAAGTGGCAGGACTCTTTATGTCTTCGGAACTGGGAGCAAGGTC ACCGTCCTAGGTACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCG GCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCA TGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGA CTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGC GGGGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCG GTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCC TGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCC AGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCC GCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTC TACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTG

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		GACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGC GCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGG ATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACG CAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCA CCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGC CGCCTCGG
CAR 22-57	132	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNNAAWNWIRQSPSRGL EWLGRTYHRSTWYNDYVGSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT AVYYCARETDYGDYGAFDIWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSRNDIGAYESVSWYQQHPGNAPK LIIHGVNNRPSGVFDRFSVSQSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSHTT TSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-58	133	EVQLQQSGPGLVNPSQTLSITCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGL EWLGRTFYRSKWYNDYAVSVKGRITISPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT AVYYCAGGDYYYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQS ALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKL MIYEVINRPSGVSHRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSS STYVFGTGTKVTVLG
CAR22-59	134	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGL EWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPED TGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDIGGFNYVSWYQQH AGEAPKLMIYEVTNRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEADYY CSSYASGSPLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-60	135	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGL EWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPED TGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GSGGSQSALTQPASVSGSPGQSITFSCTGTSSDIGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGTKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTKLTVLG
CAR22-61	136	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGL EWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPED TGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GSGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-62	137	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGL EWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPED TGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-63	138	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGL EWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPED TGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLYIFGTGTKVTVLG
CAR22-64	139	EVQLQQSGPGLVKPSQTLPLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGL EWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPED TGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGPQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
CAR22-65	140	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGL EWLGRTYHRSTWYDDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPED TGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		HPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD YYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada enumerada en la Tabla 6A o 6B. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno comprende además una CDR1 LC, una CDR2 LC y una CDR3 LC. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una LC CDR1, una LC CDR2 y una LC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera enumerada en la Tabla 6A o 6B.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3 enumeradas en la Tabla 6A o 6B, y una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 enumeradas en la Tabla 6A o 6B.

En algunas realizaciones, las CDRs se definen de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia, o una combinación de las mismas.

CD22-64 y CD22-65 se basaron en la maduración por afinidad del clon CD22-12. Se ensayaron las tres construcciones y se descubrió que tenían actividad (véase el ejemplo 25 en el presente documento). En función de estas observaciones, se diseñó un género estructural para abarcar los ejemplos de trabajo. Por tanto, en algunos casos, un dominio de unión a CD22 descrito en el presente documento comprende un HCDR3 que tiene una secuencia: XRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 141). En algunos casos, X es cualquier aminoácido, cualquier aminoácido canónico, un aminoácido no polar (p. ej., G, A, V, L, I, P, M, F o W), un aminoácido no polar sin un anillo aromático (p. ej., G, A, V, L, I, P o M), o un aminoácido ácido (p. ej., D o E).

Asimismo, CAR22-53 y CAR22-57 a CAR22-65 tienen similitudes estructurales en sus CDR. Se diseñó un género estructural para abarcar estos ejemplos de trabajo. Por tanto, en algunos casos, un dominio de unión a CD22 descrito en el presente documento comprende un LCDR1 que tiene una secuencia: $TGX_1X_2X_3DX_4GX_5X_6X_7X_8VS$ (SEQ ID NO: _). En algunos casos, X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7 o X_8, o cualquier combinación de los mismos, es cada uno independientemente cualquier aminoácido, p. ej., cualquier aminoácido canónico. En algunos casos, X_4 o X_5 o ambos son cada uno independientemente un aminoácido no polar (p. ej., G, A, V, L, I, P, M, F o W) un aminoácido no polar sin un anillo aromático (p. ej., G, A, V, L, I, P o M). En algunos casos, X_6 es un aminoácido aromático (p. ej., F, Y o W). En algunos casos, X_1 es S o T; X_2 es R o S; X_3 es N o S, X_4 es V o I, X_5 es A o G; X_6 es Y o F; X_7 es E o N; o X_8 es S o Y, o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, X_1 es S o T; X_2 es R o S; X_3 es N o S, X_4 es V o I, X_5 es A o G; X_6 es Y o F; X_7 es E o N; o X_8 es S o Y.

De forma similar, en algunos casos, un dominio de unión a CD22 descrito en el presente documento comprende un LCDR2 que tiene una secuencia: X_1VX_2NRPS (SEQ ID NO: _). En algunos casos, X_1 o X_2 o ambos son cada uno independientemente cualquier aminoácido, p. ej., cualquier aminoácido canónico. En algunos casos, X_1 es un aminoácido ácido (p. ej., D o E), un aminoácido no polar (p. ej., G, A, V, L, I, P, M, F o W) o un aminoácido no polar sin un anillo aromático (p. ej., G, A, V, L, I, P o M). En algunos casos, X_2 es un aminoácido no polar (p. ej., G, A, V, L, I, P, M, F o W), un aminoácido no polar sin un anillo aromático (p. ej., G, A, V, L, I, P o M) o un aminoácido polar sin carga (p. ej., S, T, N o Q). En algunos casos, X_1 es E, G o D y/o X_2 es N, I, S o T.

De forma similar, en algunos casos, un dominio de unión a CD22 descrito en el presente documento comprende un LCDR3 que tiene una secuencia: $SSX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEQ ID NO:_). En algunos casos, X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7 o X_8, o cualquier combinación de los mismos, es cada uno independientemente cualquier aminoácido, p. ej., cualquier aminoácido canónico. En algunos casos, X_1 es un aminoácido aromático (p. ej., F, Y o W) o un aminoácido con carga positiva (p. ej., K, R o H). En algunos casos, X_2 es un aminoácido no polar (p. ej., G, A, V, L, I, P, M, F o W), un aminoácido no polar sin un anillo aromático (p. ej., G, A, V, L, I, P o M) o un aminoácido polar sin carga (p. ej., S, T, N o Q). En algunos casos, X_3 es un aminoácido polar sin carga (p. ej., S, T, N o Q). En algunos casos, X_4 es un aminoácido no polar (p. ej., G, A, V, L, I, P, M, F o W), un aminoácido no polar sin un anillo aromático (p. ej., G, A, V, L, I, P o M) o un aminoácido polar sin carga (p. ej., S, T, N o Q). En algunos casos, X_5 es un aminoácido con carga positiva (p. ej., K, R o H) o un aminoácido polar sin carga (p. ej., S, T, N o Q). En algunos casos, X_6 es un aminoácido polar sin carga (p. ej., S, T, N o Q), un aminoácido no polar (p. ej., G, A, V, L, I, P, M, F o W), un aminoácido no polar sin un anillo aromático (p. ej., G, A, V, L, I, P o M). En algunos casos, X_7 es un aminoácido no polar (p. ej., G, A, V, L, I, P, M, F o W), un aminoácido no polar sin un anillo aromático (p. ej., G, A, V, L, I, P o M) o un aminoácido aromático (p. ej., F, Y o W). En algunos casos, X_8 está ausente o es un aminoácido aromático (p. ej., F, Y o W). En algunos casos, X_9 es un aminoácido no polar (p. ej., G, A, V, L, I, P, M, F o W) o un aminoácido no polar sin un anillo aromático (p. ej., G, A, V, L, I, P o M). En algunos casos, X_1 es Y o H, X_2 es A o T, X_3 es S o T; X_4 es G, T o S, X_5 es R o S, X_6 es T o P, X_7 es L o Y, X_8 es Y o está ausente o X_9 es V o I, o cualquier combinación

de los mismos. En algunos casos, X_1 es Y o H, X2 es A o T, X_3 es S o T; X_4 es G, T, o S, X_5 es R o S, X_6 es T o P, X_7 es L o Y, X_8 es Y o está ausente, y X_9 es V o I. Las secuencias de las secuencias CDR humanas de los dominios scFv se muestran en la Tabla 7A, 7B o 7C para los dominios variables de la cadena pesada y en la Tabla 8A o 8B para los dominios variables de la cadena ligera. "ID" representa la SEQ ID NO respectiva para cada CDR. La invención utiliza dominios de unión de CD22 como se define en las reivindicaciones.

Tabla 7A. CDR de dominio variable de cadena pesada de CAR CD22. Las CDR se identifican según la definición "combinada".

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	CDR2H	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
m971	GDSVSSNSAAWN	142	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	181	EVTGDLEDAFDI	449
CAR22-1	GFTVSSNYMS	143	VIYSGGSTYYADSVKG	182	QSTPYDSSGYYSGDAFDI	450
CAR22-2	GDSVSSNSAAWN	144	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	183	DLGWIAVAGTFDY	451
CAR22-3	GDSVLSNSDTWN	145	RTYHRSTWYDDYASSVRG	184	DRLQDGNSWSDAFDV	452
CAR22-4	GFTFDDYAMH	146	GISWNSGSIGYADSVKG	185	GLSSWHFHDALDI	453
CAR22-5	GFTFDDYAMH	147	GISWNSGSIGYADSVKG	186	DKGGGYYDFWSGSDY I	454
CAR22-6	GDSVSSNSATWT	148	RTYYRSTWYNDYAVSVKS	187	EGSGSYYAY	455
CAR22-7	GYTFTGYYMH	149	WINPNSGGTNYAQKFQG	188	DYWGYYGSGTLDY	456
CAR22-8	GYTFTSYGIS	150	WISAYNGNTNYAQKLQG	189	AGLALYSNYVPYYYYGMDV	457
CAR22-9	GFTFSNAWMN	151	RIKSKTDGGTADYAAPVKG	190	GATDV	458
CAR22-10	GDSVLSNSDTWN	152	RTYHRSTWYDDYASSVRG	191	DRLQDGNSWSDAFDV	459
CAR22-11	GDSVSSNSAAWN	153	RTYYRSKWYNDYAVSVKS	192	EESSSGWYEGNWFDP	480
CAR22-12	GDSVLSNSDTWN	154	RTYHRSTWYDDYASSVRG	193	DRLQDGNSWSDAFDV	461
CAR22-13	GGSISSSSYYWG	155	SIYYSGSTYYNPSLKS	194	GRMDTAMAQI	462
CAR22-14	GYTFTSYYMH	156	IINPSGGSTSYAQKFQG	195	DLDVSLDI	463
CAR22-15	GFTFSSYAMH	157	AISSNGGSTYYANSVKD	196	VHSSGYYHPGPNDY	464
CAR22-16	GYTFTSYYMH	158	IINPSGGSTSYAQKFQG	197	EAGWAVDY	465
CAR22-17	GFTFSSYAMS	159	AISGSGGSTYYADSVKG	198	EPLFGVVEEDVDY	466
CAR22-18	GYTFTSYYMH	160	IINPSGGSTSYAQKFQG	199	GSGSLGDAFDI	467
CAR22-19	GYTFTSYYMH	161	IINPSGGSTSYAQKFQG	429	DGFGELSGAFDI	468
CAR22-20	GYTFTSYYMH	162	IINPSGGSTSYAQKFQG	430	GPIGCSGGSCLDY	469
CAR22-21	GYTFTSYYMH	163	IINPSGGSTSYAQKFQG	431	GSYGDYGDAFDI	470
CAR22-22	GGTFSSYAIS	164	GIIPIFGTANYAQKFQG	432	DHKVVRFGY	471
CAR22-23	GYTFTSYYMH	165	IINPSGGSTSYAQKFQG	433	GDYYMDV	472

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	CDR2H	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
CAR22-24	GFTFSSYAMS	166	YISSSSSTIYYADSVKG	434	DGPIRYFDHSKAFDI	473
CAR22-25	GYTFTSYYMH	167	IINPSGGSTSYAQKFQG	435	EMDDSSGPDY	474
CAR22-26	GYSFTGSWIG	168	IIYPGDSDTRYSPSFQG	436	GFLRGGDCCGALDI	475
CAR22-27	GGSINSYYWS	169	FTSHSGNVKYNPSLTG	437	GLDPLFAYDAFEI	476
CAR22-28	GFTFSDYYMS	170	YISSSGSTIYYADSVKG	438	DDFWSGSVDY	477
CAR22-29	GYTFTSYYMH	171	IINPSGGSTSYAQKFQG	439	EDDSSGYTSPFDY	478
CAR22-30	GYTFTGYYMH	172	WINPNSGGTNYAQKFQG	440	EPASSSWYGYYYYMDV	479
CAR22-31	GYTFTSYDIN	173	WMNPNSGNTGYAQKFQG	441	GDSNYWSYYGMDV	480
CAR22-32	GYTFTSYGIS	174	WISAYNGNTNYAQKLQG	442	FSSSDSYDY	481
CAR22-33	GFSLNTFGMSVS	175	LIDWDDDKYYSTSLRT	443	IYGGDRTNTQAPYFFDL	482
CAR22-34	GASITSRHWWN	176	QIYHSGTTTYNPSLGS	444	DYLELATYYGMDV	483
CAR22-35	GYTFTSYYMH	177	IINPSGGSTSYAQKFQG	445	DLAAAGNYYYYGMDV	484
CAR22-36	GYTFTSYYMH	178	IINPSGGSTSYAQKFQG	446	DDDFWSGSGAFDI	485
CAR22-37	GYTFTSYYMH	179	IINPSGGSTSYAQKFQG	447	PEGVSYYDSSVLDY	486
CAR22-38	GYTFTSYYMH	180	IINPSGGSTSYAQKFQG	448	GGYGDYLDAFDI	487

Tabla 7B. CDR de dominio variable de cadena pesada de CAR CD22

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-53 Kabat	SNSAAWN	488	RTYYRSKWYSDYAVSVKS	499	DPYDFWSGYPDAFDI	510
CAR22-53 Chothia	GDSVSSNSA	489	YYRSKWY	500	DPYDFWSGYPDAFDI	511
CAR22-53 Combinado Rabat/Chothia.	GDSVSSNSAAWN	1111	RTYYRSKWYSDYAVSVKS	1113	DPYDFWSGYPDAFDI	1115
CAR22-53 IMGT	GDSVSSNSAA	1112	TYYRSKWYS	1114	ARDPYDFWSGYPDAFDI	1116
CAR22-57 Combinado	GDSVSNNNAAWN	490	RTYHRSTWYNDYVGSVKS	501	ETDYGDYGAFDI	512

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-57 Kabat	NNNAAWN		RTYHRSTWYNDYVGSVKS		ETDYGDYGAFDI	
CAR22-58 Combinado	GDSVSSNSAAWN	491	RTFYRSKWYNDYAVSVKG	502	GDYYYGLDV	513
CAR22-58 Kabat	SNSAAWN		RTFYRSKWYNDYAVSVKG		GDYYYGLDV	
CAR22-59 Combinado	GDSVLSNSDTWN	492	RTYHRSTWYDDYASSVRG	503	DRLQDGNSWSDAFDV	514
CAR22-59 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-60 Combinado	GDSVLSNSDTWN	493	RTYHRSTWYDDYASSVRG	504	DRLQDGNSWSDAFDV	515
CAR22-60 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-61 Combinado	GDSVLSNSDTWN	494	RTYHRSTWYDDYASSVRG	505	DRLQDGNSWSDAFDV	516
CAR22-61 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-62 Combinado	GDSVLSNSDTWN	495	RTYHRSTWYDDYASSVRG	506	DRLQDGNSWSDAFDV	517
CAR22-62 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-63 Combinado	GDSVLSNSDTWN	496	RTYHRSTWYDDYASSVRG	507	DRLQDGNSWSDAFDV	518
CAR22-63 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-64 Combinado	GDSVLSNSDTWN	497	RTYHRSTWYDDYASSVRG	508	VRLQDGNSWSDAFDV	519
CAR22-64 Kabat	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		VRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-65 Combinado	GDSMLSNSDTWN	498	RTYHRSTWYDDYASSVRG	509	VRLQDGNSWSDAFDV	520
CAR22-65 Kabat	SNSDTWN	1345	RTYHRSTWYDDYASSVRG	1354	VRLQDGNSWSDAFDV	1363

Tabla 7C. CDR de dominio variable de cadena pesada de CAR CD22. Las CDR se identifican según Kabat.

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	CDR2H	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
m971	SNSAAWN		RTYYRSKWYNDYAVSVKS		EVTGDLEDAFDI	
CAR22-1	SNYMS		VIYSGGSTYYADSVKG		QSTPYDSSGYYSGDAFDI	
CAR22-2	SNSAAWN		RTYYRSKWYNDYAVSVKS		DLGWIAVAGTFDY	
CAR22-3	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-4	DYAMH		GISWNSGSIGYADSVKG		GLSSWHFHDALDI	
CAR22-5	DYAMH		GISWNSGSIGYADSVKG		DKGGGYYDFWSGSDY	
CAR22-6	SNSATWT		RTYYRSTWYNDYAVSVKS		EGSGSYYAY	
CAR22-7	GYYMH		WINPNSGGTNYAQKFQG		DYWGYYGSGTLDY	

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	CDR2H	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
CAR22-8	SYGIS		WISAYNGNTNYAQKLQG		AGLALYSNYVPYYYYGMDV	
CAR22-9	NAWMN		RIKSKTDGGTADYAAPVKG		GATDV	
CAR22-10	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-11	SNSAAWN		RTYYRSKWYNDYAVSVKS		EESSSGWYEGNWFDP	
CAR22-12	SNSDTWN		RTYHRSTWYDDYASSVRG		DRLQDGNSWSDAFDV	
CAR22-13	SSSYYWG		SIYYSGSTYYNPSLKS		GRMDTAMAQI	
CAR22-14	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		DLDVSLDI	
CAR22-15	SYAMH		AISSNGGSTYYANSVKD		VHSSGYYHPGPNDY	
CAR22-16	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		EAGWAVDY	
CAR22-17	SYAMS		AISGSGGSTYYADSVKG		EPLFGVVEEDVDY	
CAR22-18	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GSGSLGDAFDI	
CAR22-19	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		DGFGELSGAFDI	
CAR22-20	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GPIGCSGGSCLDY	
CAR22-21	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GSYGDYGDAFDI	
CAR22-22	SYAIS		GIIPIFGTANYAQKFQG		DHKVVRFGY	
CAR22-23	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GDYYMDV	
CAR22-24	SYAMS		YISSSSSTIYYADSVKG		DGPIRYFDHSKAFDI	
CAR22-25	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		EMDDSSGPDY	
CAR22-26	GSWIG		IIYPGDSDTRYSPSFQG		GFLRGGDCCGALDI	
CAR22-27	SYYWS		FTSHSGNVKYNPSLTG		GLDPLFAYDAFEI	
CAR22-28	**DYYMS**		YISSSGSTIYYADSVKG		DDFWSGSVDY	
CAR22-29	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		EDDSSGYTSPFDY	
CAR22-30	GYYMH		WINPNSGGTNYAQKFQG		EPASSSWYGYYYYMDV	
CAR22-31	SYDIN		WMNPNSGNTGYAQKFQG		GDSNYWSYYGMDV	
CAR22-32	SYGIS		WISAYNGNTNYAQKLQG		FSSSDSYDY	

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	CDR2H	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
CAR22-33	TFGMSVS		LIDWDDDKYYSTSLRT		IYGGDRTNTQAPYFFDL	
CAR22-34	TSRHWWN		QIYHSGTTTYNPSLGS		DYLELATYYGMDV	
CAR22-35	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		DLAAAGNYYYYGMDV	
CAR22-36	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		DDDFWSGSGAFDI	
CAR22-37	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		PEGVSYYDSSVLDY	
CAR22-38	SYYMH		IINPSGGSTSYAQKFQG		GGYGDYLDAFDI	

Tabla 8A. CDR de dominio variable de cadena ligera de CAR CD22. Las secuencias de CDR LC en esta tabla tienen la misma secuencia en las definiciones de Kabat o combinadas.

Candidato	CDR1L	**SEQ** ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
m971	RASQTIWSYLN	521	AASSLQS	560	QQSYSIPQT	391
CAR22-1	SGSSSNIGSNYVY	522	RNNQRPS	561	AAWDDSLSGYV	600
CAR22-2	TGTSSDVGGYNYVS	523	DVSKRPS	562	SSYTSSSLNHV	601
CAR22-3	TGTSSDVGGYNYVS	524	DVSNRPS	563	SSYTSSSTPYV	602
CAR22-4	QGDSLRSYYAS	525	GKNNRPS	564	NSRDSSGNHLWV	603
CAR22-5	QGDSLRSYYAS	526	GKNNRPS	565	NSRDSSGWV	604
CAR22-6	TGTSSDVGGYNYVS	527	DVSNRPS	566	SSYTSSSTLYV	605
CAR22-7	TGTSSDVGGYNYVS	528	DVSSRPS	567	SSYAGSNTLV	606
CAR22-8	TRSSGSIASNYVQ	529	EDNQRPS	568	QSYDSSNPWV	607
CAR22-9	SGSSSNIGSNYVY	530	RNNQRPS	569	AAWDDSLSGPV	608
CAR22-10	TGTSSDVGGYNYVS	531	DVSNRPS	570	SSYTSSSTLVYV	609
CAR22-11	QGDSLRSYYAS	532	GKNHRPS	571	HSRDSSGNHL	610
CAR22-12	TGTSSDVGGYNYVS	533	DVSNRPS	572	SSYTSSSTLYV	611
CAR22-13	TGSSGSFASSYVQ	534	EDNQRPS	573	QSYDGATWV	612
CAR22-14	SGTSSDVGGYNSVS	535	DVNNRPS	574	SSYTSSSTLF	613
CAR22-15	QGDSI.RTYYAT	536	DENNRPS	575	SSRDSSGNPSCV	614
CAR22-16	TGTSSDVGGYNYVS	537	DVSNRPS	576	SSYTSSSTWV	615
CAR22-17	RSSQSLLAGNGHNYLD	538	LGSNRAS	577	MQALQNPLT	616
CAR22-18	TGSSSDVGGYNYVS	539	EVSNRPS	578	SSYTSSSTLV	617

Candidato	CDR1L	**SEQ** ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-19	TGTSSDVGGYNYVS	540	DVSNRPS	579	SSYASSSTLV	618
CAR22-20	TGTNSDVGRYNYVS	541	EVSYRPS	580	SSYTTSSTLD	619
CAR22-21	TGTSSDVGGYKYVS	542	DVSNRPS	581	SSYTSSSTLV	620
CAR22-22	TLSSGHSSYAIA	543	VNSDGSLSKGD	582	QTWGSGMAI	621
CAR22-23	TGTSSDVGGYNYVS	544	EVSKRPS	583	SSYTSSGTLV	622
CAR22-24	QGDSLRSYYAS	545	GKNNRPS	584	NSRDSSGNPYV	623
CAR22-25	TGTSSDVGGYNYVS	546	EVSNRPS	585	SSYTSSSTLV	624
CAR22-26	IRSSQSLLHSNGYNYLD	547	LGSNRAS	586	MQALQTPPWT	625
CAR22-27	RSSQSLLHSNGYNYLD	548	LGSNRAS	587	MQVLQTPPLT	626
CAR22-28	GGTNIGSKNVH	549	YDSDRPS	588	QVWDSSSDHWV	627
CAR22-29	GGHNIRSKNVH	550	YDGDRPS	589	QVWDSDSDHYV	628
CAR22-30	RASQSINTYLN	551	AASNLQS	590	QQSYSSLLT	629
CAR22-31	TGTSSDVGGYNYVS	552	DADKRPS	591	CSYAGGSTWV	630
CAR22-32	RASQSVTSNLA	553	AASTRAT	592	QQYHTWPPLT	631
CAR22-33	RSSQSLLHSNGYNYLD	554	LGSNRAS	593	MQALQTPWT	632
CAR22-34	RSSQSLLYSDGYNYLD	555	LGSNRAS	594	MQALQTQS	633
CAR22-35	QGDSLRSYFTS	556	GNNNRPS	595	DSRDSSGDHLV	634
CAR22-36	QGDSLRSYYAS	557	GKNNRPS	596	NSRDSSGNHPW	635
CAR22-37	TGTSSDVGGYKHVS	558	DVSNRPS	597	VSYRNFNSLV	636
CAR22-38	TGTSSDVGGYNYVS	559	EVSNRPS	598	SSYTSSSTLV	637

Tabla 8B. CDR de dominio variable de cadena ligera de CAR CD22. Las secuencias de CDR LC en esta tabla tienen la misma secuencia en las definiciones de Kabat o combinadas.

Candidato	CDR1L	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-53 Kabat	TGTSSDVGGYNYVS	638	EVNNRPS	649	SSYTSGRTLYV	560
CAR22-53 Chothia	TSSDVGGYNY	639	EVN	650	YTSGRTLY	561

Candidato	CDR1L	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR22-53 Combinado	TGTSSDVGGYNYVS	1117	EVNNRPS	1119	SSYTSGRTLYV	1121
CAR22-53 IMGT	SSDVGGYNY	1118	EVN	1120	SSYTSGRTLYV	1122
CAR22-57 Combinado	TGSRNDIGAYESVS	640	GVNNRPS	651	SSHTTTSTLYV	562
CAR22-58 Combinado	TGSSSDVGGYNSVS	641	EVINRPS	652	SSYTSSSTYV	563
CAR22-59 Combinado	TGSSSDIGGFNYVS	642	EVTNRPS	653	SSYASGSPLYV	564
CAR22-60 Combinado	TGTSSDIGGYNYVS	643	EVSNRPS	654	SSYTSSSTLYV	565
CAR22-61 Combinado	TGTSSDVGGYNYVS	644	EVSNRPS	655	SSYTSSSTLYV	666
CAR22-62 Combinado	TGTSSDVGGYNYVS	645	DVSNRPS	656	SSYTSSSTLYV	667
CAR22-63 Combinado	TGTSSDVGGYNYVS	646	EVSNRPS	657	SSYTSSSTLYI	668
CAR22-64 Combinado	TGTSSDVGGYNYVS	647	DVSNRPS	658	SSYTSSSTLYV	669
CAR22-65 Combinado	TGTSSDVGGYNYVS	648	DVSNRPS	659	SSYTSSSTLYV	670

Tabla 9A. Regiones variables de cadena pesada de moléculas de anticuerpo de CD22

Candidato	**ID**	**Región variable de cadena pesada**
m971	700	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKW YNDYAVSVESRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARIVTGDLEDAFDIWGQGTM VTV
CAR22-1	701	QVQLVQSGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASQSTPYDSSGYYSGDAFDIWGQ GTMVTV
CAR22-2	702	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKW YNDYAVSVESRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLGWIAVAGTFDYWGQG TLVTV

Candidato	ID	Región variable de cadena pesada
CAR22-3	703	EVQLQQSGPGLVEPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWY DDYAESVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGAYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWG QGTMVTV
CAR22-4	704	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGEGLEWVSGISWNSGSIG YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAEGLSSWHFHDALDIWGQGTM VTV
CAR22-5	705	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIG YADSVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLRAEDTALYYCAEDEGGGYYDFWSGSDYWGQ GTLVTV
CAR22-6	706	EVQLQQSGPGLVKPSLTLSLTCAISGDSVSSNSATWTWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWY NDYAVSVESRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARLGSGSYYAYWGQGTLVTV
CAR22-7	707	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINP-NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDYWGYYGSGTLDY WGQGTLVTV
CAR22-8	708	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNT NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAGLALYSNYVPYYYYGM DVWGQGTTVTV
CAR22-9	709	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNAWMNWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGG TADYAAPVKGRFTISRDDSKNTMYLQMNSLETEDTGVYYCITGATDVWGQGTTVTV
CAR22-10	710	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWG QGTMVTV

Candidato	ID	Región variable de cadena pesada
CAR22-11	711	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKW YNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGESSSGWYEGNWFDPWG QGTLVTV
CAR22-12	712	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY HDYAESVKGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRGQDGNSWSDAFDVWG QGTMVTV
CAR22-13	713	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYY NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGRMDTAMAGIWGQGTMVTV
CAR22-14	714	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDLDVSLDIWGQGTMVTV
CAR22-15	715	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEYVSAISSNGGSTY YANSVKDRFTISRDNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCARVLISSGYYHPGFNDYWGQGT LVTV
CAR22-16	716	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAGVVAVDYWGQGTLVTV
CAR22-17	717	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEPLFGVVIEDVDYWGQGTL VTV
CAR22-18	718	QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSGSLGDAFDIWGQGTMVT V

Candidato	ID	Región variable de cadena pesada
CAR22-19	719	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGFGELSGAFDIWGQGTMV TV
CAR22-20	720	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGPIGCSGGSCLDYWGQGTLV TV
CAR22-21	721	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYGDYGDAFDIWGQGTT VTV
CAR22-22	722	EVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDHKVVRPGYWGQGTLVTV
CAR22-23	723	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGDYYMDVWGKGTTVTV
CAR22-24	724	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGPRYFDFSKAFDIWGQGTM VTV
CAR22-25	725	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAREMDSSGPDYWGQGTLVT V
CAR22-26	726	EVQLVESGAEVEEPGESLKISCKGSGYSFTGSWIGWGRQMPGKGLEWMGIYPGDSDTR YSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGFLRGGDCCGALDIWGQGTM VTV

Candidato	ID	Región variable de cadena pesada
CAR22-27	727	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSINSYYWSWIRQAPGKGLEWIAFTSISGNVKYN PSLTGRVTIAVDTSKNQFYLEVTSVTAADTAVYFCARGLDFLFAYDAFDIWGLGTMVTV
CAR22-28	728	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTEFWSGSVDYWGQGTLVTV
CAR22-29	729	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDSSGYTSPFDYWGQGTL VTV
CAR22-30	730	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGG TNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAREPASSSWYGYYYYYMDVW GKGTLVTV
CAR22-31	731	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGN TGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG-DNYWSYYGMDVWGQGTLVTV
CAR22-32	732	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNT NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASPSSSDSYDYWGQGTLVTV
CAR22-33	733	QVNLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLNTFGMSVSWIRQPPGKALEWLALIDWDDDKY YSTSLRTRLTISKDTAKNQVVLRMTNMDPMDTATYYCARIYGGDRTNTQAPYTTDLWG QGTLVTV
CAR22-34	734	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVSGASITSRHWWNWVRHSPGKGLEWIGQIYHSGTT YNPSLGSRVTISVDKSKNQISLELRSVTAADTATYYCVRDYLPLATYYGMDVWGQGTTV TV

Candidato	ID	Región variable de cadena pesada
CAR22-35	735	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDLAAAGNYYYYGMDVWG QGTTVTV
CAR22-36	736	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDDDFWSGSGAFDIWGQGTT VTV
CAR22-37	737	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARPEGVSYYDSSVLDYWGQG TLVTV
CAR22-38	738	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGST SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRAEDTAVYYCARGGYGDYLDAFDIWGQGTT VTV

Tabla 9B. Regiones variables de cadena pesada de moléculas de anticuerpo de CD22

Candidato	SEQ ID NO:	Región variable de cadena pesada
CAR22-53	671	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKW YSDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPYDFWSGYPDAFDIWGQ GTMVTVSS
CAR22-57	672	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSNNNAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTW YNDYVGSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARETDYGDYGAFDIWGQGTT VTVSS

Candidato	SEQ ID NO:	Región variable de cadena pesada
CAR22-58	673	EVQLQQSGPGLVNPSQTLSITCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTFYRSKWY MDYAVSVKGRITISPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAGGDYYYGLDVWGQGTTVTV SS
CAR22-59	674	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWG QGTMVTVSS
CAR22-60	675	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWG QGTMVTVSS
CAR22-61	676	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWG QGTMVTVSS
CAR22-62	677	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWG QGTMVTVSS
CAR22-63	678	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARDRLQDGNSWSDAFDVWG QGTMVTVSS
CAR22-64	679	EVQLQQSGPGLVKPSQTLPLTCAISGDSVLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTWY DDYASSVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVWG
		QGTMVTVSS

Candidato	SEQ ID NO:	Región variable de cadena pesada
CAR22-65	680	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSMLSNSDTWNWIRQSPSRGLEWLGRTYHRSTW YDDYAESVRGRVSINVDTSKNQYSLQLNAVTPEDTGVYYCARVRLQDGNSWSDAFDVW GQGTMVTVSS

Tabla 10A. Regiones variables de cadena ligera de moléculas de anticuerpo de CD22

Candidato	ID	Región variable de cadena ligera
m971	739	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSR FSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSTPQTFGQGTKLEIK
CAR22-1	740	SYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVPGTGTKLTVL
CAR22-2	741	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLMIVFGTGTKVTVL
CAR22-3	742	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTPYVFGTGTQLTVL
CAR22-4	743	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGENNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHLWVFGGGTKLTVL
CAR22-5	744	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGENNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGWVFGGGTKLTVL
CAR22-6	745	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVL

Candidato	ID	Región variable de cadena ligera
CAR22-7	746	QSALTQPGSVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLIIYDVSSRPSGVS NRFSGSQSGNTASLTISGLQAEDEADYSCSSYAGSNTLVFGTGTKVTVL
CAR22-8	747	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPD RFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNPWVFGGGTKLTVL
CAR22-9	748	SYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGTKLTVL
CAR22-10	749	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVYVFGTGTKVTVL
CAR22-11	750	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNHRPSGIPDR FSGSSSGDTDSLTITGAQAEDEADYYCHSRDSSGNHLFGGGTKLTVL
CAR22-12	751	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
CAR22-13	752	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASSYVQWYQQRPGSAPATVIYEDNQRPSGVPD RFSGSVDSSSNSASLTISGLKTEDEAVYYCQSYDGATWVFGGGTKLTVL
CAR22-14	753	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGTSSDVGGYNSVSWYQQYPGKAPKLMIYDVNNRPSGV SSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLFFGAGTKVTVL
CAR22-15	754	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYATWYQQKPGQAPVLVFYDENNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLTITGTQAEDEADYYCSSRDSSGNPSCVFGGGTKLTVL

Candidato	ID	Región variable de cadena ligera
CAR22-16	755	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTWVFGGGTKLTVL
CAR22-17	756	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLAGNGHNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQNPLTFGGGTKLEIKR
CAR22-18	757	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVFGTGTKVTVL
CAR22-19	758	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYASSSTLVFGGGTKVTVL
CAR22-20	759	QSALTQPAYVSGSPGQSITISCTGTNSDVGRYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSYRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTTSSTLDFGTGTKVTVL
CAR22-21	760	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYEYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVFGGGTKLTVL
CAR22-22	761	HVILTQPPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHQQQPEKGPRYLMKVNSDGSLSKGD GIPDRFSGSTSGAERYLTISSLQSEDEADYYCQTWGSGMAIFGGGTKLTVL
CAR22-23	762	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSKRPSGV PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSGTLVFGGGTKLTVL
CAR22-24	763	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYRNSRDSSGNPYVFGTGTKVTVL

Candidato	ID	Región variable de cadena ligera
CAR22-25	764	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVFGTGTKLTVL
CAR22-26	765	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFGQGTKLEIKR
CAR22-27	766	EIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVLQTPHTFGQGTKVDIKR
CAR22-28	767	SYVLTQPPSVSVAPGKTATITCGGTNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLAIYYDSDRPSGIPERF SGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYFCQVWDSSSDHLWVFGGGTKLTVL
CAR22-29	768	SYELTQPPSVSVAPGETASIACGGHNIRSKNVHWYQQKPGQAPVLVISYDGDRPSGIPERF SGSNLGSTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSDSDHLYVFGTGTKVTVL
CAR22-30	769	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINTYLNWYQQKPGKPPKLLIYAASNLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSLLTFGGGTKLEIK
CAR22-31	770	QSVLTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLIIYDADKRPSGIS NRFSGSKSGNTASLTISGLQVEDEADYYCCSYAGGSTWVFGGGTKVTVL
CAR22-32	771	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVTSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPAR
		FSGSGSGTEFTLTISSMQSEDFAVYFCQQYHTWPPLTFGGGTKVEIKT

Candidato	ID	Región variable de cadena ligera
CAR22-33	772	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGQGTKLEIK
CAR22-34	773	EIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSDGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASG VPDRFSGSGSGTDFTLQISGVEAEDVGVYYCMQALQTPFGQGTKLEIK
CAR22-35	774	SSELTQDPAVSVALGQTARITCQGDSLRSYFTSWYHQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRF SGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCDSRDSSGDHLVFGGGTKLTVL
CAR22-36	775	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHPVVFGGGTKLTVL
CAR22-37	776	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYEHVSWYQHHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCVSYRNPNSLVFGTGTKVTVL
CAR22-38	777	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLVFGTGTQLTVL

Tabla 10B. Regiones variables de cadena ligera de moléculas de anticuerpo de CD22

Candidato	ID	Región variable de cadena ligera
CAR22-53	681	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKVIISEVSNRPSGVS HRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSGRTLYVFGTGSKVTVLG
CAR22-57	682	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSRNDIGAYESVSWYQQHPGNAPKLIIHGVNNRPSGVFD RFSVSQSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSHTTTSTLYVFGTGTKVTVLG

Candidato	ID	Región variable de cadena ligera
CAR22-58	683	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVNNRPSGVS HRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTYVFGTGTKVTVLG
CAR22-59	684	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDRGGFNYVSWYQQHAGEAPKLMIYEVTNRPSGVS DRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYASGSFLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-60	685	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVS NRFSGTKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKLTVLG
CAR22-61	686	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-62	687	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTKVTVLG
CAR22-63	688	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYIFGTGTKVTVLG
CAR22-64	689	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL
CAR22-65	690	QSALTQPASASGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLYVFGTGTQLTVL

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada enumerada en la Tabla 9A o 9B. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno comprende además una CDR1 LC, una CDR2 LC y una CDR3 LC. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una LC CDR1, una LC CDR2 y una LC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera enumerada en la Tabla 10A o 10B.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3 enumeradas en la Tabla 10A o 10B, y una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 enumeradas en la Tabla 9A o 9B. La invención utiliza dominios de unión de CD22 como se define en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, las CDRs se definen de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia, o una combinación de las mismas.

El orden en el que aparecen los dominios VL y VH en el scFv puede variar (es decir, orientación VL-VH o VH-VL) y en el que se pueden insertar tres o cuatro copias de la subunidad "G4S" (SEQ ID NO: 18), en el que cada subunidad comprende la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 18) (por ejemplo, $(G4S)_3$ (SEQ ID NO: 107) o $(G4S)_4$ (SEQ ID NO: 106)), puede conectar los dominios variables para crear la totalidad del dominio scFv. Como alternativa, la construcción de CAR puede incluir, por ejemplo, un conector que incluye la secuencia GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 1322).

Todos estos clones contenían un cambio de residuo Q/K en el dominio de señal del dominio coestimulador derivado de la cadena CD3zeta.

Construcciones CAR20

Se aislaron fragmentos variables monocatenarios anti-CD20. Véanse la Table 11A y 11B. Los scFv anti-CD20 se clonaron en vectores de expresión de CAR lentivíricos con la cadena CD3zeta y la molécula coestimulante 4-1BB. Los plásmidos que contienen CAR se amplificaron mediante transformación bacteriana en células STBL3, seguida por Maxiprepr utilizando el kit Plasmid Maki de Qiagen sin endotoxinas. Se produjo sobrenadante lentivírico en células 293T utilizando técnicas convencionales.

Las secuencias de los CAR se proporcionan a continuación en las Tablas 11A y 11B. En el presente documento se describen componentes adicionales de CAR (p. ej., dominios líder, bisagra, transmembrana y de señalización).

Tabla 11A: Construcciones de CAR CD20 de rata

Nombre	**SEQ ID NO:**	**Secuencia**
Dominio scFv de CAR20-1	800	qiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseyiftdyafhwvkqapgkglkwmgwintysgkpt yaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargayygyrdwfiywggqtlvtvssg gggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknyla wyqqkpgqspklliywastresgvpdrfigsgsgtdfiltissvqaedlavyycqqyynfp pwtfgggtklelk
Dominio scFv CAR20-1 nt	801	caaattcaactggtccagtccggccctgagctgaagaagcctgggagaatccgtgaagatctc ctgcaagacctcggagtacaccttcactgactacgccttccactgggtcaagcaggcacctgg gaaaggcctgaagtggatgggctggatcaacacttactcggggaagccaacctacgccgat gatttcaaggggaagatttcgtgtttagcctggaggactccgccctggacagctaacctccaaatct ccaaccttaagaacgaggacactgccgacctacttctgcgcgcgggggagcctattacggttatc gcgactggttcacctactggggacagggcaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggagg ctcaggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgatattgtgat gacccagacccctctgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccatgtcctgcaag agctcacagtcccttgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtaccagcagaag cccggacagtccctaaactgctgatctactgggccctcgactagggaatctggcgtgccctgac cgctttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtgcaggccgag gacctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttccctcgccctggacttttcggcggtggaa cgaagctcgaactcaag

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
scFv soluble CAR20-1 - nt	802	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aaattcaactggtccagtccggccctgagctgaagaagccgggagaatccgtgaagatctcct gcaagacctcggagtacaccttcactgactacgccttccactgggtcaagcaggcacctggg aaaggcctgaagtggatgggctggatcaacacttactcggggaagccaacctacgccgatga tttcaagggaagattcgtgtttagcctggaggactccgccccggacagctaacctccaaatctcc aaccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgcgcgcgcgggagcctattacggttatcgc gactggttcacctactggggacagggcaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctc agggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccgatattgtgatga cccagacccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccatgtcctgcaagag ctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtaccagcagaagcc cggacagtccccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctggcgtgccccgacc gctttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtgcaggccgagg acctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttccccgccctggacttcggcggtggaac gaagctcgaactcaagggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
scFv soluble CAR20-1 - aa	803	malpvtalllplalllhaarpqiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseytftdyafhwvkqapg kglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargayyg yrdwftywgqgtlvtvssgggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvt msckssqsllysenkknylawyqqkpgqspklliywastresgvpdrfigsgsgtdfltis svqaedlavyycqqyynfppwtfgggtklelkgshhhhhhhhh
CAR20-1 completo - nt lentivirus	804	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aaattcaactggtccagtccggccctgagctgaagaagccgggagaatccgtgaagatctcct gcaagacctcggagtacaccttcactgactacgccttccactgggtcaagcaggcacctggg aaaggcctgaagtggatgggctggatcaacacttactcggggaagccaacctacgccgatga tttcaagggaagattcgtgtttagcctggaggactccgccccggacagctaacctccaaatctcc aaccttaagaacgaggacactgcgacctacttctgcgcgcgcgggagcctattacggttatcgc gactggttcacctactggggacagggcaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctc agggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccgatattgtgatga

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
		cccagaccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccatgtcctgcaagag ctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtaccagcagaagcc cggacagtccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctggcgtgcccgacc gctttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtgcaggccgagg acctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttcccgccctggacttcggcggtggaac gaagctcgaactcaagaccactacccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatc gcctcccagccctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtgggggccgtgca taccccgggctctgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcgggg tcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctt taagcaaccctttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggtt cccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgc tccagcctacaagcagggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagag gagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgc gcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaag cctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaaggggcaaaggccacgacggactgta ccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccg cctcgg
CAR20-1 - Completo - aa	805	malpvtalllplalllhaarpqiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseyiftdyafhwvkqapg kglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargayyg yrdwftywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvt mscksqsllysenkknylawyqqkpgqspkllfywastresgvpdrfigsgsgtdfiltis svqaedlavyycqqyynfppwtfgggtkleikttpapripptpaptiasqplslrpeacrpaa ggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeed gcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpem ggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydal hmqalppr
Dominio scFv de CAR20-2	806	evqlvesgggivqpgrslklsclasgftfskygmnwirqapgkglewvasisstsiyiyyad tvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdyssysywgqgvmvtvssggggsg gggsggggsggggsqvvltqpksvstslestvklsckinsgnigsyfihwyqqhegrsptt miyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyfchsydsginivfgggtkltv l

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-2 - nt	807	gaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagccaggaagatccctgaagctgt cctgtctcgcctcgggcttcactttctccaaatacggcatgaattggattcgccaggcaccccgg aaaggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatctacatctactatgccgatac cgtcaagggccgcttcactatctcccgcgagaacgctaagaacaccctttacttgcaaatgacc tccctgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgcccggcacgactactcatcctactcct actggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcagggggggggcgg gctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctcccaagtcgtgctgacgcaacccaagt ccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcagctgcaagattaactcgggcaacatt aggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaaggacggtcccctaccactatgatctacc gggacgacaagcggccgcacggagtgccggacagattctcgggttcaatcgattcctcatct aactcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagaccgaggacgaagcgatctacttctgccac tcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcggaactaagctgacagtgctg
CAR20-2 - scFv soluble - nt	808	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccg aggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagccaggaagatccctgaagctgtcc tgtctcgcctcgggcttcactttctccaaatacggcatgaattggattcgccaggcaccccggaa aggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatctacatctactatgccgataccg tcaagggccgcttcactatctcccgcgagaacgctaagaacaccctttacttgcaaatgacctc cctgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgcccggcacgactactcatcctactcctac tggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcagggggggggcggc tcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctcccaagtcgtgctgacgcaacccaagtcc
		gtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcagctgcaagattaactcgggcaacattgg gtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaaggacggtcccctaccactatgatctaccgg gacgacaagcggccgcacggagtgccggacagattctcgggttcaatcgatttcctcatctaac tcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagaccgaggacgaagcgatctacttctgccactcct acgactcgggtattaacattgtgttcggcggcgggactaagctgacagtgctgggatcgcacc accatcaccatcatcatcac
CAR20-2 - scFv soluble - aa	809	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslklsclasgftfskygmnwirqapg kglewvasisstsiyiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdyssysy wgqgvmvtvssgggggsggggsggggsggggsqvvltqpksvstslestvklsckinsgn igsyfihwyqqhegrspttmiyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltiunvqtedeaiyf chsydsginivfgggtkltvlgshhhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20- 2 - Completo - nt	810	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccaagccgcctcggcccg aggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagccaggaagatccctgaagctgtcc tgtctcgcctcgggcttcacttctccaaatacggcatgaattgggttcgccaggcaccccggaa agggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatctacatctactatgccgataccg tcaagggccgcttcactatctcccgcgaggaacgctaagaacaccctttacttgcaaatgacctc cctgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgcccggcacgactactcatcctactcctac tggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggggggggcggc tcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctcccaagtcgtgctgacgcaacccaagtcc gtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcagctgcaagattaactcgggcaacattgg gtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaaggacggtcccctaccactatgatctaccgg gacgacaagcggccgcacggagtgccggacagattctcgggttcaatcgattcctcatctaac tcggcgttctcaccatcaacaacgtgcagaccgaggacgaagcgatctacttctgccacttct acgactcgggtattaacattgtgttcggcggcgggactaagctgacagtgctgaccactaccc cagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccg gaggcatgtagaccccgcagctggtggcgccgtgcataccccgggctcttgacttcgcctgcga tatctacattttgggccccttgggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctti actgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggtcagaacc agctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggag aggacgggaccccagaaatgggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgt acaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaagggga acgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaagg acacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 2 - Completo - aa	811	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgglvqpgrslklsclasgftfskygmnwirqapg kglewvasisstsiyiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdysaysy wgqgvmvtvssggggsggggsgggsggggsqvvltqpksvstslestvklsckinsgn igsyfihwyqqhegrspttmiyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyf chsydsginivfgggtkltvlttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-3	812	evqlvesgglvqpgrslklscaasgfttrdyymawvrqapkkglewvasisyegnpyy gdsvkgrftisrnnakstlylqmnslrsedtatyycarhdhnnvdwfaywgqgtlvtvssg gggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqslllysenkknyla wyqqkpgqspkllifwastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfpt fgsgtkleik

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-3 nt	813	gaagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgcagccgggaagatccctgaagctgtc atgcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatggcctgggtcagacaggcacctaa gaagggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaaaccccgtactacggagactcgg
		tgaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaagagcacgctgtacttgcaaatgaact ccctccggtcggaggacacagccactactactgtgcccggcacgaccataacaacgtcgatt ggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggg gggggcggctcgggaggcgggtggaagcggaggaggaggctccgacatcgtgatgactca gactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccatgtcgtgcaagagctcc cagtccctgctgtactccgaaaacaacgaagaattatctcgcctggtaccagcagaagcctgga cagtccccgaagctcctgatctttgggcgtcgaccagggaatccggcgtgccgatcgcttc attggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattgcagcgtccaggcggaggacct ggcgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcggggaccaagctgga gatcaag
CAR20-3 - scFv soluble - nt	814	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccg aagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgcagccgggaagatccctgaagctgtca tgcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatggcctgggtcagacaggcacctaag aagggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaaaccccgtactacggagactcggt gaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaagagcacgctgtacttgcaaatgaactc cctccggtcggaggacacagccactactactgtgcccggcacgaccataacaacgtcgatt ggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggg gggggcggctcgggaggcgggtggaagcggaggaggaggctccgacatcgtgatgactca gactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccatgtcgtgcaagagctcc cagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggtaccagcagaagcctgga cagtccccgaagctcctgatctttgggcgtcgaccagggaatccggcgtgccgatcgcttc attggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattgcagcgtccaggcggaggacct ggcgtgtactactgccaacagtactacaacttccccactttcggatcggggaccaagctgga gatcaagggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-3 - scFv soluble - aa	815	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslklscaasgfiffdyymawvrqap kkglewvasisyegnpyygdsvkgrfiismnakstlylqmnslrsedtatyycarhdhnn vdwfaywgqgtlvtvssggggsggggsgggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvt msckssqsllysenkknylawyqqkpgqspkllifwastresgvpdrfigsgsgtdftlsss vqaedlavyycqqyynfptfgsgtkleikgshhhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20- 3 - Completo - nt	816	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aagtgcagcttgtggagtctggcgggggtctggtgcagccgggaagatccctgaagctgtca tgcgccgcgtccgggtttaccttccgcgattactacatggcctgggtcagacaggcacctaag aaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaaggaaaccgtactacggagactcggt gaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaagagcacgctgtacttgcaaatgaacic cctccggtcggaggacacagccacttactactgtgcccggcacgaccataacaacgtcgatt ggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggctcaggg ggggggcggctcgggaggtggtggaagcggaggaggaggctccgacatcgtgatgactca gactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccatgtcgtgcaagagctcc cagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggtaccagcagaagcctgga cagtccccgaagctcctgatctttgggcgtcgaccagggaatccggcgtgccccgatcgctic attggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgtccaggcggaggacct ggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccacttteggatggggaccaagctgga gatcaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccag cctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtggggccgtgcataccgggg gtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgc tttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaac ccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagagg aggaggaagccggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagccgcagatgctccagccta caagcagggqcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgac gtgctggacaagcggagaggacggggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaaga atccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcga
		gattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 3 - Completo - aa	817	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgrslklscaasgfttfrdyymawvrqap kkglewvasisyegnpyygdsvkgrftisrmnakstlylqmnslrsedtatyycarhdhm vdwfayvggqtlvtvssgggggsggggsggggsggggsdivmtqtpssqavsagekvt msckssqsllysenkknylawyqqkpgqspkllifwastresgvpdrftgsgsgtdftltiss vqaedlavyycqqyynfptfgsgtkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaagga vhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkliyifkqpfmrpvqttqeedgcs crfpeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemgg kprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhm qalppr
Dominio scFv de CAR20-4	818	qvtlkesgpgilqpsqtlsltctftfsglstygmsvgwirqpsgkglewladiwwdddkhyn pslkmltiskdtsknqafikitnvdtadtatyycarssttdgivtyvmdvwgqgasvtvssg gggsggggsggggsggggsdvqmtqspsllsasvgdavtinckasqninrylnwyqqkl gegprllivsanslqtgipsrfsgsgsgadftltitspqpedvatyfclqhnswpltfgsgtklei k

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-4 nt	819	caagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctctcgcttact tgcaccttcaccccgctttctcactgtccacttacggaatgtccgtgtggatggattcggcagcccca gcggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcattacaaccct agcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttcctgaagat caccaacgtggatacccgccgacactgcaacatactattgtgcccgctcctcaaccaccgatgg gatcgtgacctacgtgatggacgtctgggccagggagttccgtgaccgtgtcctccggcg gtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccga cgtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactattaa ctgcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaag gccgagacttctcatctacttccgccaactccctgcaaactggcatccccgtcgaggttcagcg gatcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagcctcagccccgaagatgtggcca cctacttctgcctccaacacaactcctggccccctgaccttggttcgggcaccaagctggagat caag	
CAR20-4 - scFv soluble - nt	820	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctctcgcttactt gcaccttcaccccgctttctcactgtccacttacggaatgtccgtgtggatggattcggcagcccag cggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcattacaacccta gcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttcctgaagatc accaacgtggatacccgccgacactgcaacatactattgtgcccgctcctcaaccaccgatggg atcgtgacctacgtgatggacgtctgggccagggagttccgtgaccgtgtcctccggcggt ggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgac gtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactattaact gcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaagg gccgagacttctcatctacttccgccaactccctgcaaactggcatccccgtcgaggttcagcgg atcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagcctcagccccgaagatgtggccac ctacttctgcctccaacacaactcctggccccctgaccttggttcgggcaccaagctggagatc aagggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac	
CAR20-4 - scFv soluble - aa	821	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgilqpsqtlsltctfsfslstygmsvgwirqpsgk glewladiwwddddkhynpslknrltiskdtsnqaflkitnvdtadtatyycarssttdgivt yvmdvwgqgasvtvssggggsggggsggggsggggsdvqmtqspsllsasvgdavti nckasqninnylnwyqqklgegprlliysansiqtgipsrfsgsgsgadftltitspqpedvat yfclqhnswpltfgsgtkleikgshhhhhhhhh	
CAR20- 4 - Completo - nt	822	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctctcgcttactt gcaccttcaccccgctttctcactgtccacttacggaatgtccgtgtggatggattcggcagcccag	

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
		cggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcattacaaccctа gcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttcctgaagatc accaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgccccgctcctcaaccaccgatggg atcgtgacctacgtgatggacgtctggggccagggagcttccgtgaccgtgtcctccggcggt ggaggctcaggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgac gtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactattaact gcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaaagg gccgagacttctcatctactccgccaacrccctgcaaactggcatcccgtcgaggttcagcgg atcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagccctcagccgaagatgtggccac ctacttctgcctccaacacaactcctggccccctgaccttggttcgggcaccaagctggagatc aagaccactaccccagcaccgaggccaccccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctct gtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtgggccgtgcataccccgggctctg acttcgcctgcgatatctacatttgggccccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcac tcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctta tgaggcctgtgcagactacteaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagga ggaaggcggctgcgaactgccgcgtgaaattcagccgcagccgcagatgctccagcctacaag cagggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgct ggacaagcggagaggacgggaccctgaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccc caagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattg gtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagc accgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg	
CAR20- 4 - Completo - aa	823	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgilqpsqtlsltctftrfslstygmsvgwirqpsgk glewladiwwdddkhynpslknrltiskdtsknqaflkitnvdtadtatyycarssttdgivt yvmdvwgqgasvtvssggggsggggsggggsggggsdvqmtqspsllsasvgdavti nckasqnirylnwyqqklgegprllysanslqtgipsrfsgsgsgadfiltitspqpedvat yfclqhnswpltfgsgtkleiktttpaprppтpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeg gcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqe glynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr	
Dominio scFv de CAR20-5	824	evqlvesggglvqpgtslklscvasgfitfsssgmqwirqapkkglewisgiyydsykksy adsvkgrftisrdnsknтlyiemnslrsedtatyycaksayyгykdyfdywgqgvmvtvs sggggsggggsggggsggggsdiqmtqsppslsaslgdkvtitcqasqninkyiawyqq kpgkaprllirytstlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgt klelk

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-5 nt	825	gaggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcctgaagctcag ctgtgtggccagcggtttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggcaggctcccaag aagggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcctacgccgattcc gtgaaagggtcgcttcaccatctccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgagatgaac tccttgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggctacaag gactacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctc agggcggtggcggctcgggaggcggtggaagcggaggaggaggctccgacatccaaatg acacagtcaccccctctctttccgcgagcctgggagataaggtcaccattacgtgccaagcgt cccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaaggccccgcggct gctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcggctccggcag cgggagcggactactcgttctccatctccaatgtggagtccggggacgtggccagctactattg cctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaaatcaag
CAR20-5 - scFv soluble - nt	826	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccagccgctcggccag aggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcctgaagctcagc tgtgtggccagcggtttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggcaggctcccaaga agggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcctacgccgattccg tgaaaggtcgcttcaccatctccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgagatgaact
		ccttgcgctccgaggataccgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggctacaagg actacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctca gggcggtggcggctcgggaggcggtggaagcggaggaggaggctccgacatccaaatga cacagtcaccccctctctttccgcgagcctgggagataaggtcaccattacgtgccaagcgtc ccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaaggccccgcggct gctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcggctccggcag cgggagggactactcgttctccatctccaatgtggagtccggggacgtggccagctactattg cctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaaatcaagggatc gcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-5 - scFv soluble - aa	827	malpvtalllplalllhaarpevqlvesggglvqpgtslklscvasgfffssagmqwirqapk kglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnskntlylemnslrsedtatyycaksayygy kdyfdywgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqsppslsaslgdkvti tcqasqninkyiawyqqkpgkaprllirytstlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdva syyclqyddlpytfgpgtklelkgshhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20- 5 - Completo - nt	828	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aggtccagctgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcctgaagctcagc tgtgtggccagcggttttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggcaggctcccaaga agggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcctacgccgattccg tgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacctcgagatgaact ccttgcgctccgaggatacgcaacctattactgcgccaagtcggcctactacggctacaagg actacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggctca ggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacatccaaatga cacagtcaccccctctctttccgcgagcctgggagataaggtcaccattacgtgccaagcgtc ccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaaggccccgcggct gctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagcggctccggcag cgggagggactactcgttctccatctccaatgtggagtccgggacgtggccagctactattg cctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctggaaatcaagacca ctaccccagcaccgaggccaccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctg cgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtggggccgtgcataccccgggctcttgacttcgc ctgcgatatctacatttgggccccttggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactctgtat cactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggc ctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaagg cggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggg cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacggacccagaaatgggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagag ggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaa aggggaacgcagaaggaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgcca ccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 5 - Completo - aa	829	malpvtalllplalllhaarpevqlvesgggvqpgtslklscvasgftfssygmqwirqapk kglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnskntlylemnsirsedtatyycaksayygy kdyfdywgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqsppslsaslgdkvti tcqasqninkyiawyqqkpgkaprllirytsilesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdva syyclqyddlpytfgpgtkleikttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhirgld facdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeee eggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlyneinlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknp qeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqgistatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-6	830	qvtlkesgpgllqpsqtlsltctfsgfslnthgmgvgwirqpsgkglewlaniwwdddky ynpslknrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegspvvttvfdywgqgvmvtv ssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsflsasvgdrvtinckasqninryinwyq qklgeapklliynanslqtgipsrfsgsgsgtdftltisslqpedvatyfclqhnsrpltfgsgtkl eik

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-6 nt	831	caagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtccctcact tgtaccttcgccggctttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattaggcagccc tcgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtattacaaccc gagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcctgaaaat cactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggttcccccg tcgtgacaactgtgttcgactactgggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctcggcggtg gaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagccggaggaggaggctccgacat ccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaactgc aaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctggggaagccc cgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttcccggttctcgggga gcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctccttcaacccgctgacgtggccacccta cttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatcaag
CAR20-6 - scFv soluble - nt	832	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc aagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtccctcactt gtaccttcgccggctttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattaggcagccct cgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtattacaaccc gagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcctgaaaat cactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggttcccccg tcgtgacaactgtgttcgactactgggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctcggcggtg gaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagccggaggaggaggctccgacat ccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaactgc aaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctggggaagccc cgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttcccggttctcgggga gcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctccttcaacccgctgacgtggccaccta cttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatcaagg gatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-6 - scFv soluble - aa	833	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfslnthgmgvgwirqpsg kglewlaniwwdddkyynpslknrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegspv vttvfdywgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsflsasvgdrvti nckasqninrvlnwyqqkigeapklliynanslqtgipsrfsgsgsgtdftltisslqpadvat yfclqhnsrpltfgsgtileikgshhhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20-6 - Completo - nt	834	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtccctcactt gtaccttcgccggctttcactgaacacccacgggaatgggcgtgggatggattaggcagccct cgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtattacaaccc gagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcctgaaaat cactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgccccggatcgaaggttccccg tcgtgacaactgtgttcgactactggggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctccggcggtg gaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccgacat ccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaactgc aaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaagccc cgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttccggttctcgggga gcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctccttcaaccccgctgacgtggccaccta cttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatcaaga ccactaccccagcaccgaggccacccacccccggcctctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtggggccgtgcataccccgggggtcttgactt cgcctgcgatatctacattgggccccttgggtggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgt gatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccgaggaggaggga aggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtccggagagaggagtacgacgtgctgg
		acaagcggagaggacggggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccca agagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggta tgaaagggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcacc gccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-6 - Completo - aa	835	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfslnthgmgvgwirqpsg kglewlaniwwdddkyynpslkmrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegspv vttvfdywgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggsdiqmtqspsflsasvgdrvti nckasqninryinwyqqklgeapklliynansiqtgipsrfsgsgsgtdfltlttsslqpadvat yfclqhnsrpltfgsgtrleikrtpaprpptpapttasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-7	836	qvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirqpsgkslewlaaiawdgdkyy npslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydvgyyyfdfwgqgvmvtvssg gggsggggsggggsggggskivltqsptitaaspgekvtitclassrvsniywyqqksgas pkllivstsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaedaatyychqwssnpwtfgggtklel k

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-7 nt	837	caagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttaca tgctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagccga gcggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaaccc gagcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacaccttccaacaccccaagtgttccttcggat cacctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgtggg ctactactacttcgatttctggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggc tcaggtggtggcggctcgggaggtggtgtgaagcggaggagggaggctccaagattgtgct gacccagagccccactattaccgccgcctccccggggggaaaaggtcaccatcacttgtctgg cgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagccccaagctgc tgatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggtttctggctcgggaagcgg aaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacttactactgcca ccagtggtcgagcaaccctttggacttcggtggaggcaccaaactcgagctcaag
CAR20-7 - scFv soluble - nt	838	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttacat gctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagccgag cggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaaccg agcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacaccttccaacaccccaagtgttccttcggatc acctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgtgggc tactactacttcgatttctggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggct caggtggtggcggctcgggaggtggtgtgaagcggaggagggaggctccaagattgtgctg acccagagccccactattaccgccgcctccccggggggaaaaggtcaccatcacttgtctggc gtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagccccaagctgct gatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggtttctggctcgggaagcgga accagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacttactactgccac cagtggtcgagcaaccctttggacttcggtggaggcaccaaactcgagctcaagggatcgca ccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-7 - scFv soluble - aa	839	maipvtallplalllhaarpqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirqps gkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydvgy yyfdfwgqgvmvtvssgggesgggesgggesgggesgggskivltqsptitaaspgekvtitcl assrvsniywyqqksgaspklliystsslasgvpyrfsgsgsgtsyslfintmeaedaatyyc hqwssnpwtfgagtklelkgshhhhhhhhh
CAR20-7 Completo - nt	840	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcccttacat gctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagccgag

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
		cggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaacccg agcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacacccaagtgttccttcggatc acctccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactcgccgggactacgacgtggcc tactactacttcgatttctgggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctccggcggtggaggct cagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccaagattgtgctg acccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccatcacttgtctggc gtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagccccaagctgct gatctactcgaccttcttcctcgcgtcgggagtgccttaccggttttctggctcgggaagcgga accagctacttccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacttactactgccac cagtggtcgagcaaccctttggacttcggtggaggcaccaaactcgagctcaagaccactac ccccagcaccgaggccacccacccccggcctctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcatacccgggggtcttgacttcgcctgc gatatctacatttgggccccttggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactctgtatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg	
CAR20-7 Completo - aa	841	malpvtalllplalllhaarpqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirqps gkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydvgy yyfdfwgqgvmvtvssggggsggggsggggsggggskivltqsptitaaspgekvtitcl asasrvsniywyqqksgaspklliystsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaedaatyyc hqwssnpwtfgggtklelkttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr	
Dominio scFv de CAR20-8	842	qiqlvqsgpelkkpgesvkiscksasgntvtgyamhwvrqapgkglkwmgwintysgk ptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarstyygykdwfaywggtlvtv ssggggsggggsggggsggggsmiqltqspsrlsasvgdrvtlsckgsqninnylawyqq klgeapklliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdyttltisglqpedvatyfccqynngntfgagtkl elk	

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-8 nt	843	caaattcagttggtgcagtccggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatctc gtgcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccaggcaccg ggaaagggactgaagtggatgggctggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgcc gatgacttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgccatcttcaaat ctccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctattacggcta caaggactggttcgcgtattgggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccggcggtggag gctcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccaacatcca actgactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacactgagctgc aagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggagaggccc ccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctcaggatc agggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggccacta cttctgctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaactcaaa	
CAR20-8 - scFv soluble - nt	844	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc aaattcagttggtgcagtccggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatctcgt gcaaagcttccggcggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccaggcaccgg gaaagggactgaagtggatgggctggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgccga tgacttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgccatcttcaaatct
		ccaaccctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctattacggctaca aggactggttcgcgtattgggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggc tcaggggggggcggctcgggaggggtggaagcggaggaggaggctccaacatccaact gactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacactgagctgcaag ggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggagaggccccaa gctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctcaggatcaggg tccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggccacctacttctg ctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaactcaaaggatcgc accaccatcaccatcatcatcac
CAR20-8 - scFv soluble - aa	845	malpvtalllplalllhaarpqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrqa pgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarsty ygvkdwfayvggqtlvtvssggggsggggsggggsggggsniqltqspsrlsasvgdrvt lsckgsqninnylawyqqklgeapklliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdytflisglqpedv atyfcqynngntfgagiklelkgshhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20- 8 - Completo - nt	846	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccaagccgcctcggcccc aaattcagttggtgcagtccggcccggagctgaagaagcctggagaatccgtgaagatctcgt gcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccaggcaccgg gaaagggactgaagtggatgggctggatcaacacctacagcggaaagccgacttacgccga tgactttaagggacgctgtgtgtttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatcttcaaatct ccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgccccggagcacctatiacggctaca aggactggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccggcggtggaggc tcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggaggctccaacatccaact gactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacactgagctgcaag ggtctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggagaggccccaa gctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctcaggatcaggg tccggtaccgactacaccttcacgattcgggacttcagcctgaggatgtggccacctacttctg ctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaactcaaaaccacta cccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgt ccggaggcatgtagaccccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtctgacttcgccig cgatatctacatttgggccccictggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactctgtatcac tctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccccagaaatgggcggggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca agcacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 8 - Completo - aa	847	malpvtalllplalllhaarpqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrqa pgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarsty ygykdwfaywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggsniqltqspsrlsasvgdrvt lsckgsqnimnylawyqqkpgeapklliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdytftisglqpedv atyfcqymngntfgagtklelkttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgld facdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeee eggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknp qeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-9	848	divmtqtpssqavsagekvtmscksqsllysenkknylawyqqkpgqspkllifwastr esgvpdrfigsgsgtdftlticsvqaedlavyycqqyynfptfgsgtkleikggggsgggs ggggsggggsevqlvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyymawvrqapkkglewva sisyegnpyygdsvkgrftismnakstlylqmnslrsedtatyycarhdhnnvdwfayw gqgtlvtvss

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-9 nt	849	gacatcgtgatgactcagactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcacca tgtcgtgcaagagctcccagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggta ccagcagaagcctggacagtccccgaagctcctgatcttttgggcgtcgaccagggaatccg gcgtgccccgatcgcttcattggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgt ccaggcggaggacctggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccacttttcggatcg gggaccaagctggagatcaagggcggtggaggctcagggggcggcggctcgggaggggg gtggaagcggaggaggaggctccgaagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgca gccgggaagatccctgaagctgtcatgcgccgcgtccgggttaccttccgcgattactacatg gcctgggtcagacaggcacctaagaaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaagg aaaccccgtactacggagactcggtgaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaaga gcacgctgtacttgcaaatgaactccctccggtcggaggacacagccacttactactgtgccc ggcacgaccataacaacgtcgatttggttcgcctactgggtcaaggaaccctcgtgaccgtgt cctcc
CAR20-9 - scFv soluble - nt	850	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatcgtgatgactcagactccaagcagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccat gtcgtgcaagagctcccagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctcgcctggtac cagcagaagcctggacagtccccgaagctcctgatcttttgggcgtcgaccagggaatccgg cgtgccccgatcgcttcattggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgtc caggcggaggacctggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccacttttcggatcg gggaccaagctggagatcaagggcggtggaggctcagggggcggcggctcgggaggggg gtggaagcggaggaggaggctccgaagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgca gccgggaagatccctgaagctgtcatgcgccgcgtccgggttaccttccgcgattactacatg gcctgggtcagacaggcacctaagaaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaagg aaaccccgtactacggagactcggtgaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaaga gcacgctgtacttgcaaatgaactccctccggtcggaggacacagccacttactactgtgccc ggcacgaccataacaacgtcgatttggttcgcctactgggtcaaggaaccctcgtgaccgtgt cctccggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-9 - scFv soluble - aa	851	malpvtalllplalllhaarpdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknylaw yqqkpgqspkllifwastresgvpdrfigsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfptfg sgtkleikggggsggggsggggsggggsevqlvesgglvqpgrslkfscaasgftfrdyy mawvrqapkkglewvasisyegnpyygdsvkgrftisrmnaksllylqmnslrsedtaty ycarhdlnnvdwfavwgqgtlvtvssgshhhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20-9 Completo - nt	852	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatcgtgatgactcagactccaagccagccaggccgtgtccgccggagagaaagtcaccat gtcgtgcaagagctcccagtccctgctgtactccgaaaacaagaagaattatctgcctggtac cagcagaagcctggacagtccccgaagctcctgatctttgggcgtcgaccagggaatccgg cgtgccccgatcgcttcattggctccggttccggcaccgacttcaccctgaccattagcagcgtc caggccgaggacctggctgtgtactactgccaacagtactacaacttccccacttttcggatcg gggaccaagctggagatcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggg gtggaagcggaggaggaggctccgaagtgcagcttgtggagtctggcggcggtctggtgca gcctgggaagatccctgaagctgtcatgcgccgcgtccgggttaccttccgcgattactacatg gcctgggtcagacaggcacctaagaaggggctggaatgggtggcatccatctcatatgaagg aaaccccgtactacggagactcggtgaaaggccgcttcactatctcacggaacaacgctaaga gcacgctgtacttgcaaatgaactccctccggtcggaggacacagccactactactgtgccc ggcacgaccataacaacgtcgattggttcgcctactggggtcaaggaaccctcgtgaccgtgt cctccaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctcccagcct ctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtgggccgtgcatacccggggtct tgacttcgcctgcgatatctacattgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgcttc actcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctt catgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagg aggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaa
		gcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggaccctgaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatc ccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagat tggtatgaaagggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcag caccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 9 - Completo - aa	853	malpvtalllplalllhaarpdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknylaw yqqkpgqspkllifwastresgvpdrftgsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfptfg sgtkleikgggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpgrslklscaasgftfrdyy mawvrqapkkglewvasisyegnpyygdsvkgrftisrdnakstlylqmnslrsedtaty ycarhdhunvdwfaywgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggav htrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkklyifkqpfmrpvqttqeedgcscr fpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkp rrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdgiyqglstatkdtydalhmqa lppr
Dominio scFv de CAR20-10	854	diqmtqsppslsaslgdkvtitcqasqninkyiawyqqkpgkaprllirytslesgtpsrfsg sgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgtklelkggggsggggsggggsgg ggsevqlvesgggivqpgtslklscvasgfttfsssgmqwirqapkkglewisgiyydsyk ksyadsvkgrftisrdnskmlylemnslrsedtatyycaksayygykdyfdywgqgvm vtvss

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-10 nt	855	gacatccaaatgacacagtcaccccctctcttccgcgagcctgggagataaggtcaccatta cgtgccaagcgtcccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaa ggccccgcggctgctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcag cggctccggcagcgggagggactactcgtctccatctccaatgtggagtccgaggacgtgg ccagctactattgcctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctgg aactcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggagg aggaggctccgaggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagc ctgaagctcagctgtgtggccagcggtttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggc aggctcccaagaagggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtcct acgccgattccgtgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacc tcgagatgaactccttgcgctccgaggatacggcaacctattactgcgccaagtcggcctacta cggctacaaggactacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccggatc gcaccaccatcaccatcatcac
CAR20-10 - scFv soluble - nt	856	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatccaaatgacacagtcaccccctctcttccgcgagcctgggagataaggtcaccattac gtgccaagcgtcccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaag gccccgcggctgctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagc ggctccggcagcgggagggactactcgtctccatctccaatgtggagtccgaggacgtggc cagctactattgcctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctgga actcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggga ggaggctccgaggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcc tgaagctcagctgtgtggccagcggtttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggca ggctcccaagaagggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtccta cgccgattccgtgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacct cgagatgaactccttgcgctccgaggatacggcaacctattactgcgccaagtcggcctacta cggctacaaggactacttcgactattggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccggatc gcaccaccatcaccatcatcac
CAR20-10 - scFv soluble - aa	857	maipvtallplalllhaarpdiqmtqsppslsaslgdkvtitcqasqninkyiawyqqkpg kaprlirytstlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgtklel kggggsggggsggggsggggsevqlvesgggivqpgtslklscvasgftfsssgmqwir qapkkglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnskntlylemnslrseditatyycaksa vygykdyfdywgqgvmvtvssgshhhhhhhhh
194181	858	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20- 10 Completo - nt		acatccaaatgacacagtcaccccctctcttccgcgagcctgcgagataaggtcaccattac gtgccaagcgtcccagaacatcaacaagtacatcgcctggtaccagcagaaaccgggaaag gccccgcggctgctgattagatacacctcgactctggaatccggcactccatcaagattcagc ggctccggcagcgggagggactactcgtctccatctccaatgtggagtccgcgggacgtggc cagctactattgcctgcaatacgacgatctgccctacaccttcggacctggaaccaagctgga actcaagggcggtggaggctcagggggggcggctcgggagggggtggaagcggaggga ggaggctccgaggtccagcttgtggaatcaggaggcggactcgtccagccgggtactagcc tgaagctcagctgtgtggccagcggttttaccttctcgtcctccgggatgcagtggattcggca ggctcccaagaagggactggaatggatctcgggcatctactacgactcgtacaagaagtccta cgccgattccgtgaaaggtcgcttcaccatctcccgggacaacagcaagaacactctgtacct cgagatgaactccttgcgctccgaggatacgcaaacctattactgcgccaagtcggcctacta cggctacaaggactacttcgactattgggggccagggagtgatggtgaccgtgtcctccaccac tacccccagcaccgaggccacccacccccggctcctaccatcgcctcccagccctgtccctgc gtccggaggcatgtagacccgcagctggtgggggccgtgcatacccgggggtcttgacttcgcc tgcgatatctacatttgggccccctctggctggtacttgcgggggtcctgctgctttcactctgtatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgcctccagcctacaagcaggggc agaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag cggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagg gcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaa ggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccac caaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
194181 CAR20- 10 - Completo - aa	859	malpvtalliplalllhaarpdiqmtqsppslsaslgdkvtitcqasqnikyiawyqqkpg kapdlirytstlesgtpsrfsgsgsgrdysfsisnvesgdvasyyclqyddlpytfgpgtklel kggggsggggsggggsggggsevqlvesggglvqpgtslklscvasgftfsssgmqwir qapkkglewisgiyydsykksyadsvkgrftisrdnskndylemnslrsedtatyycaksa yygykdyfdywgqgvmvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgl dfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkklliyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpee eggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreydvldkrrgrdpemggkprrkn pqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-11	860	divmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknylawyqqkpgqspklliywastr esgvpdrfigsgsgtdftlitissvqaedlavyycqqyynfppwtfgggtklelkggggsggg gsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseyttfdyafhwvkqapgkglkw mgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlknedtatyfcargayygyrdwft ywgqgtlvtvss

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-11 nt	861	gatattgtgatgacccagacccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccat gtcctgcaagagctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtac cagcagaagccccggacagtccccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctgg cgtgccccgaccgcttttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgt gcaggccgaggacctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttccccgccctggacttt cggcggtggaacgaagctcgaactcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgg gaggggggtggaagcggaggaggaggctcccaaattcaactggtccagtccggccctgagct gaagaagccgggagaatccgtgaagatctcctgcaagacctcggagtacaccttcactgact acgccttccactgggtcaagcaggcacctgggaaaggcctgaagtggatgggctggatcaa cacttactcggggaagccaacctacgccgatgatttcaagggaagattcgtgtttagcctggag gactccgccccggacagctaacctccaaatctccaaccttaagaacgaggacactgcgaccta cttctgcgcgcggggagcctattacggttatcgcgactggttcacctactggggacagggcac cctcgtgaccgtgtcctcc
CAR20-11 - Soluble	862	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg atattgtgatgacccagacccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaaggtcaccatg
scFv - nt		tcctgcaagagctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtacc agcagaagccccggacagtccccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctggc gtgccccgaccgcttttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtg caggccgaggacctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttccccgccctggacttttc ggcggtggaacgaagctcgaactcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcggg aggggggtggaagcggaggaggaggctcccaaattcaactggtccagtccggccctgagctg aagaagccgggagaatccgtgaagatctcctgcaagacctcggagtacaccttcactgacta cgccttccactgggtcaagcaggcacctgggaaaggcctgaagtggatgggctggatcaac acttactcggggaagccaacctacgccgatgatttcaagggaagattcgtgtttagcctggag gactccgccccggacagctaacctccaaatctccaaccttaagaacgaggacactgcgaccta cttctgcgcgcggggagcctattacggttatcgcgactggttcacctactggggacagggcac cctcgtgaccgtgtcctccggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-11 - scFv soluble - aa	863	malpvtalllplalllhaarpdivmtqtpssqavsagekvtmsckssqsllysenkknylaw yqqkpgqspkllfywastresgvpdrftgsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfpp wtfgggtkleikggggsggggsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkiscktseyt ftdyathwvkqapgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlkn edtatyfcargayygyrdwflywgqgtlvtvssgshhhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20- 11 Completo - nt	864	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg atattgtgatgacccagacccccgtcgagccaggcagtgtccgctggagaaaagggtcaccatg tcctgcaagagctcacagtccctgttgtactccgaaaacaagaagaattacctggcctggtacc agcagaagccccggacagtccccctaaactgctgatctactgggcctcgactagggaatctggc gtgccccgaccgcttttatcggaagcggttcagggactgacttcaccctgaccattagcagcgtg caggccgaggacctggcggtgtactactgtcaacagtactacaacttccgccctggacttttc ggcggtggaacgaagctcgaactcaagggcggtggaggctcagggggtgggcggctcgggg aggggctggaagcggaggaggaggctcccaaattcaactggtccagtccggccctgagctg aagaagccgggagaatccgtgaagatctcctgcaagacctcggagtacaccttcactgacta cgccttccactgggtcaagcaggcacctgggaaaggcctgaagtggatgggctggatcaac acttactccggggaagccaacctacgccgatgatttcaagggaagattcgtgttttagcctggag gactccgccctggacagctaacctccaaatctccaaccttaagaacgaggacactgcgacctta cttctgcgcgcgggggagcctattacggttatcgcgactggttcgccttactggggacagggcac cctcgtgaccgtgtcctccaccactacccccagcaccgaggccacccaccccggcctcctacca tcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtggggcgtg catacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcgg ggtcctgctgcttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacat cttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccg gttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcaga tgctccagcctacaagcagggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagag aggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagcc gcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcaga agcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggact gtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgc cgcctcgg
CAR20-11 - Completo - aa	865	malpvtalllplalllhaarpdivmtqtpssqavsagekvtmscksqsllysenkknylaw yqqkpgqspkllywastresgvpdrflgsgsgtdftltissvqaedlavyycqqyynfpp wtfggtklelkggggsggggsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkisckiseyt ftdyafhwvkqapgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrfvfsledsartanlqisnlkn edtatyfcargayygyrdwflywgqgtlvtvssitpaprppipaptiasqplslrpeacrpa aggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqee dgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpe mggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtyd alhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-12	866	qvvltqpksvstslestvklsckinsgnigsyfihwyqqhegrspttmiyrddkrphgvpdr fsgsidsssnsafltinnvqtedealyfchsydsginivfgggtkltvlggggsggggsgggg sggggsevqlvesggglvqpgrslklsclasgftfskygmnwirqapgkglewvasissts iyiyyadrvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarhdyssysywgqgvmvtvss

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-12 nt	867	caagtcgtgctgacgcaacccaagtccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctca gctgcaagattaactcgggcaacattgggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaag gacggtcccctaccactatgatctaccgggacgacaagcggccgcacggagtgccggaca gattctcgggttcaatcgattcctcatctaactcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagacc gaggacgaagcgatctacttctgccactcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcg gcactaagctgacagtgctgggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggt ggaagcggaggaggaggctccgaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcag ccaggaagatccctgaagctgtcctgtgtcgcctcgggcttcacttctccaaatacggcatga attggattcgccaggcacccggaaaggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactag catctacatctactatgccgatagcgtcaagggccgcttcactatctcccgcgaagaacgctaag aacaccctttacttgcaaatgacctccctgaggtccgaagatacgccgtgtactattgcgccc ggcacgactactcatcctactcctactgggacagggagtcatggtgaccgtgtcctcc	
CAR20-12 - scFv soluble - nt	868	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcgtgctgacgcaacccaagtccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcag ctgcaagattaactcgggcaacattgggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaagga cggtcccctaccactatgatctaccgggacgacaagcggccgcacggagtgccggacagat tctcgggttcaatcgattcctcatctaactcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagaccgag gacgaagcgatctacttctgccactcctacgactcgggtattaacattgtgttcggcggcggga ctaagctgacagtgctgggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtgga agcggaggaggaggctccgaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagcca ggaagatccctgaagctgtcctgtgtcgcctcgggcttcacttctccaaatacggcatgaattg gattcgccaggcacccggaaaggggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatc tacatctactatgccgataccgtcaagggccgcttcactatctcccgcgaagaacgctaagaaca ccctttacttgcaaatgacctccctgaggtccgaagatacgccgtgtactattgcgcccggca cgactactcatcctactcctactgggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccggatcgca ccaccatcaccatcatcatcac	
CAR20-12 - scFv soluble - aa	869	maipvtalllplalllhaarpqvvltqpksvstslestvklsckinsgnigsyfihwyqqhegr sptmniyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyfchsydsginivfgggt kltvlggggsggggsggggsggggsevqlvesgggivqpgrslklsclasgftfskygmnn wirqapgkglewvasisstsiyiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarh dyssysywqqgvmvtvssgshhhhhhhhh	

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20- 12 Completo - nt	870	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc aagtcgtgctgacgcaacccaagtccgtgagcaccagcctggagagcaccgtgaagctcag ctgcaagattaactcgggcaacattgggtcctacttcatccattggtaccagcagcacgaagga cggtccctaccactatgatctaccgggacgacaagcggccgcacggagtgccggacagat tctcgggttcaatcgattcctcatctaactcggcgtttctcaccatcaacaacgtgcagaccgag gacgaagcgatcttacttctgccactcctacgactcgggtattaacattgttccggcggcggga ctaagctgacagtgctgggcggtggaggctcaggggggggcggctcgggaggggggtgga agcggaggaggaggctccgaggtgcagctcgtcgaatccggtggaggactggtgcagcca ggaagatccctgaagctgtcctgtgtcgcctcgggcttcacttttctccaaatacggcatgaattg gattcgccaggcaccccggaaagggctggaatgggtggccagcatcagctcgactagcatc tacatctactatgccgatacogtcaagggccgcttcactatctcccgcgagaacgctaagaaca ccctttacttgcaaatgaacteeetgaggtccgaagataccgccctgtactattgcgcccggca cgactactcatcctactcctactggggacagggagtcatggtgaccgtgtcctccaccactacc ccagcaccgaggccaccccaccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtcc ggaggcatgtagaccccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttgggccccttcgcgtgtactgcggggtcctgctgtttcactcgtgatcactct
		ttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtg cagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcaga accagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgatgaaagg gaacgcagaaggaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaa ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20- 12 - Completo - aa	871	malpvtalllplalllhaarpqvvltqpksvstslestvklsckinsgnigsyfihwyqqhegr sptimiyrddkrphgvpdrfsgsidsssnsafltinnvqtedeaiyfchsydsginivfgggt kltvlggggsggggsggggsggggsevqlvesgggivqpgrslklsclasgftfskygmn wirqapgkglewvasisstsiyiyyadtvkgrftisrenakntlylqmtslrsedtalyycarh dyssysywgqggvmvtvssittpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg ceirvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-13	872	dvqmtqspsllsasvgdavtinckasqninrylnwyqqklgegprlliysanslqtgipsrfs gsgsgadftltitspqpedvatyfclqhnswpltfgsgtkleikggggsggggsggggsggg gsqvtlkesgpgilqpsqtlsltctftfrfslstygmsvgwirqpsgkglewladiwwddddkh ynpslknrltiskdtsknqaflkitnvdtadtatyycarsttdgivtyvmdvwgqgasvtvs s

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-13 nt	873	gacgtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactatt aactgcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggaga agggccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatccctgtcgaggttcag cggatcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagccctcagccctgaagatgtggc cacctacttctgcctccaacacaactcctggccctgaccttggttcgggcaccaagctggag atcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggag gaggctcccaagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccct ctcgcttacttgcaccttcaccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcg gcagcccagcggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcatt acaaccctagcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacaccttccaagaaccaggcgttc ctgaagatcaccaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgccccgtccttcaacc accgatgggatcgtgacctacgtgatggacgtctggggccagggagcttccgtgaccgtgtc ctcc
CAR20-13 - scFv soluble - nt	874	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acgtgcagatgactcagtccccgtcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactatta actgcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaa gggccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatccctgtcgaggttcagc ggatcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagccctcagccctgaagatgtggcc acctacttctgcctccaacacaactcctggccctgaccttggttcgggcaccaagctggaga tcaagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggagg aggctcccaagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctct cgcttacttgcaccttcaccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcgg cagcccagcggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcatta caaccctagcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacaccttccaagaaccaggcgttcc tgaagatcaccaacgtggataccgccgacactgcaacatactattgtgccccgtccttcaacca ccgatgggatcgtgacctacgtgatggacgtctggggccagggagcttccgtgaccgtgtcct ccggatcgcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-13 - scFv soluble - aa	875	maipvtallplalllhaarpdvqmtqspsllsasvgdavtinckasqninryinwyqqklg egprllyysanslqtgipsrfsgsgsgadftltitspqpedvatyfclqhnswpltfgsgtkleik ggggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgilqpsqtlsltctfsgfslstygmsvgwirqp
		sgkglewladiwwddddkhynpslknrltiskdtsnqaflkitnvdtadtatyycarsstfd givtvvmdvwgqgasvtvssgshhhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20-13 Completo nt	876	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccrg acgtgcagatgactcagtcccctcgctcctgtccgcctccgtcggcgacgccgtgactatta actgcaaggcgtcccagaacatcaatcggtacctgaactggtaccagcaaaaactgggagaa gggccgagacttctcatctactccgccaactccctgcaaactggcatccctcgaggttcagc ggatcaggctctggtgccgacttcactttgaccatcacgagcctcagccctgaagatgtggcc acctacttctgcctccaacacaactcctggccctgaccttggttcgggcaccaagctggaga tcaagggcggtggaggctcaggtggtggcggctcgggaggtggtggaagcggaggagg aggctcccaagtcacgctgaaggaatcgggccctggaattctgcagccaagccagaccctct cgcttactgcaccttcaccccgcttctcactgtccacttacggaatgtccgtgggatggattcgg cagccccagcggaaagggtttggagtggctggccgacatttggtgggatgacgacaagcatta caacctagcctgaagaatcggctcaccatcagcaaagacacctccaagaaccaggcgttcc tgaagatcaccaacgtggataccgccgacactgcaacatactatgtgccccgtcctcaacca ccgatgggatcgtgacctacgtgatggacgtctgggccccagggagcttccgtgaccgtgtcct ccaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcctccccagcctctg tccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtggggccgtgcataccccgggtcttga cttcgcctgcgatatctacatttgggccccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcact ctgtatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcat gaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggag gaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagccgcagatgctccagcctacaagc aggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgct ggacaagcggagaggacgtggaccccgaaatgggcggtgaagccgcgcagaaagaatccc caagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattg gtatgaaaggggaacgcagaaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagc accgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-13 Completo aa	877	malpvtalllplalllhaarpdvqmtqspsllsasvgdavtinckasqninrylnwyqqklg egprllyysanslqtgipsrfsgsgsgadftltitspqpedvatyfclqlnswpltfgsgtkleik gggsggggsggggsggggsgqvtlkesgpgilqpsqtlsltctftlsfstygmsvgwirqp sgkglewladiwwdddkhynpslknritiskdtsknqaflkitnvdtadtatyycarssttd givtyvmdvwgqgasvtvssttpaprpptpaptiasqplsirpeacrpaaggavhtrgldf acdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeee ggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpq eglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-14	878	diqmtqspsflsasvgdrvtinckasqninrylnwyqqklgeapklliynanslqtgipsrfs gsgsgtdfltitsslqpedvatyfclqhnsrpltfgsgtileikgggggsgggggsggggs qvtlkesgpgllqpsqtlsltctfagfsinthgmgvgwirqpsgkglewlaniwwdddky ynpslknrltmskdtsnqaflkitnvdtadtatyycariegspvvttvfdywgqgvmvtv ss

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-14 nt	879	gacatccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccatta actgcaaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctggggggaa gccccgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttccccggttctccg ggagcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctcccttcaaccccgctgacgtggcca cctacttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatc aagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggcggtggaagcggaggaggga ggctccccaagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtc cctcacttgtaccttcgccggctttttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattagg cagccctcgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtatta caaccccgagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcct gaaaatcactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgccccggatcgaaggtt ccccccgtcgtgacaactgtgttcgactactgggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctccg	
CAR20-14 - scFv soluble - nt	880	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acatccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaa ctgcaaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaa gccccgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattccttccccggttctccg ggagcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctcccttcaaccccgctgacgtggcca cctacttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatc aagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggcggtggaagcggaggaggga ggctccccaagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtc cctcacttgtaccttcgccggctttttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattagg cagccctcgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtatta caaccccgagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcct gaaaatcactaacgtggataccgctgacaccgcaacgtactactgcgccccggatcgaaggtt ccccccgtcgtgacaactgtgttcgactactgggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctccg gatcgccaccaccatcaccatcatcatcac	
CAR20-14 - scFv soluble - aa	881	malpvtalllplalllhaarpdiqmtqspsflsasvgdrvtinckasqninrylnwyqqkige apklliynanslqtgipsrfsgsgsgtdftltisslqpadvatyfclqhnsrpltfgsgtileikgg ggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgllqpsqtlsltctfsgfslnthgmgvgwirqps gkglewlaniwwdddkyynpslknrltmskdtsnnqaflkitnvdtadtatyycariegsp vvttvfdywggtvmvtvssgshhhhhhhhh	

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20-14 Completo nt	882	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctctlctgctccacgccgctcggcccg acatccaaatgacccagtcacctagctttctgtcggcctcggtcggcgacagagtgaccattaa ctgcaaagcgtcccagaacatcaaccgctacctgaattggtaccagcagaagctgggggaa gccccgaagctgctgatctacaacgcgaacagcctccagactggtattcctttcccggttctccg ggagcggctcgggtaccgatttcaccctcaccatctcctccttcaacccgctgacgtggcca cctacttctgcttgcaacataattctcggcctctgaccttcggaagcggcactatcctcgagatc aagggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggga ggctcccaagtcactcttaaggaatccgggccaggactgttgcagccgagccagaccctgtc cctcacttgtaccttcgccggctttcactgaacacccacggaatgggcgtgggatggattagg cagccctcgggaaagggactggagtggctggccaacatttggtgggacgacgacaagtatta caaccccgagcctcaagaaccgcctgactatgtccaaggatacctccaacaaccaggccttcct gaaaatcactaacgtggtaccgctgacaccgcaacgtactactgcgcccggatcgaaggtt ccccccgtcgtgacaactgtgttcgactactggggacagggcgtgatggtgaccgtgtcctcca ccactaccccagcaccgaggccacccacccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtcc ctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtggggccgtgcataccccgggttcttgactt cgcctgcgatatctacattgggccccctctggctggttacttgcggggtcctgctgctttcactcgt gatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatga ggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgtccggttcccagaggaggaggga aggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcag ggccagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctgg acaagcggagaggaccgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccca agagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggta tgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcacc gccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-14 Completo aa	883	maipvtalllpialllhaarpdiqmtqspsflsasvgdrvtinckasqninryinwyqqklge apklliynanslqtgipsrfsgsgsgtdftltisslqpadvatyfclqhnsrpltfgsgtileikgg ggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgllqpsqtlsltctfsgfslstbgmgvgwirqps gkglewlaniwwdddkyynpslknrltmskdtsnnqafikitnvdtadtatyycariegsp vvttvfdywgqgvmvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeg ggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqe glynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-15	884	kivltqsptitaaspgekvtitclassrvsniywyqqksgaspkllivstsslasgvpyrfsgsg sgtsysltintmeaedaatyychqwssnpwtfgggtklelkggggsggggsggggsggg gsqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirqpsgkslewlaaiawdgdk yynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdtadtatyyctrrdydvgyyyfdfwgqgvmvtvs s

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-15 nt	885	aagattgtgctgacccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccat cacttgtctggcgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagc cccaagctgctgatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggttttctggctc gggaagcggaaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccacti actactgccaccagtggtcgagcaaccctggactttcggtggaggcaccaaactcgagctca aggcggtggaggctcagggcgggggcggctcgggaggggctggaaagcggaggaggag gctcccaagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcc cttacatgctcctctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagaca gccgagcggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactac aacccgagcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacaccctccaacaccccagtgttcctt cggatcaccttccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactgccgggactacgac gtgggctactactacttcgatttctgggggcagggtgtcatggtgaccgtgtcctccggatcgcac caccatcaccatcatcatcac
CAR20-15 - scFv soluble - nt	886	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccca agattgtgctgacccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccatc acttgtctggcgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagcc ccaagctgctgatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccttaccggttttctggctcg ggaagcggaaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccactta ctactgccaccagtggtcgagcaaccctggactttcggtggaggcaccaaactcgagctcaa gggcggtggaggctcagggcgggggcggctcgggaggggctggaaagcggaggaggagg ctcccaagtcaccctgaaagaatcgggtcccggaatgctgcagccatccaagacgctgtccct tacatgctcctctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagc cgagcggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaa cccgagcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacaccctccaacaccccagtgttccttcg gatcaccttccgtggacattgctgacaccgccacctattactgcactgccgggactacgacgt gggctactactacttcgatttctggggcagggtgtcatggtgaccgtgtcctccggatcgcac caccatcaccatcatcatcac
CAR20-15 - scFv soluble - aa	887	malpvtalllplalllhaarpkivltqsptitaaspgekvtitclassrvsniywyqqksgaspk lliystsslasgvpyrfsgsgsgtsyslticmeaedaatyychqwssnpwtfgggtklelkg ggggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirq psgkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtvskdtsnqvflritsvdiadtatyyctrrdydv gvvyfdfwgqgvmvtvssgshhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20-15 Completo nt	888	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgctcggccca agattgtgctgacccagagccccactattaccgccgcctccccgggggaaaaggtcaccatc acttgtctggcgtcctcacgcgtgtcgaatatctactggtatcagcagaagtccggcgccagcc ccaagctgctgatctactcgacctcctccctcgcgtcgggagtgccctaccggttttctggctcg ggaagcggaaccagctactccttgaccatcaacaccatggaagccgaggacgctgccactta ctactgccaccagtggtcgagcaaccctggacttcggtggaggcaccaaactcgagctcaa gggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggagg ctccccaagtcaccctgaaagaatcgggtccccggaatgctgcagccatccaagacgctgtcct tacatgctccttctccgggttcagcctctcaacttccgggatggtggtgtcatggatcagacagc cgagcggaaagtccctggagtggctggcggccatcgcatgggatggcgataagtactacaa cccgagcctgaagtcaagggtcactgtgtccaaggacacctccaacaccaagtgttccttcg gatcacctccgtggacattgctgacaccgccactattactgcactcgccgggactacgacgt gggctactactacttcgatttctggggacagggtgtcatggtgaccgtgtcctccaccactacc ccagcaccgaggccacccacccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtcc ggaggcatgtagacccgcagctggtgggggccgtgcatacccgggggtcttgacttcgcctgcg
		atatctacatttgggccccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactct ttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttcaagcaacccttcatgaggcctgtg cagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcaga accagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggg gaacgcagaaggaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaa ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-15 Completo aa	889	malpvtalllplalllhaarpkivltqsptitaaspgekvtitclassrvsniywyqqksgaspk lliystsslasgvpyrfsgsgsgtsysltintmeaedaatyychqwssnpwtfgggtkleikg gggsggggsggggsggggsqvtlkesgpgmlqpsktlsltcsfsgfslstsgmvvswirq psgkslewlaaiawdgdkyynpslksrvtvskdtsntqvflritsvdiadtatyyctrrdydv gyyyfdfwgqgvmvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfac diyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeegg celrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeg lynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
Dominio scFv de CAR20-16	890	niqltqspsrlsasvgdrvtlsckgsqninmylawyqqklgeapklliyntmnlqtgipsrfsg sgsgtdytftisglqpedvatyfccqymngntfgagtklelkggggsggggsggggsgggg sqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrqapgkglkwmgwintysg kptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarstyygykdwfaywgqgtlvt vss

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
Dominio scFv CAR20-16 nt	891	aacatccaactgactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacac tgagctgcaagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggga gaggccccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattct caggatcagggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtgg ccacctacttctgctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaac tcaaaggcggtggaggctcagggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggg aggctcccaaattcagttggtgcagtccggccccggagctgaagaagcctggagaatccgtga agatctcgtgcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccag gcaccgggaaagggactgaagtggatgggctggatcaacacctacagcggaaagccgact tacgccgatgactttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatc ttcaaatctccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctatta cggctacaaggactggttcgcgtattgggccagggcactctcgtgaccgtgtcctcc
CAR20-16 - scFv soluble - nt	892	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccca acatccaactgactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacact gagctgcaagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggag aggccccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctc aggatcagggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggc cacctacttctgctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaact caaaggcggtggaggctcagggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaggg aggctcccaaattcagttggtgcagtccggccccggagctgaagaagcctggagaatccgtga agatctcgtgcaaagcttccgggaacaccgtgaccggatacgcaatgcactgggtccgccag gcaccgggaaagggactgaagtggatgggctggatcaacacctacagcggaaagccgact tacgccgatgactttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatc ttcaaatctccaacctgaagaatgaggacaccgccacttacttctgcgcccggagcacctatta cggctacaaggactggttcgcgtattgggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccggatc gcaccaccatcaccatcatcatcac
CAR20-16 - scFv soluble - aa	893	malpvtalllplalllhaarpmiqltqspsrlsasvgdrvtlsckgsqninnylawyqqklgea pklliyntnnlqtgipsrfsgsgsgtdytftisglqpedvatyfccqynngntfgagtklelkg ggggsggggsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgyamhwvrq
		apgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarstiy ygvkdwfaywgqgtlvtvssgshhhhhhhhh

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
CAR20-16_ Completo nt	894	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgctcggccca acatccaactgactcagagccccagccggctgtccgcctccgtgggggacagggtcacact gagctgcaagggttctcagaacatcaacaactacctcgcgtggtaccagcagaagctgggag aggccccaagctgctcatctacaacaccaacaatctgcaaactggcattccatcgagattctc aggatcagggtccggtaccgactacaccttcacgatttcgggacttcagcctgaggatgtggc cacctacttctgctgtcagtacaacaacggcaacaccttcggtgctggcaccaagctggaact caaaggcggtggaggctcagggggggggcggctcgggaggggggtggaagcggaggaagg aggctcccaaattcagttggtgcagtccggccccggagctgaagaagcctggagaatccgtga agatctcgtgcaaagcttccgggaacaccgtgaccgagtacgcaatgcactgggtccgccag gcaccgggaaagggactgaagtggatgggctggatcaacacctacagcggaaagccgact tacgccgatgacttaagggacgctgtgtgttctccctggaagcgtccgcctcgactgcccatc ttcaaatctccaacctgaagaatgaggacacgccacttacttctgcgcccggagcacctatta cggctacaaggactggttcgcgtattggggccagggcactctcgtgaccgtgtcctccaccac tacccccagcaccgaggccacccacccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgc gtccggaggcatgtagacccgcagctggtggggccgtgcataccccgggggtcttgacttcgcc tgcgatatctacatttgggccccttggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatc actctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggc ggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggc agaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag cggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaa ggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccac caaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR20-16_ Completo aa	895	malpvtalllplalllhaarpmiqltqspsrlsasvgdrvtlsckgsqninnylawyqqklgea pkllivntnnlqtgipsrfsgsgsgtdytftisslqpedvatyfcqyynngntfgagtklelkg gggsggggsggggsggggsqiqlvqsgpelkkpgesvkisckasgntvtgvamhwvrq apgkglkwmgwintysgkptyaddfkgrcvfsleasastahlqisnlknedtatyfcarsty ygyldwfaywgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldf acdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeee ggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpq eglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr

Tabla 11B. Construcciones de CAR CD20 humanizadas

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
scFv CD20-3m	691	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRDYYMAWVRQAPGKGL EWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPVSMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYL QKPGQSPQLLIFWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia
scFv CD20-3J	692	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAPGQRL EWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTITRDNSASTLYMELSSLRSEDTAV YYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQ KPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATY YCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
scFv CD20-3H5k3	693	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFRDYYMAWVRQMPGKGL
		EWMGSISYEGNPYYGDSVKGQVTISRDNSISTLYLQWSSLKASDTA MYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLYSENKKNYLAWY QQKPGQAPRLLIFWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLAV YYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
scFv CD20-3H5kl	694	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFRDYYMAWVRQMPGKGL EWMGSISYEGNPYYGDSVKGQVTISRDNSISTLYLQWSSLKASDTA MYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSENKKNYLAWY QQKPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVA TYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
scFv CD20-3H1k3	695	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAPGQG LEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTMTRDNSTSTLYMELSSLRSEDT AVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLYSENKKNYLAWY QQKPGQAPRLLIFWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLAV YYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
scFv CD20-3H1k1	696	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAPGQG LEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTMTRDNSTSTLYMELSSLRSEDT AVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSENKKNYLAWY QQKPGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVA TYYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada enumerada en las Tablas 11A y 11B. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno comprende además una CDR1 LC, una CDR2 LC y una CDR3

LC. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una LC CDR1, una LC CDR2 y una LC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera enumerada en las Tablas 11A y 11B.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3 enumeradas en las Tablas 11A y 11B, y una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 enumeradas en las Tablas 11A y 11B.

En algunos casos, las CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia o una combinación de los mismos.

Las secuencias de las secuencias de CDR humanas de los dominios scFv se muestran en la **tabla 12A o 12B** para los dominios variables de cadena pesada y en la **tabla 13** para los dominios variables de cadena ligera. "ID" representa la SEQ ID NO respectiva para cada CDR.

Tabla 12A. CDR de dominio variable de cadena pesada de CAR CD20. Las CDR se identifican según la definición "combinada".

Candidato	**HCDR1**	**SE Q ID NO:**	**HCDR2**	**SE Q ID NO:**	**HCDR3**	**SE Q ID NO:**
CAR20-1	EYTFTDYAFH	697	WINTYSGKPTYADDFKG	791	DWFTY	903
CAR20-2	GFTFSKYGMN	698	SISSTSIYIYYADTVKG	792	HDYSSYSY	904
CAR20-3	GFTFRDYYMA	699	SISYEGNPYYGDSVKG	793	HDHNNVDWFAY	905
CAR20-4	RFSLSTYGMSVG	778	DIWWDDDKHYNPSLKN	794	SSTTDGIVTYYVMDV	906
CAR20-5	GFTFSSSGMQ	779	GIYYDSYKKSYADSVKG	795	SAYYGYKDYFDY	907
CAR20-6	GFSLNTHGMGVG	780	NIWWDDDKYYNPSLKN	796	IEGSPWTTVFDY	908
CAR20-7	GFSLSTSGMWS	781	AIAWDGDKYYNPSLKS	797	RDYDVGYYYFDF	909
CAR20-8	GNTVTGYAMH	782	WINTYSGKPTYADDFKG	798	DWFAY	910
CAR20-9	GFTFRDYYMA	783	SISYEGNPYYGDSVKG	799	HDHNNVDWFAY	911

Candidato	HCDR1	SE Q ID NO:	HCDR2	SE Q ID NO:	HCDR3	SE Q ID NO:
CAR20-10	GFTFSSSGMQ	784	GIYYDSYKKSYADSVKG	896	SAYYGYKDYFDY	912
CAR20-11	EYTFTDYAFH	785	WINTYSGKPTYADDFKG	897	GAYYGYRDWFTY	913
CAR20-12	GFTFSKYGMN	786	SISSTSIYIYYADTVKG	898	HDYSSYSY	914
CAR20-13	RFSLSTYGMSVG	787	DIWWDDDKHYNPSLKN	899	SSTTDGIVTYVMDV	915
CAR20-14	GFSLNTHGMGVG	788	NIWWDDDKYYNPSLKN	900	IEGSPWTTVFDY	916
CAR20-15	GFSLSTSGMWS	789	AIAWDGDKYYNPSLKS	901	RDYDVGYYYFDF	917
CAR20-16	GNTVTGYAMH	790	WINTYSGKPTYADDFKG	902	STYYGYKDWFAY	918

Tabla 12B. CDR de dominio variable de cadena pesada de CAR CD20. Las CDR se identifican según Kabat.

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR20-1	DYAFH		WINTYSGKPTYADDFKG		GAYYGYRDWFTY	
CAR20-2	KYGMN		SISSTSIYIYYADTVKG		HDYSSYSY	
CAR20-3	DYYMA		SISYEGNPYYGDSVKG		HDHNNVDWFAY	
CAR20-4	TYGMSVG		DIWWDDDKHYNPSLKN		SSTTDGIVTYVMDV	
CAR20-5	SSGMQ		GIYYDSYKKSYADSVKG		SAYYGYKDYFDY	
CAR20-6	THGMGVG		NIWWDDDKYYNPSLKN		IEGSPWTTVFDY	
CAR20-7	TSGMWS		AIAWDGDKYYNPSLKS		RDYDVGYYYFDF	
CAR20-8	GYAMH		WINTYSGKPTYADDFKG		STYYGYKDWFAY	
CAR20-9	DYYMA		SISYEGNPYYGDSVKG		HDHNNVDWFAY	
CAR20-10	SSGMQ		GIYYDSYKKSYADSVKG		SAYYGYKDYFDY	
CAR20-11	DYAFH		WINTYSGKPTYADDFKG		GAYYGYRDWFTY	
CAR20-12	KYGMN		SISSTSIYIYYADTVKG		HDYSSYSY	
CAR20-13	TYGMSVG		DIWWDDDKHYNPSLKN		SSTTDGIVTYVMDV	

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
CAR20-14	THGMGVG		NIWWDDDKYYNPSLKN		IEGSPWTTVFDY	
CAR20-15	TSGMWS		AIAWDGDKYYNPSLKS		RDYDVGYYYFDF	
CAR20-16	GYAMH		WINTYSGKPTYADDFKG		STYYGYKDWFAY	

Tabla 13. CDR de dominio variable de cadena ligera de CAR CD20. Las secuencias de CDR LC en esta tabla tienen la misma secuencia en las definiciones de Kabat o combinadas.

Candidato	CDR1L	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR20-1	KSSQSLLYSENKKNYLA	919	WASTRES	935	QQYYNFPPWT	951
CAR20-2	KINSGNIGSYFIH	920	RDDKRPH	936	HSYDSGINIV	952
CAR20-3	KSSQSLLYSENKKNYLA	921	WASTRES	937	QQYYNFPT	953
CAR20-4	KASQNINRYLN	922	SANSLQT	938	LQHNSWPLT	954
CAR20-5	QASQNINKYIA	923	YTSTLES	939	LQYDDLPYT	955
CAR20-6	KASQNINRYLN	924	NANSLQT	940	LQHNSRPLT	956
CAR20-7	LASSRVSNIY	925	STSSLAS	941	HQWSSNPWT	957
CAR20-8	KGSQNINNYLA	926	NTNNLQT	942	CQYNNGNT	958
CAR20-9	KSSQSLLYSENKKNYLA	927	WASTRES	943	QQYYNFPT	959
CAR20-10	QASQNINKYIA	928	YTSTLES	944	LQYDDLPYT	960
CAR20-11	KSSQSLLYSENKKNYLA	929	WASTRES	945	QQYYNFPPWT	961
CAR20-12	KINSGNIGSYFIH	930	RDDKRPH	946	HSYDSGINIV	962
CAR20-13	KASQNINRYLN	931	SANSLQT	947	LQHNSWPLT	963
CAR20-14	KASQNINRYLN	932	NANSLQT	948	LQHNSRPLT	964
CAR20-15	LASSRVSNIY	933	STSSLAS	949	HQWSSNPWT	965
CAR20-16	KGSQNINNYLA	934	NTNNLQT	950	CQYNNGNT	966

Tabla 14A. Regiones variables de cadena pesada de moléculas de anticuerpo de CD20

Candidato	SEQ ID NO:	Región variable de cadena pesada
CAR-1	967	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSEYTFTDYAFHWVKQAPGKGLK WMGWINTYSGKPTYADDFKGRFVFSLEDSARTANLQISNLKNEDTA TYFCARGAYYGYRDWFTYWGQGTLVTV
CAR20-2	968	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFSKYGMNWIRQAPGKGLE WVASISSTSIYIYYADTVKGRFTISRENAKNTLYLQMTSLRSEDTALY YCARHDYSSYSYWGQGVMVTV

Candidato	SEQ ID NO:	Región variable de cadena pesada
CAR20-3	969	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFRDYYMAWVRQAPKKGL EWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRNNAKSTLYLQMNSLRSEDTAT YYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTV
CAR20-4	970	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCTFTRFSLSTYGMSVGWIRQPSGKGLE WLADIWWDDDKHYNPSLKNRLTISKDTSKNQAFLKITNVDTADTAT YYCARSSTTDGIVTYVMDVWGQGASVTV
CAR20-5	971	EVQLVESGGGLVQPGTSLKLSCVASGFTFSSSGMQWIRQAPKKGLE WISGIYYDSYKKSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAT YYCAKSAYYGYKDYFDYWGQGVMVTV
CAR20-6	972	QVTLKESGPGLLQPSQTLSLTCTFAGFSLNTHGMGVGWIRQPSGKGL EWLANIWWDDDKYYNPSLKNRLTMSKDTSNNQAFLKITNVDTADT ATYYCARIEGSPVVTTVFDYWGQGVMVTV
CAR20-7	973	QVTLKESGPGMLQPSKTLSLTCSFSGFSLSTSGMVVSWIRQPSGKSLE
		WLAAIAWDGDKYYNPSLKSRVTVSKDTSNTQVFLRITSVDIADTATY YCTRRDYDVGYYYFDFWGQGVMVTV
CAR20-8	974	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGNTVTGYAMHWVRQAPGKGLK WMGWINTYSGKPTYADDFKGRCVFSLEASASTAHLQISNLKNEDTA TYFCARSTYYGYKDWFAYWGQGTLVTV

Candidato	SEQ ID NO:	Región variable de cadena pesada
CAR20-9	975	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFRDYYMAWVRQAPKKGL EWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRNNAKSTLYLQMNSLRSEDTAT YYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTV
CAR20-10	976	EVQLVESGGGLVQPGTSLKLSCVASGFTFSSSGMQWIRQAPKKGLE WISGIYYDSYKKSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAT YYCAKSAYYGYKDYFDYWGQGVMVTV
CAR20-11	977	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSEYTFTDYAFHWVKQAPGKGLK WMGWINTYSGKPTYADDFKGRFVFSLEDSARTANLQISNLKNEDTA TYFCARGAYYGYRDWFTYWGQGTLVTV
CAR20-12	978	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFSKYGMNWIRQAPGKGLE WVASISSTSIYIYYADTVKGRFTISRENAKNTLYLQMTSLRSEDTALY YCARHDYSSYSYWGQGVMVTV
CAR20-13	979	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCTFTRFSLSTYGMSVGWIRQPSGKGLE WLADIWWDDDKHYNPSLKNRLTISKDTSKNQAFLKITNVDTADTAT YYCARSSTTDGIVTYVMDVWGQGASVTV
CAR20-14	980	QVTLKESGPGLLQPSQTLSLTCTFAGFSLNTHGMGVGWIRQPSGKGL EWLANIWWDDDKYYNPSLKNRLTMSKDTSNNQAFLKITNVDTADT ATYYCARIEGSPVVTTVFDYWGQGVMVTV
CAR20-15	981	QVTLKESGPGMLQPSKTLSLTCSFSGFSLSTSGMVVSWIRQPSGKSLE WLAAIAWDGDKYYNPSLKSRVTVSKDTSNTQVFLRITSVDIADTATY YCTRRDYDVGYYYFDFWGQGVMVTV

Candidato	SEQ ID NO:	Región variable de cadena pesada
CAR20-16	982	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGNTVTGYAMHWVRQAPGKGLK WMGWINTYSGKPTYADDFKGRCVFSLEASASTAHLQISNLKNEDTA TYFCARSTYYGYKDWFAYWGQGTLVTV

Tabla 14B. Regiones variables de cadena pesada de moléculas de anticuerpo de CD20 humanizadas

Candidato	SEQ ID NO:	Región variable de cadena pesada
CD20-3_VH1_1-46	983	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAPGQG
		LEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTMTRDNSTSTLYMELSSLRSED TAVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS
CD20-3 VHS 5-51	984	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFRDYYMAWVRQMPGKG LEWMGSISYEGNPYYGDSVKGQVTISRDNSISTLYLQWSSLKASDT AMYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS
CD20-3 VH M	985	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRDYYMAWVRQAPGKG LEWVASISYEGNPYYGDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMSSLRAEDT AVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS
CD20-3 VH J	986	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFRDYYMAWVRQAPGQR LEWMGSISYEGNPYYGDSVKGRVTITRDNSASTLYMELSSLRSEDT AVYYCARHDHNNVDWFAYWGQGTLVTVSS

Tabla 15A. Regiones variables de cadena ligera de moléculas de anticuerpo de CD20

Candidato	SEQ ID N.	O: Región variable de cadena ligera
CAR20-1	987	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQKPG QSPKLLIYWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQ YYNFPPWTFGGGTKLELK
CAR20-2	988	QVVLTQPKSVSTSLESTVKLSCKINSGNIGSYFIHWYQQHEGRSPTTMI YRDDKRPHGVPDRFSGSIDSSSNSAFLTINNVQTEDEAIYFCHSYDSGIN IVFGGGTKLTVL
CAR20-3	989	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQKPG QSPKLLIFWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQ YYNFPTFGSGTKLEIK
CAR20-4	990	DVQMTQSPSLLSASVGDAVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEGPRLLI YSANSLQTGIPSRFSGSGSGADFTLTITSPQPEDVATYFCLQHNSWPLTF GSGTKLEIK
CAR20-5	991	DIQMTQSPPSLSASLGDKVTITCQASQNINKYIAWYQQKPGKAPRLLIR YTSTLESGTPSRFSGSGSGRDYSFSISNVESGDVASYYCLQYDDLPYTF GPGTKLELK
CAR20-6	992	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEAPKLLI YNANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPADVATYFCLQHNSRPLTF GSGTILEIK
CAR20-7	993	KIVLTQSPTITAASPGEKVTITCLASSRVSNIYWYQQKSGASPKLLIYSTS SLASGVPYRFSGSGSGTSYSLTINTMEAEDAATYYCHQWSSNPWTFGG GTKLELK

Candidato	SEQ ID N.	O: Región variable de cadena ligera
CAR20-8	994	NIQLTQSPSRLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWYQQKLGEAPKLLI YNTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDYTFTISGLQPEDVATYFCCQYNNGNTF GAGTKLELK
CAR20-9	995	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQKPG QSPKLLIFWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQ YYNFPTFGSGTKLEIK
CAR20-10	996	DIQMTQSPPSLSASLGDKVTITCQASQNINKYIAWYQQKPGKAPRLLIR YTSTLESGTPSRFSGSGSGRDYSFSISNVESGDVASYYCLQYDDLPYTF GPGTKLELK
CAR20-11	997	DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQKPG QSPKLLIYWASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQ YYNFPPWTFGGGTKLELK
CAR20-12	998	QVVLTQPKSVSTSLESTVKLSCKINSGNIGSYFIHWYQQHEGRSPTTMI YRDDKRPHGVPDRFSGSIDSSSNSAFLTINNVQTEDEAIYFCHSYDSGIN IVFGGGTKLTVL
CAR20-13	999	DVQMTQSPSLLSASVGDAVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEGPRLLI YSANSLQTGIPSRFSGSGSGADFTLTITSPQPEDVATYFCLQHNSWPLTF GSGTKLEIK
CAR20-14	1000	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEAPKLLI YNANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPADVATYFCLQHNSRPLTF GSGTILEIK

Candidato	SEQ ID N.	O: Región variable de cadena ligera
CAR20-15	1001	KIVLTQSPTITAASPGEKVTITCLASSRVSNIYWYQQKSGASPKLLIYSTS SLASGVPYRFSGSGSGTSYSLTINTMEAEDAATYYCHQWSSNPWTFGG GTKLELK
CAR20-16	1002	NIQLTQSPSRLSASVGDRVTLSCKGSQNINNYLAWYQQKLGEAPKLLI YNTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDYTFTISGLQPEDVATYFCCQYNNGNTF GAGTKLELK

Tabla 15B. Regiones variables de cadena ligera de moléculas de anticuerpo de CD20 humanizado

Candidato	**SEQ ID NO:**	**Región variable de cadena ligera**
CD20-3_VK1_A20	1003	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQK PGKVPKLLIFWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATY YCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3_VK3_L25	1004	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYQQK PGQAPRLLIFWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLAVY YCQQYYNFPTFGQGTKLEIK
CD20-3 VL M y CD20-3_VL J	1005	DIVMTQTPLSLSVTPGQPVSMSCKSSQSLLYSENKKNYLAWYLQK PGQSPQLLIFWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCQQYYNFPTFGQGTKLEIK

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada enumerada en la Tabla 14A o 14B. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno comprende además una CDR1 LC, una CDR2 LC y una CDR3 LC. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una LC CDR1, una LC CDR2 y una LC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera enumerada en la Tabla 15A o 15B.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3 enumeradas en la Tabla 15A o 15B, y una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 enumeradas en la Tabla 14A o 14B.

En algunos casos, las CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia o una combinación de los mismos.

Construcciones CAR123

Se aislaron fragmentos variables monocatenarios anti-CD123. Los scFv anti-CD123 se clonaron en vectores de expresión de CAR lentivíricos con la cadena CD3zeta y la molécula coestimulante 4-1BB. Los plásmidos que contienen CAR se amplificaron mediante transformación bacteriana en células STBL3, seguida por Maxiprepr utilizando el kit Plasmid Maki de Qiagen sin endotoxinas. Se produjo sobrenadante lentivírico en células 293T utilizando técnicas convencionales.

Las secuencias de los CAR se proporcionan a continuación en la Tabla 16. En el presente documento se describen componentes adicionales de CAR (p. ej., dominios líder, bisagra, transmembrana y de señalización).

Se varió el orden en el que aparecen los dominios VL y VH en el scFv (es decir, orientación VL-VH o VH-VL) y se identificaron tres o cuatro copias de la subunidad "G4S" (SEQ ID NO: 18), en la que cada subunidad comprende la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 18) (por ejemplo, $(G4S)_3$ (SEQ ID NO: 107) o $(G4S)_4$ (SEQ ID NO: 106)), conecta los dominios variables para crear la totalidad del dominio scFv.

Las secuencias de los CAR humanos se proporcionan a continuación en la Tabla 16.

Todos estos clones contenían un cambio de residuo Q/K en el dominio de señal del dominio coestimulador derivado de la cadena CD3zeta.

Tabla 16: Construcciones CAR CD123 humanas

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR123-1 NT	1123	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgcc tcggccccaagtccaactcgtccagtcaggagcggaagtcaagaagccccggagcgt cagtcaaagtgtcatgcaaagcctcgggctacacttcactgggtactacatgcac tgggtgcgccaggctccaggacagggactggaatggatgggatggatcaaccccgaa ctccggtggcaccaattacgcccagaagttccaggggagggtgaccatgaccgcg acacgtcgatccagcaccgcatacatggagctgtccaagctccggtccgacgatact gccgtgtactactgcgccacgggacatgaacattctggccactgtgccttttgacat ctggggtcagggaactatggttaccgtgtcctctggtggaggcggctccggcgggg ggggaagcggaggcggtggaagcgacattcagatgacccagtcgccttcatccctt ccggcgagcgtgggagatcgcgtcactatcacttgtcgggcctcgcagtccatatc caactacctcaattggtaccagcagaagccaggaaaagccaccgaaatctgctgatct acgccgcgtttcctttgcaatcgggagtgccaagcagattcagcggatcgggatca ggcactgatttcaccctcaccatcaactcgctgcaaccggaggatttcgctacgta ctattgccaacaaggagacagcgtgccgctcaccttcggcggagggactaagctgg aaatcaagaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggctcctaccatcgcc tcccagccctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtggggccgt gcataccccgggctcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggccccctctggctg gtacttgcggggtcctgctgctttcactctgtgatcactctttactgtaagcgcggt cggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggccgtgcagactac tcaagaggaggacggctgttcatgccggttccccgaggaggaggaaggcggctgcg aactgcgcgtgaaattcagccgcagccgcagatgctccagcctacaagcagggccag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctgga caagcggagaggacgggacccagaaatgggcggggaagccgccgcagaaagaatccc aagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaggcctatagcgag attggtatgaaaggggaacgcagaaggaggcaaaggccacgacggactgtaccaggg actcagcaccgccacaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgc ctcgg
CAR123-1 AA	1124	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNYL ATVPFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI STYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASFLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS DSVPLTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR123-1 scFv	1125	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFTGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDRNIL ATVPFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDPVTITCRASQSI STYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS DSVPLTFGGGTKLEIK
CAR123-1 VH	1126	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDRNILATVPFDIWGQGTMVTVSS
CAR123-1 VL	1127	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDSVPLTFGGGTKLEIK
CAR123-2 NT	1128	atggccctccctgtcaccgccctgctgctccctctggctcttctgctccacgccgctcggcc ccaagtgccaactcgtccaaagcggcgagcggcagtccaagaaaccccggagcgagcgtgaaagtgt cctgcaaagcctccggctacacctttaccgggtactacatgcactgggtgcgccaggcaccca ggacagggtcttgaatggatgggatggatcaacccctaatcagggcggaactaactacgcaca gaagtttcagggcgagagtgaccctgactcgggatacctccatctccactgtctacatggaac tgtcccgcttgcggtccgatgatacggccagtgtactactgcgcccgcgacatgaatatcctg gctacgtgccgttcgacatctggggacagggcaccatggttaccgtctcatcgggcggtgg aggttcaggaggaggcggctcgggaggcggaggttcggacattcagatgacccagtccccat cctctctgtccgccagcgtcggagatagggtgaccattacctgtcgggcctcgcaaagcatc tcctcgtacctcaactggtatcagcaaaagccgggaaaagccgcctaagctgctgatctacgc cgcttcgagcttgcaaagcyygtgccatccagattctcgggatcaggctcaggaaccgact tcaccctgaccgtgaacagcctccagccggaggacttcgccacttactactgccagcagggga ctccgtgccgcttactttcggcggcggtaccaagctggagatcaaajaccactcccccagc accgaggccaccccacccccggctcctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggagg catgtaaaccccgcagctggtggggccgtgcatacccgcgggtcttgacttcgcctgcgatatc tacatttgggccccttggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactct ttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctg tgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgtttccagaggaggaggatgcggc tgcgaactgcgcgtgaaattcagccgccgccgcagatgctccagcctaccagcaggggcagaa ccagctctacaacgaactcaatcttggtcgcgaagaggagtacgacgtgctggacaagcggga gagggccggaccctgagaatgggcggcaagccgcgccgcagaaagaatcccccaagagggcctgtac aacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacg cagaaggaggcaaaggccacgacgggctgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacct atgacgcccttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR123-2 AA	1129	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQS
		DSVPLTFGGGTRLEIKRTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKRLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CAR123-2 scFv	1130	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQS
CAR123-2 VH	1131	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTMVTVSS
CAR123-2 VL	1132	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQSDSVPLTFGGGTRLEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR123-3 NT	1133	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctccggcc ccaagtccaactcgttcaatccggcgcagaagtcaagaagccaggagcatcagtgaaagtgt cctgcaaagcctcaggctacatcttcacgggatactacatccactgggtgcgccaggctccg ggccagggccttgagtggatgggctggatcaaccctaactccggggggaaccaactacgctca gaagttccagggcagggtcactctgactcgcgatacctccatctccactgcgtacatggaac tctcgggactgagatccgacgatcctgccgtgtactactgcgcccgggacatgaacatcttg gcgaccgtgccgtttgacatttgggcaggcaccctcgtcactgtgtcgagcggtggcgg aggctcgggggtggcggatcaggaggggaggaagcgacatccagctgactcagagccca cgtcgttgtccgcgtcggtgggggatagagtgaccattacttgccgcgccagccagagcatc tcatcatatctgaattggtaccagcagaagccagggaaagccccaaaactgctgatctacgc tgcaagcagcctccaatcgggagtgccgtcaccggttctcgggtccggttcgggaactgact ttaccctgaccgtgaattcgctgcaaccggaggatttcgccacgtactactgtcagcaaggca gactccgtgccgctgacctttcggtggaggcaccaaggtcgaaatcaaagaccactacccagc acgaggccaccccaccccggctctctaccatcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggagg catgtagaccccgcagctggtgggggccgtgcatacccgggggtctcgacttcgcctgcgatatc tacatttgggccctctggctggtacttgcgggggtcctgctgctttcactcgtgatcactct ttactgtaaacgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctg tgccagactactccaagaggaggacggctgttccatgccggttccccgaggaggaggaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgccagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaa ccagctctacaacgaactcaatttggtccggagagaggagtacgacgttgctggacccagccgga gaggacgggaccccagaaatgggcgggaagccgcgccgagaaagaatgcccaagaggggcctgtac aacgagctccaaaaggatagatggcgaagcctatagcgagattggtatgaaagggggaacg cagaaggaggcaaaggccaccgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacct atgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg	
CAR123-3 AA	1134	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYIHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQS DSVPLTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKPLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
CAR123-3 scFv	1135	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYIHWVRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTIVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQS DSVPLTFGGGTKVEIK	

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR123-3 VH	1136	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLRSDDTAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTLVTVSS
CAR123-3 VL	1137	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTVNSLQPEDFATYYCQQSGDSVFLTPGGGTRVEIK
CAR123-4 NT	1138	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggccccaagtccaactccaacagtcaggcgcagaagtgaaaaagagcggtgcat cggtgaaagtgtcatgcaaagcctcgggctacaccttcactgactactatatgcac tggctgcggcaggcaccgggacaagggacttgagtggatgggatggatcaaccccgaa ttccagggggcactaactacgcgcagaagttccagggggagagtgaccctgacgagggg acacctccaatttcgacgtctacatggaattgtcgcgcctgagatcggacgatact gctgtgtactactgtgcccgcgacatgaacatcctcgcgactgtgcctttttgatat ctgggggcagggggactatggtcacccgtttcctccgcttccggtggcggaggcgcgg gaggccgggcctcgggtggaggaggcagcgacatccagatgacccagagccctccc tcgctgagcgcctcagtgggagatcgcgtgaccatcacttgccgggccagccagtc catttcgtcctacctcaattggtaccagcagaagccgggaaagccgcccaagctct gatctacgctgcgagctccctgcaaagcggggtgccgagccgattctcgggttcc ggctcgggaaccgacttcactctgaccatctcatccctgcaaccagaggacttttgc cacctactactgccaacaaggagattctgtcccactgacgttcggcggaggaacca aggtcgaaatcaagaccactacccccagcaccgaggccacccacccccggctcctacc atcgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccccgcagctggtgg ggccgtgcatacccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatctgggcccctc tggctggtacttgcgggggtcctgctgctttcactgtgatcactctttactgtaag cgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtgca gactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaggcg gctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcag gggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgt gctggacaagcgggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaaga atcccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctat agcgagattggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgta ccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccc tgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR123-4 AA	1139	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAEVKKSGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWLKQAF GQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ SISSYLNWYQQKPGKAPELLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSDSVPLTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK
CAR123-4 scFv	1140	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAEVKKSGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWLKQAF GQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNIL ATVPFDIWGQGTMVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ SISSYLNWYQQKPGKAPELLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSDSVPLTFGGGTKVEIK
CAR123-4 VH	1141	QVQLQQSGAEVKKSGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWLKQAFGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQ KFQGRVTLTRDTSISTVYMELSRLRSDDTAVYYCARDMNILATVPFDIWGQGTMVTVSS
CAR123-4 VL	1142	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPELLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSDSVPLTFGGGTKVEIK

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada enumerada en la Tabla 16. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno comprende además una CDR1 LC, una CDR2 LC y una CDR3 LC. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una LC CDR1, una LC CDR2 y una LC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera enumerada en la Tabla 16.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3 enumeradas en la Tabla 16, y una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 enumeradas en la Tabla 16.

En algunos casos, las CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia o una combinación de los mismos.

Las secuencias de las secuencias de CDR de los dominios scFv se muestran en la **Tabla 17** para los dominios variables de cadena pesada y en la **Tabla 18** para los dominios variables de cadena ligera. "ID" representa la SEQ ID NO respectiva para cada CDR.

Tabla 17. CDR del dominio variable de cadena pesada

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
CAR123-1	GYTFTDYYMH	1006	WINPNSGDTNYAQKFQG	1010	DNINILATVPFDI	101 4

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
CAR123-2	GYTFTGYYMH	1007	WINPNSGGTNYAQKFQG	1011	DMNILATVPFDI	101
CAR123-3	GYTFTGYYMH	1008	WINPNSGGTNYAQKFQG	1012	DMNILATVPFDI	101
						6
CAR123-4	GYIFTGYYIH	1009	WINPNSGGTNYAQKFQG		DMNILATVPFDI	101

Tabla 18. CDR de dominio variable de cadena ligera

Candidato	CDR1L	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	RASQSISSYLN	1018	AASSLQS	1022	QQGDSVPLT	1026
CAR123-2	RASQSISTYLN	1019	AAFSLQS	1023	QQGDSVPLT	1027
CAR123-3	RASQSISSYLN	1020	AASSLQS	1024	QQGDSVPLT	1028
CAR123-4	RASQSISSYLN	1021	AASSLQS	1025	QQGDSVPLT	1029

En un caso, el inhibidor de células B comprende un CAR CD123 que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD123, en el que dicho dominio de unión a CD123 comprende una o más de las secuencias de aminoácidos de la región determinante complementaria 1 de cadena ligera (LC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena ligera (LC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena ligera (LC CDR3) enumeradas en la Tabla 18, y una o más de la región determinante complementaria 1 de cadena pesada (HC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena pesada (HC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena pesada (HC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión a la cadena pesada de CD123 enumerada en la Tabla 17.

Las secuencias de CDR CD123 humanas adicionales de los dominios scFv se muestran en las **tablas 19, 21 y 23** para los dominios variables de cadena pesada y en las **tablas 20, 22 y 24** para los dominios variables de cadena ligera. "ID" representa la SEQ ID NO respectiva para cada CDR.

Las CDR proporcionadas en las **tablas 19 y 20** son según una combinación del esquema de numeración de Kabat y Chothia.

Tabla 19. CDR del dominio variable de cadena pesada

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
CAR123-1	GYTFTDYYMH	1030	WINPNSGDTNYAQKFQG	1034	DMNILATVPFDI	1038
CAR123-2	GYTFTGYYMH	1031	WINPNSGGTNYAQKFQG	1035	DMNILATVPFDI	1039
CAR123-3	GYIFTGYYIH	1032	WINPNSGGTNYAQKFQG	1036	DMNILATVPFDI	1040
CAR123-4	GYTFTGYYMH	1033	WINPNSGGTNYAQKFQG	1037	DMNILATVPFDI	1041

Tabla 20. CDR de dominio variable de cadena ligera

Candidato	CDR1L	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	CDR3L	SEQ ID NO:
CAR123-1	RASQSISTYLN	1042	AASSLQS	1046	QQGDSVPLT	1050
CAR123-2	RASQSISSYLN	1043	AAFSLQS	1047	QQGDSVPLT	1051
CAR123-3	RASQSISSYLN	1044	AASSLQS	1048	QQGDSVPLT	1052
CAR123-4	RASQSISSYLN	1045	AASSLQS	1049	QQGDSVPLT	1053

En un caso, el inhibidor de células B comprende un CAR CD123 que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD123, en el que dicho dominio de unión a CD123 comprende una o más de las secuencias de aminoácidos de la región determinante complementaria 1 de cadena ligera (LC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena ligera (LC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena ligera (LC CDR3) enumeradas en la Tabla 20, y una o más de la región determinante complementaria 1 de cadena pesada (HC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena pesada (HC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena pesada (HC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión a la cadena pesada de CD123 enumerada en la Tabla 19.

Tabla 21. CDRs de Dominio Variable de Cadena Pesada de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat (Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	CDR2H	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
CAR123-1	GYYMH	1054	WINPNSGGTNYAQKFQG	1058	DMNILATVPFDI	1062
CAR123-2	GYYMH	1055	WINPNSGGTNYAQKFQG	1059	DMNILATVPFDI	1063
CAR123-3	GYYIH	1056	WINPNSGGTNYAQKFQG	1060	DMNILATVPFDI	1064
CAR123-4	DYYMH	1057	WINPNSGDTNYAQKFQG	1061	DMNILATVPFDI	1065

Tabla 22. CDRs de Dominio Variable de Cadena Ligera de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat (Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)

Candidato	CDR1L	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
CAR123-1	RASQSISTYLN	1066	AAFSLQS	1070	QQGDSVPLT	1074
CAR123-2	RASQSISSYLN	1067	AASSLQS	1071	QQGDSVPLT	1075
CAR123-3	RASQSISSYLN	1068	AASSLQS	1072	QQGDSVPLT	1076
CAR123-4	RASQSISSYLN	1069	AASSLQS	1073	QQGDSVPLT	1077

En un caso, el inhibidor de células B comprende un CAR CD123 que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD123, en el que dicho dominio de unión a CD123 comprende una o más de las secuencias de aminoácidos de la región determinante complementaria 1 de cadena ligera (LC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena ligera (LC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena ligera (LC CDR3) enumeradas en la Tabla 22, y una o más de la región determinante complementaria 1 de cadena pesada (HC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena pesada (HC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena pesada (HC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión a la cadena pesada de CD123 enumerada en la Tabla 21.

Tabla 23. CDR del dominio variable de cadena pesada de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia (Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273,927-948)

Candidato	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
CAR123-1	GYTFTGY	1078	NPNSGG	1082	DMNILATVPFDI	1086
CAR123-2	GYTFTGY	1079	NPNSGG	1083	DMNILATVPFDI	1087
CAR123-3	GYIFTGY	1080	NPNSGG	1084	DMNILATVPFDI	1088
CAR123-4	GYTFTDY	1081	NPNSGD	1085	DMNILATVPFDI	1089

Tabla 24. CDR del dominio variable de cadena ligera según el esquema de numeración de Chothia (Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948)

Candidato	CDR1L	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	CDR3L	SEQ ID NO:
CAR123-1	SQSISTY	1090	AAF	1094	GDSVPL	1098
CAR123-2	SQSISSY	1091	AAS	1095	GDSVPL	1099

Candidato	CDR1L	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	CDR3L	SEQ ID NO:
CAR123-3	SQSISSY	1092	AAS	1096	GDSVPL	1100
CAR123-4	SQSISSY	1093	AAS	1097	GDSVPL	1101

En un caso, el inhibidor de células B comprende un CAR CD123 que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD123, en el que dicho dominio de unión a CD123 comprende una o más de las secuencias de aminoácidos de la región determinante complementaria 1 de cadena ligera (LC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena ligera (LC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena ligera (LC CDR3) enumeradas en la Tabla 24, y una o más de la región determinante complementaria 1 de cadena pesada (HC CDR1), la región determinante complementaria 2 de cadena pesada (HC CDR2) y la región determinante complementaria 3 de cadena pesada (HC CDR3) de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión a la cadena pesada de CD123 enumerada en la Tabla 23.

Se proporciona una descripción adicional de estos CAR CD123, por ejemplo, en el documento PCT/CN2014/090508.

Se evaluaron construcciones de CAR humano anti-CD123 para determinar la actividad utilizando una línea de células Jurkat que contenía el indicador de luciferasa impulsado por el promotor de NFAT (denominadas células JNL). Se midió la actividad de CAR CD123 para cuatro construcciones de CAR humanas descritas en el presente documento (CAR CD123 1-4) y las construcciones de CAR CD123 murinas 1172 y 1176. La actividad CAR se midió como la activación de este indicador impulsado por NFAT. Se añadieron sobrenadantes lentivíricos que contenían las construcciones de CART a las células JNL para la transducción. 4-6 días después de la transducción, las células JNL se evaluaron para detectar la expresión de CAR por FACS como se describe más adelante o se mezclaron con líneas celulares positivas para la diana (células MOLM3, K562 modificadas para expresar CD123 (CD123-K562)) o negativas para la diana (K562) con una relación de línea celular efectora (JNL) respecto a diana (E:T) de 3:1 para desencadenar la activación (figura 41). Después de 20 horas de coincubación, se midió la señal de luciferasa utilizando el ensayo de luciferasa Bright-Glo™ en el instrumento EnVision como se muestra en la Figura 42.

Se seleccionaron construcciones de CAR anti-CD123 óptimas en función de la cantidad y la calidad de las respuestas de linfocitos T efectores de linfocitos T transducidos con CAR CD123 ("CART-CD123" o "linfocitos T CART-CD123") en respuesta a dianas que expresan CD123 ("CD123+"). Las respuestas de linfocitos T efectores incluyen, pero sin limitación, expansión celular, proliferación, duplicación, producción de citocinas y destrucción de células diana o actividad citolítica (desgranulación).

Generación de CART CD123

Se utilizaron vectores de transferencia lentivíricos que codifican scFv humano para producir el material genómico empaquetado en las partículas lentivíricas pseudotipadas VSVg. El ADN del vector de transferencia lentivírico se mezcló con los tres componentes de empaquetamiento de VSVg, gag/pol y rev en combinación con el reactivo lipofectamine para transfectarlos juntos en células Lenti-X 293T (Clontech).

Después de 30 h, el medio se recogió, se filtró y se almacenó a -80 ºC. Los CART-CD123 terapéuticos se generaron a partir de la sangre de un donante normal con aféresis, cuyas células T vírgenes se obtuvieron mediante selección negativa para células T, linfocitos CD4+ y CD8+. Estas células se activaron mediante perlas CD3x28 (Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28, Invitrogen) en una proporción de 1:3 en RPMI 1640, 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FCS), 2 mM de L-glutamina, 1x penicilina/estreptomicina, 100 µm de aminoácidos no esenciales, 1 mM de NaPiruvato, 10 mM de Hepes y 55 µM de 2-mercaptoetanol a 37 °C, 5 % de CO_2. Las células T se cultivaron a 1×10^6 células T en 0,5 ml de medio por pocillo de una placa de 24 pocillos. Después de 24 horas, los linfocitos T experimentaron activación (*blasting*) y se añadieron 0,5 ml de sobrenadante vírico. Los linfocitos T comenzaron entonces a dividirse con un patrón de crecimiento logarítmico, que se monitorizó midiendo los recuentos de células por ml, y los linfocitos T se diluyeron en medio fresco cada dos días. A medida que los linfocitos T comenzaron a reposar después de aproximadamente 10 días, el crecimiento logarítmico disminuyó. La combinación de ralentización de la tasa de crecimiento y un tamaño de linfocitos T que se acerca a ~300 fl determinó el estado para que los linfocitos T se crioconservaran para un análisis posterior.

Antes de la crioconservación, el porcentaje de células transducidas (que expresan el CAR anti-CD123 en la superficie celular) y su intensidad de fluorescencia relativa de expresión se determinaron mediante análisis por citometría de flujo en un BD LSRFortessa o BD-FACSCanto utilizando Proteína L como reactivo de detección. La selección de las gráficas de tipo histograma de intensidad de fluorescencia relativa del FACS para la señal por encima de la de las células no teñidas demostró el porcentaje de linfocitos T transducidos. La transducción dio como resultado un intervalo de células positivas para CART de un 12-42 %, como se muestra en la figura 42.

Evaluación de la actividad citolítica de células T redirigidas a CART CD123.

Para evaluar las capacidades funcionales de los linfocitos T CART-CD123 para eliminar las células que expresan la diana, las células se descongelaron y se permitió que se recuperaran durante una noche.

La destrucción de células T se dirigió hacia líneas celulares de *leucemia mielógena aguda* MOLM13 que expresan CD123 que expresan de forma estable luciferasa. Los linfocitos T no transducidos se utilizaron para determinar los niveles de destrucción inespecífica de fondo. Se midieron las actividades citolíticas de CART-CD123 como una titulación de proporciones efector:célula diana de 4:1 y diluciones decrecientes con un factor de 2 de linfocitos T donde se definieron los efectores como linfocitos T que expresaban el receptor quimérico anti-CD123. Los ensayos se iniciaron mezclando un número apropiado de linfocitos T con un número constante de células diana. Se midió la señal de la luciferasa después de 20 horas utilizando el ensayo de luciferasa Bright-Glo™ en el instrumento EnVision. A medida que aumentaba la proporción de células que expresaban CART-CD123 con respecto a linfocitos T no transducidos, aumentaba de forma similar la destrucción de células CD123. Los datos presentados en el presente documento sugieren que esas células que expresan CD123 son destruidas únicamente por células que expresan CART-CD123 y no por linfocitos T no transducidos. Figura 43.

Transducción de linfocitos T

Se seleccionaron los clones humanos anti-CD123 humano NVS 2 (que expresa CAR123-2), NVS 3 (que expresa CAR123-3), NVS 4 (que expresa CAR123-4) para un estudio adicional. Todos estos clones presentaron una reactividad cruzada contra CD123 de macaco cangrejero. Su actividad se comparó con los clones de ratón 1172 y 1176, que comprenden los dominios VH y VL en una orientación ligero-a-pesado con un dominio bisagra de CD8, un dominio transmembrana de CD8 y un dominio coestimulante de 41BB. 1176 también presenta reactividad cruzada con CD123 de macaco cangrejero. 1172 no la tiene.

Se utilizaron plásmidos para transformar células competentes, se cultivaron en 500 cm^3 de caldo de cultivo, se aislaron mediante maxiprep y se utilizaron para transducir células 293T mediante métodos convencionales. Se recogió el sobrenadante lentivírico a 24 y 48 horas, se concentró utilizando ultracentrifugación y se congeló.

Los lentivirus se valoraron en células SupT1 y se determinó la cantidad apropiada de virus para una transducción de linfocitos T primarios con una MOI de 3. Se estimularon células CD4+CD8 de donante normal primarias utilizando perlas anti-CD3/CD28 (Dynal, Invitrogen) y 100 U/ml de interleucina-2 durante 6 días, después se eliminaron las perlas y se congelaron una vez. El volumen celular de los linfocitos T disminuyó a <300 fl (después de aproximadamente 10-12 días).

La eficiencia de la transducción de linfocitos T fue de prácticamente un 100 % para todos los clones (fig. 44A y 44B). Las proporciones CD4:CD8 fueron de aproximadamente 1:1 en los clones NVS, y 3:2 en los clones 1172 y 1176 (fig. 45).

Desgranulación

Para evaluar la desgranulación, se descongelaron linfocitos CART (clones NVS 2-4, 1172 y 1176), se dejaron reposar durante una noche con una concentración de $2e^6$ células/mL en medio para linfocitos T. Las células se contaron entonces y se resuspendieron a $1e^6$ células/ml al día siguiente. Se resuspendieron las células diana tumorales (TCM, PMA/iono, MOLM14 o JURKAT) con una concentración de $5e^6$ células/mL. Las células se sembraron en placas con una relación de $1e^5$ linfocitos T: $5e^5$ células tumorales en placas de 48 pocillos y se incubaron durante 2 horas en presencia de anticuerpos anti-CD107a PECy7, anti-CD49d purificados y anti-CD28 purificados. Las células se recogieron a continuación, se tiñeron con APC anti-CD3 y se realizó una adquisición utilizando BD LSR Fortessa (fig. 46).

La desgranulación de linfocitos T se indica en el cuadrante superior derecho de cada gráfico de la figura 46. Los resultados presentados en el presente documento demuestran un reconocimiento similar de los linfocitos T por las dianas CD123+, manifestado por una desgranulación similar utilizando un ensayo *in vitro* de 2 h. C1176 tuvo una desgranulación inferior de un 65 % en comparación con aproximadamente un 80 % en los otros clones.

Citotoxicidad

Para evaluar la citotoxicidad, se descongelaron linfocitos CART (clones NVS 2-4, 1172 y 1176) y se dejaron reposar durante una noche con una concentración de $2e^6$ células/ml en medio para linfocitos T. Se contaron las células y se resuspendieron con una concentración de $1e^6$ células/ml el día siguiente. Se resuspendieron las células diana tumorales (MOLM14) con una concentración de $1e^6$ células/ml. Las células se colocaron en una placa de 96 pocillos de fondo plano, negra con proporciones E:T decrecientes como se indica (fig. 47), por duplicado. Después de 20 horas de incubación, se añadió luciferina y se obtuvieron imágenes de la placa para determinar el flujo de fotones como una medida de las células vivas residuales. La destrucción de células MOLM14 fue equivalente entre todos los clones para la mayoría de relaciones efector:diana a las 20 horas.

Modelo in vivo en ratones

Se inyectaron i.v. $1e^6$ células MOLM14 que expresaban luciferasa a ratones NSG en D0. En D6 se obtuvieron imágenes de los ratones (Espectro IVIS) para determinar la carga tumoral y se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento. Los ratones con la carga tumoral más baja se asignaron al grupo de control (linfocitos T no transducidos, UTD). Los linfocitos CART (clones NVS 2-4, 1172 y 1176) o linfocitos T de control (1e6) se inyectaron i.v. en D7. Los datos de la obtención de imágenes realizada en D13 se muestran en la figura 48. Seis días después de la inyección, todas las construcciones anti-CD123 proporcionaron un efecto antitumoral igual, coherente con los datos *in vitro*.

Se generan fragmentos variables de cadena simple (scFv) anti-CD123 humanizados basados en 1176 murino que es reactivo de forma cruzada contra CD123 de mono cinomolgo y se clonan en un vector de expresión lentiviral con la cadena intracelular CD3zeta y el dominio coestimulador intracelular de 4-1BB.

Se varió el orden en el que aparecen los dominios VL y VH en el scFv (es decir, orientación VL-VH o VH-VL), y en el que tres o cuatro copias de la subunidad "G4S" (SEQ ID NO: 18), en el que cada subunidad comprende la secuencia GGGGS (SEQ ID NO: 18) (por ejemplo, $(G4S)_3$ (SEQ ID NO: 107) o $(G4S)_4$ (SEQ ID NO: 106)), conectan los dominios variables para crear la totalidad del dominio scFv, como se muestra en la Tabla 25.

Las secuencias de los CAR humanizados se proporcionan a continuación en la Tabla 25.

Todos estos clones contenían un cambio de residuo Q/K en el dominio de señal del dominio coestimulador derivado de la cadena CD3zeta.

Tabla 25: Construcciones de CAR CD123 humanizadas

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-1 NT	1143	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGC TCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTA GCGTGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACCTCCTACTGGATGAAT TGGGTCAGACAGGCCCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGCAAGGATTGATCCTTA CGACTCCGAAACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGG ATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACC GCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAACTGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACTAC CGTGACCGTCTCAAGCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGCTCCGGCGGCGGCG GCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCATTTCTGTCG GCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATTACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAA GGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACT CGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTTCTCCGGTTCGGGAAGCGGT ACCGAATTCACCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTA CTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACCAAGCTCGAAA TCAAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCCAACCCCGCCTCCTACCATCGCCTCC CAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcatgtagaccgcagctggtgggccgtgca taccacgggctattgacttgcactgcgatatctacatttgggccccctatggctggta cttgcgggctcctgctgctttcactctgatcactcttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttccatgccggtttccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaagggggaacgcagaaggggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
hzCAR123-1 AA	1144	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMN WVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLS ASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGS TEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
scFv hzCAR123-1	1145	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAP GQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDD YWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSYLSASVGDRVTITCRASKGIS KDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHN
		EYPYTFGGGTKVEIK
VH hzCAR123-1	1146	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-1 VL	1147	DVQLTQSPSYLSASVGDRVTITCRASKGISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-2 NT	1148	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCC TCGGCCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTA GCGTGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACCTCCTACTGGATGAAT TGGGTCAGACAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTA CGACTCCGAAACCCATTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATCACTGCG ATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACC GCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAACTGGCACGACTATTGGGGACAGGGAACTAC CGTGACCGTGTCAAGCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCG GCTCAGGCGGCGGAGGAAGCGAAGTCGTGCTGACCCAGTCGCCCGCAACCCTCTCT CTGTCGCCGGGAGAAACGCCACTCTTTCCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAA GGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACT CCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATTTTCCGTTCGGGGTCGGGG ACTGACTTCACCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTA CTGCCAGCAGCACAACAAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAGGTCGAGA TCAAGACCACTACCCCAGTACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCC CAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcatgtagacccgcagctggtgggcgtgca taccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctcrggctggta cttgcgggctcctgccgctttcactctgtgatcactctttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttccatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggqcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcgaagcctatagcgagatt ggtatgaaagggqaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccacccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg
hzCAR123-2 AA	1149	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG NWDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASRSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKRLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
scFv hzCAR123-2	1150	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG NWDGYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
VH hzCAR123-2	1151	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDGYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-2 VL	1152	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-3 NT	1153	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCACTCTTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTAGCGTGAAAGTGT CCTGCAAAGCCTCCGGCTACACATTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCAGACAGGCCCCC GGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGACCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGC TGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGACACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGAACTGGGACGGC TATTGGGGACAGGGCAACTACCCCGACCGTGTCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGC CTCCGGCGGCGGTGGCTCAGGCGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGCTAT TCCTGTCCGTGACTCCGGGAGAAAAGGTCACGATTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCTCCTAAGCTGTTGATCTACTCCGG GTCCACCCTTCAATGGGAGTGCCATCCCGTTTAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCA CTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAAC AAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACC GAGCCCACCACCCCGCCTCCTACCATCGCTTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtacacccgcagctggtgggcgtgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactgtgatcactatcta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggcctgtgc agactactccgaggaggaggaggaggatgtgaactgcgcgtttccagaggaggaggaggatgcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaaccag gtctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgccagaaggaatcccaggaggggctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcggaggcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-3 AA	1154	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG NWDGYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNEYPYTFGQGTKVEIKTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-3	1155	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG NWDGYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR
		ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNEYPYTFGQGTKVEIK
hzCAR123-3 VH	1156	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-3 VL	1157	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFGQGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-4 NT	1158	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCAGCTAGCGTCAAAGTGT CCTGCAAAGCTTCCGGCTACACATTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCAGACAGGCCGCC GGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGC TGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAACTTGGGACGAC TATTGGGGACAGGGAACTACCTGGACCGTGTCAAGCGGGGTTGGCGGTACGGGAGCAGGGGC CTCCTGACCGTCAGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGATCAGACATCCAG ATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCAAG GCCTCCCAGGACGTCAGCACCGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAG CTGCTGATCTACTCCGCCTCCTACCGCTACACCGGCGTGCCCGACCGCTTCACCGGCTCCGGC TCCGGCACCGACTTCACCTTCACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTTC TGCCAGCAGCACTACACCACCCCCCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGACC ACTACCCCAGCACCGAGCCCACCCACCCCTGCCCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTG CGCCCTGAGGCCTGCCGGCCTGCTGCTGGAGGCGCCGTGCACACCCGGGGTCGACTTCGCCTG CGATATCTACATCTGGGCCCCTCTGGCTGGCACTTGCGGGGTCCTGCTGTCCCTGGTGATCACT CTTTACTGCAACCACCGCAACCGGTCCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC ATGACCCCTCGCCGGCCTGGCCCCACCCGCAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCTCCCCGGGAC TTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAG GGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCCGGCGGGAGGAGTACGACGTGCTGGAC AAGCGGCGGGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGC CTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGC GAGCGGCGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGAC ACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGG

ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC
CCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCAGCTAGCGTCAAAGTGT
CCTGCAAAGCTTCCGGCTACACATTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCAGACAGGCCGCC
GGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAACCA
GAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTTACATGGAGC
TGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAACTTGGGACGAC
TATTGGGGACAGGGAACTACCTGGACCGTGTCAAGCGGGGTTGGCGGTACGGGAGCAGGGGC
CTCCTGACCGTCAGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGCAGCGGAGGCGGTGGATCAGACATCCAG
ATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCAAG
GCCTCCCAGGACGTCAGCACCGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAG
CTGCTGATCTACTCCGCCTCCTACCGCTACACCGGCGTGCCCGACCGCTTCACCGGCTCCGGC
TCCGGCACCGACTTCACCTTCACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTTC
TGCCAGCAGCACTACACCACCCCCCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGACC
ACTACCCCAGCACCGAGCCCACCCACCCCTGCCCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTG
CGCCCTGAGGCCTGCCGGCCTGCTGCTGGAGGCGCCGTGCACACCCGGGGTCGACTTCGCCTG
CGATATCTACATCTGGGCCCCTCTGGCTGGCACTTGCGGGGTCCTGCTGTCCCTGGTGATCACT
CTTTACTGCAACCACCGCAACCGGTCCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGACTACATGAAC
ATGACCCCTCGCCGGCCTGGCCCCACCCGCAAGCACTACCAGCCCTACGCCCCTCCCCGGGAC
TTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGACGCCCCTGCCTACCAGCAG
GGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCCGGCGGGAGGAGTACGACGTGCTGGAC
AAGCGGCGGGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGC
CTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGC
GAGCGGCGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGAC
ACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGG |
| **hzCAR123-4 AA** | 1159 | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG NWDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNEYPYTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKPGHRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPP

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ
APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG
NWDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCR
ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA
VYYCQQHNEYPYTFGQGTKVEIK |
| **scFv hzCAR123-4** | 1160 | |

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-4 VH	1161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFEDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGNSDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-4 VL	1162	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVSYIGDLAWYQQKPGQPPKLLIYEGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRNKYPFTFGGGTKVEIK
hzCAR123-5 NT	1163	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC GGATGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCATTGCTGTCGGCTCAGTGGCAGACAGAGTGACCA TTACTTGTCGGGCCTCCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA AAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGGGTCGACCCTTCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTT CTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACT TCGCCACCTACTATTGCCAACAGCACAACAGCTACCCGTTCACTTTCGGCGGTGGCACCAAG GTCGAAATCAAGCGCGGTGGAGGTGGATCCGGAGGAGGCGGTTCCGAGGTGCAGCTGCTCGA GTCTGGAGGCGGCTTGGTACAGCCTGGCGGTTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGCTT CACATTCAGCTCCTACGCCATGTCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGG TGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGA CAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGCAAGCATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAATCCACTTCCACAGCTTT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGACACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGGGGAAAAC TGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTCACCGTGTCAAGCGACCACTACCCCAGCACC GAGCCACCCAACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtgagccgcagctggtggggcagtgcctaccgggtcttgacttgcctgcgatatctac attttggccctcttggctggtactttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgagaccctgtgc agactacttcaagaggaggaacggctgttccatgccggttccaagaggaggaggaggaagcgcgatgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcagggtcagaaccaa gctctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgtagag gacgggaccccgagaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaac gagctccaaaagatagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaagggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttccatgcaggccctgcgcctcgg
hzCAR123-5 AA	1164	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASESVSYIGDLAWYQQK PGKAPKLLIYEGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNKYPFTFG QGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGNSDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSRRKRLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
scFv hzCAR123-5	1165	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAFKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-5 VH	1166	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-5 VL	1167	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAFKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-6 NT	1168	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGGTGCTGACCCAGTCGCCGGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAAACGGCCACTC TTTCCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGT CAAGCCCCGCGGCTCCTGATCTACTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATT TTCCGGTTCCGGGTCGGGACTGACTTCACCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACT TCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAACGAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAG GTCGAGATCAAGGGCGGTGGCGGTTAGCGGAGGAGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCTAGCGGC GGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTTCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCTAGCG TGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACCTCTTACTGGATGAATTGGGTCAGA CAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATTAGCTGTGGAATAAGTCCACTTCCACCGCTT ACATGCAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGTGCCCGGGGAAAC TGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACTACTGTGACCGTCTCAAGCACTACTACCCCAGCACC GAGCCCACCCAGCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCCGAggcat gtagccccgcagctggtgggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggccccttctggctggtacttgcgggghcctgctgctttcactcgtgatcactatta cttgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaagcgcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaaccaa gctctacaacgagctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggaccctgagaagaaggggcgggcaagccgcgcagaaagaatcccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgccg aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-6 AA	1169	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRGPKRLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-6	1170	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-6 VH	1171	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-6 VL	1172	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-7 NT	1173	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCC CGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAGAAAGTCACCA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGCACTGGTACCAACAGAAGCCGGAC CAGGCCCCTAAGCTGTTGATCTACTCCGGCTCCACCTTCAATCGGGAGTGCCATCCGCGGTT TAGCGGTCCGGGATTCTTCGGGAAGCCGACTTCACTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATG CCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAACGAGTATCCGTACACGTTCGGAGGCGGTACCAAA GTGGAGATCAAGGGCGGTGGCGGTAGCGGACGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCTCAGGCGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGGCGCTAGCG TGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACTTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGA CAGGCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCTT ACATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGCGGGAAAC TGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTGACCGTGTCAAGCACCACTACTCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGAggcat gtagaccgcgcgctggtgggcgtgcatacccgggtcttgacttcgccgtgcgatatctac atttgggccctctggctggtacttgcgggggtcctgctgtttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaggaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccag gtctatacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgggagag gacgggaccctgagaatgggcggcaagccgcgcagaaagaatcccaagaggggcctgtacaac gagctccaaaagatgatggcagaggctatagcgagattgggtatgaaagggaacgcag aaggaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-7 AA	1174	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASESISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-7	1175	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASESISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-7 VH	1176	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFEDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-7 VL	1177	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPFTFGGGTKVEIK
hzCAR123-8 NT	1178	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGCTCATGACCCAGTCCCCTGGACTCACTCCTCTGTCTGTCACTTGTGAGAGAGACTCA TCAACTGTCGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGA
		CAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTT CTCCGGTTCCGGGTCCGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCGTCGCTGCAAGCCGAAGATG TGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAACGAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAG GTGGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGCGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCTCCTCAGTG TGAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGGTACACATTCACCTCCTACTGGATGAACTTTGGTCAGA CAGCCGCCCGGCCAGGGACTCGAGTGGATGGGAAGGATTGATCCTTACGACTCCGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGCGTGACCATGACTGTGGATAAGTCCACTTCCACCGCCTT CATGGAGCTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGATACCGCAGTGTACTACTGCGCCCGCGGAAAC TGGGACGACTATTGGGGACAGGGAACTACCGTGACCGTGTCAAGCACCACTACCCCAGCACC GAGCCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGAggcat gtagaccgcagctggtgggccgtgcatacccgggtcttgacttcgcctgcgatatctac attgggcccttcgcggctggtactgcgggtcctgctgctttcactggtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggccgtgc agactactccgaggaggacgcgctgttcatgccggttccagaggaggaggacggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcagggccagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggagccctgaaatgggcgggaagccgcgccgagaagaatcccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggatkagatggcgaggcctatagcgagattgggtatgcgaggggcacgcgg aaggggcacgacggcctgtaccagggactcagcgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-8 AA	1179	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTPVTVSS**TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT** RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	
scFv hzCAR123-8	1180	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTPVTVSS
hzCAR123-8 VH	1181	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTPVTVSS
hzCAR123-8 VL	1182	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNEYPYTFGQGTKVEIK
hzCAR123-9 NT	1183	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCCTCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAACTGAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTCAAGGTGT CCTGCAAAGCCTCCGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCACCT GGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAATCA GAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACACAAGTCCGTGTCCACTGCCTACCTCCAAA TTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAACTGGGATGAC

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		TATTWGGGCCAWCGAACTACCVTGACTGTGTCCTTCCGWGGGTWGCGGTAWCGGAGGAGGWGG CTCCTGGCGGCCGWCGGCTCAWGGGCGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCAT TTCTGTCGGCCTCAGTGGWGAGACAGAGTGACCATTACTTGTCGGGCCTCAAGAWCATCTCC AWGTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTGGGG GTCWACCGCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTTCTCCGGTTCGGGAAGGGGTACCGAATTCA CCCTTACTATCTCCTCCTTGCAACGWAGGATTCGCCACCTACTACTGCCAWCAGCACGAC AAGTACCGTACACTTTCWGGGGTWGCACGAAGGTCGAAATTAAGACCACTACGCCAGCACC GAGCCACCCACTCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGWAggcat gtagaccgcagctggtgggcgcgtgcataccgggtcttgacttcgcctgcgatatctac actttgggcccttctggctggtactgcggtgctccgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaaggcgccgtcggaagaagctgctgtwcatcttaagcgaccttcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaacca gctctacaacgaactcaatcttgttcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgcgagag gacggggaccctgaaatggtggcggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggacaagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggggagcgcag aagggccaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgccctcgg

hzCAR123-9 AA	1184	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPSDFA TYYCQQHNKYPYTFGQGTKVEIKTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-9	1185	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPSDFA TYYCQQHNKYPYTFGQGTKVEIK
hzCAR123-9 VH	1186	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVPQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-10 VL	1187	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNRYPYTFGQGTKVEIK
hzCAR123-10 NT	1188	ATGGCGCTGCCTGTCACCGCGCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCTGAAGTTAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTCAAAGTGT CCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCACCT GGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAATCA GAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCCTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAA TTAGCAGCCTGAAGGCCGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAACTGGGATGAC TATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGTGGCGGCTCAGGCGGCGGAGACATCCAGCTGACCCAGTCCCCCAGCTCCCTGA GCGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTGTCGGGCCAGCAAGTCCATCTCCAAGGAC CTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGTAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGGC CTCCAGCGTGCAATCAGGATCCCAGCCGCATTTTCCGGTTCCGGGTCCGGGACTGACTTCA CCTTGACCATTAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAC AGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAGGTCGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACC GAGACGACCCCACCCCGCCCACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagacccgcagctggtgggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggccccctgtggctggtcgttgcgggctcctgctgctttcactcgtgatcactatttt ctgtaagcggcggtcggaagaagctgctgtacatatttaagcaaccattcatgaggccatgtgc agactcctcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaggaggatgcgg gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgggaggc gacgggaccctgaaatgggcgggaagccgcgccgagaaaqaatcccaagaggggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcgaggcctatagcgagattgggtatgaaaggcgaacgcgg aagaggccaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

		AAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACTCCGGC CTCCAGCGTGCAATCAGGATCCCAGCCGCATTTTCCGGTTCCGGGTCCGGGACTGACTTCA CCTTGACCATTAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAC AGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAGGTCGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACC GAGACGACCCCACCCCGCCCACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGgcat gtagacccgcagctggtgggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggccccctgtggctggtcgttgcgggctcctgctgctttcactcgtgatcactatttt ctgtaagcggcggtcggaagaagctgctgtacatatttaagcaaccattcatgaggccatgtgc agactcctcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaggaggatgcgg gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgggaggc gacgggaccctgaaatgggcgggaagccgcgccgagaaaqaatcccaagaggggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcgaggcctatagcgagattgggtatgaaaggcgaacgcgg aagaggccaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-10 AA	1189	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQ APGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTLSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNRYPYTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
scFv hzCAR123-10	1190	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTGYGMNWVRQ APGQGLEWMGWINTDTGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARG RWDFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASKGISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPTTFGGGTKVEIK
hzCAR123-10 VH	1191	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTDTGEPTYAQ KFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGRWDFDYWGQGTLVTVSS
hzCAR123-10 VL	1192	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNKYPTTFGGGTKVEIK
hzCAR123-11 NT	1193	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCCCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCGTCAAAGTGT CCTGCAAGGCCTCCGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCACCT GGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCATTACAATCA GAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACACAAGTGCCGTGTCCACCGCCTACCTCCAAA TTAGCAGCCTGAAGGCCGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAACTGGGATGAC TATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCTGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGCGGGGC CTCGGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCAT TCCTGTCCGTGACTCCGGGAGAAAAGGTCACGATTACTTGCCGGGCCTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTGGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGG GTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTTTAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCA CTTTCACGATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATGCGGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAAC
		AAGTATCCGTACACCTTTGGAGGCGGTACCAAAGTGGAGATCAAGAGCGACTACCCCATCGACC GAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCCCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtagaccgcagctggtgggcagtgcataccgggtcttgacttcgcctgcgatatctac attgggcccctctggctggtaattgcgtgggtcatgctgcttttcactcgtgatcactctttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgc agactacttcaagaggaggacggctgttcatgccggttccaagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgagtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagccatacaagcagggccagaaccc gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gaccgggaccccgaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaggaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaagcgggaacgcag aagaggcatagggccacgacgggactgtaccagggactcagcaccgccacccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-11 AA	1194	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVRQ APGQGLEWMGWINTYTGEPTYAQKFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYYCARD NWDGYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-11	1195	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVRQ APGQGLEWMGWINTYTGEPTYAQKFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYYCARD NWDGYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-11 VH	1196	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYAQ KFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYYCARDNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-11 VL	1197	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-12 NT	1198	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTGAAAGTGT CCTGCAAAGCCTCCGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCACCT GGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACGGAGCCCACATACGCCCAGAA GTTCAAGGGACGGGTTTGTGTTCTCCCTGGACACAAGCGTCAGTACCGCCTACCTCCAGAT TTAGCAGCCTGAAGGCTGAGGACACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAACTGGGACGAC TATTGGGGCCAAGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGGGGTGG CTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGCGGCGGAGGAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACT CACTGGCTGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGAACCATCAACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGC AAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTCCGG GTCCACCTTGCAAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCA CGCTCACTATTTCGTCGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAAC AAGTACCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGACCACTACCCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCCCACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGCCCGGAggcat gtagaccagcagctggtgggggcgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctac

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		atttgggcccctctggctggtactgcgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttc ctgtacggcgcggtcggcagcagcagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggcctgtgc agactactccaggaggaggacggctgttcatgccggtttccgaggacggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaacttcagcgcgcagcgcagatgcctcagcctacaagcagggggcagaacca gctctacaacgaactcaatctaggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgccgcgag gacgggaccctcagatgggcgggaagccgcgccagaaagaatcccccaagagggtctgtacaac gagctccagaaggataagatggcgaggcctatagcgagattgggtacgaaggggaacgcagg aaggcgcaaaggccacgaccgactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-12 AA	1199	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVRQ APGQGLEWMGWINTYTGEPTYVDDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARD WDDYYGMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCK ASQSVDFDGDSFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQSNEDPYTFGGGTKVEIKTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-12	1200	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVRQ APGQGLEWMGWINTYTGEPTYVDDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARD WDDYYGMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCK ASQSVDFDGDSFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQSNEDPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-12 VH	1201	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYVD DFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARDWDDYYGMDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-12 VL	1202	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDFDGDSFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPYTFGGGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-13 NT	1203	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCATTTCTGTCGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGTCGGGCCTCCAAGAGTATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA AAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGGTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTT CTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCTTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACT TCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAACGAGTACCCGTACACTTTCGGCGGTGGCACGAAG GTCGAAATCAAGGGCGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGCGG CGGACGAACCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCG TCAAACTGTCCTGCAAAGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGC CAGGCACCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCT ACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCCGAGGACACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAAC TGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCGCCACTACCCCACCAGCCC GAGGCCACCCCACCCCGCCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGAGgcat gtagaccgcagctggtgggcgtgcatacccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcgccctatggctggtacttgcgggtcctgctgtttctactgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccccgaggaggaggaaggcggctgc
		gaactgtgcgtgaaattcagcgccgcagccgcagatgcctccagcctacaagcagggccagaaccc gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgccgaggg gacggtgaccccgaaatgggcggcggaagccgccgcagaaagaatcccccaggagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcgaggcctatagcgagattgggtatgaaaggcgagcgcgg aaggacggcaaaggccacgacggactgtaccagggtctcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-13 AA	1204	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASESISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPFT FG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYSQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
scFv hzCAR123-13	1205	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNRYPYTFG GGTKVEIRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWLDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-13 VH	1206	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWLDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-13 VL	1207	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNRYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-14 NT	1208	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGGTGCTGACCCAGTCGCCCGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGAGAAGCGCCACTC TTTCCTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGT CAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATT TTCCGGTTCGGGGTCGGGAGTGACTTCACCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACT TCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAACAGGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAG GTCGAGATCAAGGGCGGTGGCGGCTAGCGGAGGAGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGCGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCG TCAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCCGGATACACGTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGC CAGGCACCTGGACAGGGCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCT ACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCCGAGGATACAGCCTGTCTACTACTGCGCTCGCCGAAAC TGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGCCTCCTACCATCGCTCCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtgaaccagcagctggtggtggccgtgctagccgggctgctgacttgcctgctgatatctac atttgtgcctctctggctggtcattgcgggtcctgctgctttcactctgtgatcaaacgtgg cagaaagaagctgctgtacatcttcaagcaaccctttatgaggccgtgcg aggctactctgaggaggaggacgggtgttcatgccggttcccaggaggaggaggatgtgagc gaactgcgcgtgaagttcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcagggccagaacca gctctacaacgagctcaatcttggtcgggaggaggagtacgacgtgctggacaagcgcgaggag gacccggaccccgagatgggcgggaagccgcgccagaaagaactcccaggaggcctgtacaac

gagctccaaaaggatcagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggcacgcag agagcggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-14 AA	1209	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGPIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSAR YVTDAPTAGGVKVYLSIIEPSFSDNSQSNDSQTGDNQTGSNSGREENPSETSTQGIDVEM GETPAAENTQEGLYIPQLKSRKSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	
scFv hzCAR123-14	1210	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-14 VH	1211	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-14 VL	1212	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNEYPYTFGQGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-15 NT	1213	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACCA TTACTTGCCGCGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGAC CAGGCCCTAAGCTCTTGATCTACTCGGGGTCCACCCTTCAAATCGGGAGTGCCATCGCGGTT TAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATG CCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAACGAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAA GTGGAGATCAAGGCGGCTGGCGGTAGCGGAGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGTGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAACTGGTGCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCGGGAGCCTCC GTCAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCGGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGC CAGGCACCTGGACAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGCTTTGTGTTCTCCCTGGACAAGTCCGTGTCCACCGCCT ACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCGGAGGATACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGAAAC TGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCGCCAGCACCAAGGGCCC GATGCCACCCACCCCGGCTCTACATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGAggcat gtagaccgcagctggtgggccgtgcataccccgggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggccccttggcttgtacttgcgggtcctgctgctttcactgtgatcactatttta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggcctgtgc agactacttcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaaccc gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggaccccgaaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggggcctgtacaac gagctccaaaaggacaagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcag aaggggcacgatggccagggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctaty acgctcttccacatgcaggccctgcgccctcgg	
hzCAR123-15 AA	1214	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGAGSGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSPTTPAPPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	
scFv hzCAR123-15	1215	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGAGSGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-15 VH	1216	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-15 VL	1217	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPFTFGQGTKVEIK
hzCAR123-16 NT	1218	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTAGGCC CGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACTCACTGGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGAACA TCAACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGA CAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTT CTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCGTCGCTGCAAGCCGAAGATG TGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAG GTGGAAATCAAACGGGGTGGCGGTAGCGGAGGCGGCTCCGGCGGCGGCTCAGGCGG CGGAGGAAGCCAAGTGCAGCTGGTCCAGTCAGGCAGCGAACTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCG TCAAAGTGTCCTGCAAAGCCTCTGGCATACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCCGC CAGGCACCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGAAGGATCGATCCCTACGATTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAGTTCAAGGACCGGTTTGTGTTCTCCGTGGACACGTCCGTGTCCACCGCCT ACCTCCAAATTAGCAGCCTGAAGGCCGAGGACACAGCTGTCTACTACTGCGCTCGCGGAAAC TGGGATGACTATTGGGGCCAGGGAACTACCGTGACTGTGTCCTCCGCCAGCACCAAGGGCCC GAGCGTCTTCCCACTGGCTCCCTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCT GTCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTCGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTAAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGCGACT CTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG GAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCG TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAAT GGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCAC GTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTG CTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCG CCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTT GTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTT TGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTT AACAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCC TATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGAT AAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGG CCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGT CGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTC TAAACGAACGGTTTGGTTGGACCGTCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATAC CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC TCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA TCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGC CGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATA TTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAA CCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAG AATTCGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT GTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAA AGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG CCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG GAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG TCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAA TCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAA AAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATC GACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTT TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT AGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCC TTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGT GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCA GTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG TGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAA TCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA TCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTA CGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCAC CGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTG CAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGC CAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGT TTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGT TGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCA GTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGA TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC GAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT GCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGAT CCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCG TTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGG AAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGT CTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACA TTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAA AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAG GCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCA GCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGC TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAA AGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC GCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTG CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTC ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC CCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGT AGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC GGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTT AAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTA CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGC CTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGC AATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTAC AGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATC AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGAT CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTC TCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATT CTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGC GCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTC AAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTC AGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAA AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTG AAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAT TATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGG ATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG CCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCC AGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGT TTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCT GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAA CGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGT TGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG TGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAA GCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCA AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGA TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT ACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGC AGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA CGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTT CACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATC TGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAAT AAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCC AGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAAC GTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGC TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGC TCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATG GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAG TACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCA ATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCT TCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT GCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGA AGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTC CTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA TGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAC GTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTT CGTCTTCAAGAATTCGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATG GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGG AAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG CTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG CGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGC GCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCC ACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACA AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTC CCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCG CCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGG TGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGC GCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA GTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG TGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAA TCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA TCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTA CGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCAC CGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTG CAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGC CAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGT TTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGT TGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCA GTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGA TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC GAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT GCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGAT CCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCG TTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGG AAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGT CTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACA TTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAA AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAG GCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCA GCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGC TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAA AGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC GCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTG CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTC ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC CCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGT AGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC GGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGA AAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTT AAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTA CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGC CTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGC AATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTAC AGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATC AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGAT CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTC TCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATT CTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGC GCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTC AAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTC AGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAA AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTG AAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAT TATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCGG ATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG CCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCC AGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGT TTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCT GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAA CGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGT TGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG TGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAA GCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCA AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGA TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT ACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGC AGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA CGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTT CACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCG TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATC TGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAAT AAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCC AGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAAC GTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGC TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGC TCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATG GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAG TACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCA ATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCT TCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT GCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGA AGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTC CTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA TGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAC GTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTT CGTCTTCAAGAATTCGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATG GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGG AAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG CTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG CGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGC GCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCC ACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACA AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTC CCCCTGG

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		WGNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRPVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-16	1220	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY WMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-16 VH	1221	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-16 VL	1222	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-17 NT	1223	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGCATCA GCTGCAAGGCAAGCGGCTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGGCAGATGCCC GGAAAGGGCCTCGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTCGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGT GGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAACTGGCATGAT TACTGGGGACAGGGAACACCGTGACTGTGTCCTCCGGCGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGCGG CTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGTGGAGGAGGAAGCGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCTCTAT TTCTGTCGGCCTCAGTGGAAGACAGAGTGACCATTACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGG GTCGACCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGCTTCTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCA CCCTTACTATTCTCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAAC AAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAGGTCGAAATCAAGACCACTACCCCAGCACC GACGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGAggcat gtagaccgcagctggtgggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggctggtacttgcgggggtcctgctgtttctactggtgatcactctta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggccgtgc agactacttcaaggaggaggacggctgttcatgccggtttccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgccgcgcgtacgagatgcctccagccttacaagcagggccagaaccag gctcttacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgcttgacaagcggagag gacgggaccctgaaaatgggcggcaagccgcgcagaaggaatccccaagaggggccttgtacaac gagctccaaaaggatkagatggcgaggcgtacagcgaggttgatgcgaaggggcgacgcag aaggcgcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-17 AA	1224	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSYLAASVGDEVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC
		SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-17 scFv	1225	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MDGRGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWLDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDEVTITCK ASQSIGTDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKVPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-17 VH	1226	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-17 VL	1227	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKVPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-18 NT	1228	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAAGATCA GTTGCAAGGGCAGCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCC GGAAAAGGCCTGGAGTGGATGGGCATCGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAACCCA AAGTTCCAGGATCACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGT GGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCCATGTACTACTGCGCCAGCGGCAACTGGGATGAT TACTGGGGACAGGGCACCACCGTGACCGTGTCCTCCGGCGGTGGCGGTAGCGGCGGAGGCGGC CTCGAGGGCGGCGGCTCAGGCGGTGGAGGAAGCGAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGCGGAA GCCTGATCCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCCTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCAGC AAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCGGCAGGCTGCTGGACCTACTCCGG CTCCACCGGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCCAGATTTTCCGGTTCCGGGTCCGGGACTGACTTCA CCTTGACCATTAGCTCCCTGCAACCTGAAGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAC AAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAAGTCGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACC GAGGCCACGCCAACCCCGGCTCGTACCATCGCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGCAGgcat gtagaccgccagctggtgcgggccgtgcatacccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgtcttcacttgtgatcactctttc ctgtaagcggcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggatggctgttcatgccgtttccgagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgcccagcctacaagcagggccagaaccca gctctacaacgagctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgtggacccagaaaccgggcgggaagccgcgcagaagaatcccaagaggggcctgtacaac gagctccaaaaggatagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaaacgcag aagaggcaaaggccacgacgggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-18 AA	1229	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGSSLKISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDGYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-18	1230	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGSSLPISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDGYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-18 VH	1231	EVQLVQSGAEVKKPGSSLKISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-18 VL	1232	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-19 NT	1233	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCCTGAGCATCA GCTGCAAGGCAAGCGGCTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGATGCCC GGAAAAGGCCTGGAATGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGTACCTCCAGT GGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCCACGCGGAAACTGGGATGAT TACTGGGGACAGGGAACAACCGTGACTGTCTCCTCCGGGGGTGGCGGCTAGCGGAGGAGGCGG CTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGCGGAGGAAGCGACATCGTGATGACCCAGTCACACGGCAT TCCTGTCCGTGACTCCGGAGAAAAGGTCACGATTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTGGCTGGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCCCCTAAGCTGTTGATCTACTCGGG GTCCACCCTTCAATCGGCAGTGCCATCGCGGTTTAGCGGTTCGGGTTCTGGGACCGACTTCA CTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAAC AAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACC GAGCCCACCCACCCCGCCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGAAggcat gtagaccgcagctggtgggccgtgcatacccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggccctctggctggtacttgcgggggtcctgctgtttctactgtgatcactctta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaagcggcggctgc gaactgcgggtgaaattcagccgcagcgcagatgcccgcgtacaagcagggccagaaccca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggaggtatgacgtgctggacaagcgggagag gacgggaccctgaaatgggcggaagccgccgcagaaagaatcccccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggatgaggtggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggcgaacgcgg aaggcgcacgatggcctgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg	
hzCAR123-19 AA	1234	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDGYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISFDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	
scFv hzCAR123-19	1235	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDGYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR	

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPLTFGGGTKVEIK
hzCAR123-19 VH	1236	EVQLVQSGAEVKKPGSSLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYRQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-19 VL	1237	DVVMTQSPASLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNKYPLTFGGGTKVEIK
hzCAR123-20 NT	1238	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGCAATCCCTGAGGATCA GCTGCAAAGGCAGCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGGCAGATGCCC GGAAAAGGCCTGGAGTGGATGGGAAGGATTGACCCCTACGACTCTGAAACCCATTACAACCA GAAGTTCAAGGATCACGTGACCATTTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCCTACCTCCAGT GGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCCAGGGGAAACTGGGATGAT TACTGGGGACAGGGAACAACCGTGACTGTGTCCTCCGGCGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGC GTCCGGCGGCGGCTCAGGCGGCGGAGGCAAGCGACGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGACT CACTCGCGGTGTCGCTTGGAGAGAGAGCGACCATCAACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATTCAGC AAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGC GTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTTCACGGTTCTCCGGATCCGGGTCCGGTACCGACTTCA CGCTCACCATTTCGTCGCTGCAAGCCGAGACATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAAC AAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGACGACTACCCCAGCACC GAGGCCACCCAGCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcac gtagaccgcagctggtgggccgtgcataccgyggtcttgacttcgccctgcgatatctac atttgggcccctctggctggtactgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgtgtacatctttaagcaaccctttcatgaggccgtgc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggaccctgagaatgggcgggaagccgcgcagaagaatcccccaagaggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgatgggactgtaccagggactcagtaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-20 AA	1239	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGSSLKISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-20	1240	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGSSLPISCKGSGYTFTSYWMNWVRQ MPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-20 VH	1241	EVQLVQSGAEVKKPGSSLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDRVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-20 VL	1242	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-21 NT	1243	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCTTCATTCCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGCCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA AAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGGGTCGACCCTGCAATCTGGAGTCCCTTCCCGTTT CTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCACCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCGGAGGACT TCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAG GTCGAAATCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGTGGCTCCGGCGGCGGCTCACAGGTG CAGAGCAAGCAGCTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCC TGAGGATCGCCTGCAAAGCCAGCGGGTATACCTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTCCGC CAGATGCCCGGAAAAGGCCTCGAGTGGATGGGACGCATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGT ACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCCAGCGCGAAAC TGGGATCGTTACTGGGACACGGAACGACCGTGACTGTGTCCTCCACCACTACCCCAGCACC GAGCCTACCCCACCCCGGCCTCCTACATCGCCTCCCAGCCTCTTGTCCCTGCGTCCGCGAggcst gtagacccgcagctggtgggcgccgtgcatacccgggggtcctgacttcgccctgcgatatctcc attttgggcccctctggctggtacttgcgggtccttgctttcactcgtgatcactctttta ctgtaagcggcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggccgtgcc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgggtgaaattcagccgcagcgcgagatgcccagcctacaagcagggtcagaaccag gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggaccctgaaatgggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaggaggcctgtacaac gagctccaaaagggataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggcgaacgcag aaggcgcacgatggccacgaccggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgcccctcgg
hzCAR123-21 AA	1244	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG QGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDYWGQGTTVTVSS
scFv hzCAR123-21	1245	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFG QGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDYWGQGTTVTVSS

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-21 VH	1246	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-21 VL	1247	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPFTFGQGTKVEIK
hzCAR123-22 NT	1248	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTCGTGCTGACCCAGTCGCCGGCAACCCTCTCTCTGTCGCCGGGCGAGAAGGCGCCACTC TTTCCTGTCGGCGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGT CAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACTCCGGCTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATT TTCCGGTCGGGGCTCGGGACTGACTTCACCCTTGACATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACT TCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAACGAGTACCCGTACACCTTCGGACAGGGCGTAC TAAG GTCGAGATCAAACGGGGTGGCGGCTCAGGCGGAAGCGGAGGCGGCTCCGGCGGCGGCTCACAGGTC CAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAG GCATCTGGATACACCTTCACCTCCTACTGGATGCACTGGGTGCGC CAGATGCCCGGAAAAGGCCTGGAGTGGATGGGCAGGATTGACCCCTACGACTCTGAAACTCAC TACAACCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGT ACCTGCAGTGGTCAAGCCTCGACGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACAACCGTGACTGTGTCCTCCGCCTCCACTAAGGGCCCC GAGGCCACCCTACCCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtagaccggcagctggtgggggcgtgcataccgggggtcbtgacttcgcctgcgatatctac atttgggccccttctggctggtacttgcgggggtcctgctgtttcactggtgatcactctta ctgtaargcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctttatgaggcctgtgc agactacttccaggaggaggcggctgttcatgccggttccgaggaggaggatggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgcccgcctacaagcagggtcagaaccca gctctacaacgaactcaatcttggtcgtagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagag gacgggaccctgaaatgggcggaagccgccgcagaaggaatcccccaggagggtctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcggaggcctatagcgagattgggatgaaggggaacgcag aaggcaaggccacgatggacgtgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgcccctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
scFv hzCAR123-22	1250	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKDISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMHWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYSQKFKDKVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-22 VH	1251	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMHWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYSQ KFKDKVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-22 VL	1252	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISNDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-23 NT	1253	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACCA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGAC CAGGCCCCTAAGCTGTTGATCTACTCCGGCTCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGGTT TAGCGGTTCCGGCTCTGGAACCGACTTCACTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATG CCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAACGAGTATCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACCAAA GTGGAGATCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCACAGGC CGGAGGAAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCTGAAGCTGAAGCCTGGAGCATCCGT TGAAGATCAGCTGCAAAGCCAGCGGGTATACTTTCACCTCCTACTGGATGAATTGGGTGCGC CAGATGCCCGGAAAGGGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCCTACGACTCGGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGATCACGTGACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGT ACCTTCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACGCGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGACAGGGAACAACCGTCACTGTGTCCTCCACCACTACGCCAGCACC GAGGCCACGCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCCGAGgcat gtagaccgcgctgctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggctggtacttgcgggtcctgctgcttctcactgttatcactttatta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggccgtgca agactacccaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaagcggcggctg gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgccgatgctccagcctaccaagcagggccagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgccgaga gacgggcccgaaatgggcggcggaagccgccgcagaaagaatcccccaagaggggcctgtacaac gagctccaaaagggtaagatggcggaggcctatagcgagattgggtatgaaaggcgaacgcgg aaggacgcctttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-23 AA	1254	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-23	1255	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-23 VH	1256	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-23 VL	1257	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIKSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-24 NT	1258	ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCCAGGCC GGAGGTGGTCATGACTCAGTCCCCGGCCTTCCTCAGTGTGACTCCTGGAGAGAAAGTCACCA TCACCTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGCAAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGA

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		CAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGGGTCCTACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTT CTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCGTCGTTGCAAGCCGAAGATG TGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTGGCGGAGGCACCAAG GTGGAAATCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGG CGGAGGAAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCTGGAGAATCCC TGAAGATCAGCTGTAAAGGCAGCGGGTATAGTTTCACCTCCTACTGGATCAATTGGGTCCGC CAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGACGGATTGACCCTACGACTCGGAAACCCA TTACAACCAGAAGTTCAAGGATCACGTCACCATCTCCGTGGACAAGTCCATTTCCACTGCGT ACCTCCAGTGGTCAAGCCTGAAGGCCTCCGACACTGCTATGTACTACTGCGCACACGCGAAAC TGGGATGATTACTGGGGACAGGGAACACCGTGACTGTGTCCTCCACCACTACGCCCAGCACC GAGGCCACCCCACCCCGCCCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtagaccgcagctggtgggcgtgcataccgggctcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcgccctcgtggctgctactgcgtgggtcctgctgcttctcactcgtgatcgactctcta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggccgtgcc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaggaagcgggctgc gaactgagcgtgaaattcagcgccagcgccgagctgctccagcctaacaagcagggcgaacga gctctacaacgaactcaatcttggtcgggagaggaggagtacgacgtgctgggacaagcggaga gacgggaccccgaaatgggcgggaagccgcgccgaaaggaatcccaagaggggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcgaggcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgatggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

hzCAR123-24 AA	1259	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGLVHT RGLDFACDIYIWAPLAGICGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-24	1260	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSY WMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-24 VH	1261	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQ KFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-24 VL	1262	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-25 NT	1263	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGCAGCTCGTCCAGAGCGGAGCCGAACTGAAGAAGCCTGGAGCTGT CCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGACAGGCACCT GGAAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGCCATTGACCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAATCA GAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAA TGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAACTGGGATGAT
		TACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTGTCATCCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGCGG CTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGCGGCGGAAGCGACATCGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCAT TTCTGTCGGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCATTACTTGTCGGGCCTCCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGG GTCGACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTTCTCCGGTTCGGGAAGCGGTACCGAATTCA CCCTTACTATCTCTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAAC AAGTACCCGTACACTTTCGGGGGTGGCACGAAGGTCGAAATCAAGACCACTACCCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtagaccgcgcagctggtgggcgcgtgcataccagggctcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcgcctctggctggtacttgcggggtcctgctgttctcactgtgatcactctttc ctgtaagcgcggtcggaaaaagctgttacatctttaagcaaccctttatgaggccgtgc agactaccgaggaggaggacggctgttcatgcgcggttccgaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcagggtcagaacca gtctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgggaga gacgggacccagaaatgggcgtggaagccgccgccgaaagaatccccaagaggggcctgtacaac gagctccaaaagaagataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgcgcccctcgg
hzCAR123-25 AA	1264	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLEWVSEIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEGGGGDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
scFv hzCAR123-25	1265	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWLDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-25 VH	1266	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-25 VL	1267	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-26 NT	1268	ATGGCGCTGCCGGTGACCGCGCTGCTGCTTCCGCTGGCGCTGCTTCATGCTGCCAGGCCGGTGGGCC CGAAGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGACTGGTGCAGCCGGGAGGAAGCCTGAGGCTGT CCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGACAGGCACCT GGAAAGGGACTGGAGTGGGTGTCCCGCATTGACCCTTACGACTCCGAAACCCATTACAATCA GAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCCTGTACCTGCAAA TGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGCAACTGGGATGAT TACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTGTCTATCCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCGGGCGGCGGTGGCTCAGGCGGCGGAGGAAGCGAAGCTGTGCTGACCCAGTCGCCCGCAA CCCTCTCTCTGTTCGCCGGGGAAACGGCCACTCTTTCCTGTCGGGCGTCCAAGACGATCGTA
		AAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGTCAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACTCCGGC CTCCACGTGGAATCAGGAATCCCAGCCAGATTTTCCGGTTCGGGGTCGGGGACTGACTTCA CCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACAAC AAGTACCCGTACACGTTCGGAGGCGGTACTAAAGTCGAGATCAAGACCACTACCCCAGCACC GAGGCCACCCCACCCGTGCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtagaccagcagctggtgggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac attgggcccctctggctggtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactatttc ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggcctgtgc agactacttcaagaggaggacggctgttcatgcgctggttccagaggaggaggaggaagcgggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccaagcagggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgggagag gacgggaccccagaaatgggcggcgaagccgccgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaac gagctccaaaagaagatgagatggcagaagcctatagcgagattgggatgaaaggcgagcgcag aggaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-26 AA	1269	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDFYDSETHYWQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKRLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-26	1270	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDFYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-26 VH	1271	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDFYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-26 VL	1272	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-27 NT	1273	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGCGGACTGGTCCAGCCCGGCGGAAGCCTGAGGCTGT CCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGACAGGCACCT GGAAAGGGACTGGTCTGGGTGTCCCGCATTGACCCCTACGGCAGCTCCGAAACCCATTACAATCA GAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGTACCTCCAAA TGAACTCCCTGCGCGCTGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAACTGGGATGAT TACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTGTCATCCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGCGG CTCCGGAGGCGGCGGCTCAGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCAT TCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAGAAAGTCACCATTACTTGCCGGGCCTCCAAGAGCATCTCC AAGGACCTGGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGACCAGGCTCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGGC GTCCACCCTTCCAATCGGGAGTGCCATGCCGTTTAGCGGTTCCGGTTCTGGGACCGACTTCA CTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACGACAAC

Nombre	SEQ ID	Secuencia
		AAGTATCCGTACAGCTTCGGAAGGCGGTACCAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCCAGCAACC GACGCCACCCTACCCCGCCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtagaccgcagctggtgggggcagtgcacaaccgggtcttgacttcgcctgcgatatctac attfgggcccctctggctggtacttgcgggggcctgctgctttcactcgtgatcactctttа ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaaagcaaccctticatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaacca gctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgcrggacaagcggagag gacgggacccgagaatgggcgggaagccgccagaagaatcccaagaggggcctgtacaac gagctccaaaagatgataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaagggacgcag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-27 AA	1274	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVPQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKPGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
scFv hzCAR123-27	1275	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVPQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCR ASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-27 VH	1276	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-27 VL	1277	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-28 NT	1278	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCTCTGGCTCTTCATGCTCCAGCCGCTCGGCC CGAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGGCGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTGAGGCTGT CCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGACAGGCACCT GGAAAGGGACTGGTCTGGGTGTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCATTACAATCA GAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCTGCGTACCTCCAAA TGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTCTACTATTGCGCCCGCGGGAAACTGGGATGAT TACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTCTCATCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGG CTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGCGGCGGAGGAAGCGACATTGTCATGACTCAGTCCCCGGACT CACTCGCGGTTTCGCTTGGAGAGAGATCGACCATCAACTGTCGGGCCTCAAAGAGCATCAGC AAGGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGCCGCCAAAGCTGCTGATCTACTCCGG GTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTTCTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCA CGCTCACCATTTCGTCGCTGCAAGCCGAAGATGTGGCCGTGTACTATTGCCAACAGCACAAC AAGTACCCCTACACTTTTGGCCGGGGCACCAAAGTGGAAATCAAACGCACTACCCCAGCAGC GAGGCCACCCACTCCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAggcat gtagaccccgcagctggtgggcgctgcatacccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctac
		attttgggcccctctggctggtactgcgggggtccagctgctttcactcgtgatcactctttc ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggaggcggctgttcatgccggttccagaggaggaggaagcgcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaaccag gctctatgacgagctcaatctaggtcggagagaggaggatacgacgtgctggacaagcgcgagag gacgggaccctgagaatgggcgggaagccgcgcagaagaactcccaggaggcctgtacgag gagctcccgaaggataagatggcgaggcctatagcgaggattgggatgcgaggggagcgcag gagaggcgacaaggccacgacggactgtaccagggactcagcgccgccaccaaggacacctatg acgctcttccacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-28 AA	1279	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSYTNYADSVKGRFTISVDKAKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARR WKDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCK ASKSISFDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQSNKYPYTFGGGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKPGPKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
scFv hzCAR123-28	1280	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQ APGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG NWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCR ASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-28 VH	1281	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ FFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-28 VL	1282	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK
hzCAR123-29 NT	1283	ATGGCCCTGCCTGTGACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGCAGCTCACCCAGTCGCCCTCATTTCTGTCGCCTCAGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACTTGTCGGGCCTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGA AAGGCGCCTAAGTTGCTCATCTACTCGGGGTCCACCCTGCAATCTGGCGTGCCGTCCCGGTT CTCCGGTTCTGGCAGAGGCGGTACCGAATTCACCCTTACTATCTCCTCCCTGCAACCCGAGGACT TCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAACAAGTACCCGTACACTTTCGGCGGCGGCACGAAG GTCGAAATCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGCGG CGGAGGAAGCGAAGTGCAGCTCGTCGAGACCGGAGGCGGACTGCTGCAGCCCGGCAGGAAGCC TGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGA CAGGCACCTGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCTCGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACGCA TTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGT ACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACCGTGTCATCACCACTACCCCAGCACC GAGCCAACCCACCCGGCTCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTGCCGAggcgc gtagaccgcgcagctggtgggcgtgcatacccgggctcttgacttcgcctgcgatatctac atttggcccctctggctggtacttgcgggggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttta ctgtaagcgcggtcggcaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtgc agactacttcaagaggaggacggctgttcatgccggtttccagaggaggaggaaggcggctgc
		gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctaccagcagggcagaaccag gctctacaacgagctcaatctaggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgccgaag gacgggaccctgagaatgggcggcgaagcgccgccagaaaggaatcccccaagagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgccag aagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgccttccatatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-29 AA	1284	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCSRGRKFLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
hzCAR123-29 scFv	1285	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQK PGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-29 VH	1286	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-29 VL	1287	DVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPYTFGGGTKVEIK

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-30 NT	1288	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGAAGTGGTGCTGACCCAGTCGCCCGCAACCCTCTCTGTGTCGCCGGGAGAACGCGCCACTC TTTCGTGTCGGGCGTCCAAGAGCATCTCAAAGGACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGT CAAGCCCCGCGGCTGCTGATCTACTCCGCTTCCACGCTGCAATCAGGAATCCCAGCCAGATT TTCCGGTTCGGGGTCGGGAGCTGACTTCACCTTGACCATTAGCTCGCTGGAACCTGAGGATT TCGCCGTGTATTACTGCCAGCAGCACTACGAGTACCCGTACACCTTCGGAGGCGGTACTAAG GTCGAGATCAAGGGCGGCTGGCGGTAGCGGAGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGCGG CGGAGGAAGCGAAGTGCAGCTCGTCGAGAGCGGAGGCGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGC TGAGACTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTACGAGTTCACCTTCTACTGGATGAACTGGGTCAGA CAGGCACCTGGAAAGGGACTGGAGTGGGTGTCGGCATTGACCCTTACGACTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGT ACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAAC TGGGACGATTACTGGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTGTCAPCCACCACTACCCCAGCACC GAGGCCACCCACCCCGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTGAGgycat gtagaccgcagcctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctac atttgggcccctctggctggtacttgcgggtctccgctgcttttcactctgtgatcactctta ctgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtatcatttaagcaacccttcatgaggcctgtgc agactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggccagaaccag gttctacaacgaactcaattcgtcggagagaggaggagtacgatgtgctggacaagcggagag gacggggacccagaaatggcggcggaagccgcgcagaaagaatcccaggagggcctgtacaac
		gagctccaaaaggatagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcag aaggcaaaggacacgaccgactgttaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
hzCAR123-30 AA	1289	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSDTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-30 scFv	1290	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQK PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFG QGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ NFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-30 VH	1291	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ NFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-30 VL	1292	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGQGTKVEIK
hzCAR123-31 NT	1293	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCACTCTTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTCGTGATGACCCAGTCACCGGCATTCCTGTCCGTGACTCCCGGAGAAAAGGTCACGA TTACTTGCCGGGCGTCCAAGAGCATCTCCAAGGACCTGGCCTGGTACCAACAGAAGCCGGAC CAGGCCCCTAAGCTGTTGATCTACTCCGGGATCCACCCTTCAATCGGGAGTGCCATCGCGTT TAGCGGTTCCGGGTCTGGGACCGACTTCACTTTCACCATCTCCTCACTGGAAGCCGAGGATG CCGCCACTTACTACTGTCAGCAGCACAACAAGTATCCGTACACCTTCGGACAGGGGACCAAA GTGGAGATCAAGCGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCTCAGGCGG CGGAGGAAGCGAAGTGCAGCTCGTGGAGAGCGGAGGCGGACTGGTGCAGCCCGGAGGCAGCC TGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGA CAGGCACCTGGAAAGGGACTGGTCTGGGTGTCCCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGT ACCTCCAAATGAACTCCCTGCGGGCTGAGGACACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGGGGAAAC TGGGATGATTACTTTGGGCCAGGGAACTACTGTGACTGTCTCATCCACCACTACCCCAGCACC GAGGCCAGCCACACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCCAGCCCTCCGTCCATCCGCAGGaggcac gtagcccgcagatggtgggcgtgcatacccgggctcttgactccgcctgcgatatctac attttggccctctggctggtacttgcgggtcctgctgtttctactcgtgatcactctttt ctgtaagcgcggtcggaagaagcctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggccgtgca agactactccaagaggaggacggctgttcatgccggtttccgagaggaggaggaaggcggctgc gaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgccgatgctccagcctacaagcagggccagaaccag gtctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgccgaggg agacgggaccccgagaaatgggcggcgaagccgcgcgagaaaqaatcccccaggagggcctgtacaac gagctccaaaaggataagatggcggaggcctacagcgagattgggtatgaaaggggaacgcag aagaggccaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgccctccacatgcaggccctgccgcctcgg

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-31 AA	1294	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	
scFv hzCAR123-31	1295	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQK PDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-31 VH	1296	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-31 VL	1297	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQHNEYPYTFGQGTKVEIK	

Nombre	SEQ ID	Secuencia
hzCAR123-32 NT	1298	ATGGCCCTGCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC CGACGTGCTCATGACTCAGTCCCCGGACTCACTCGCGGTGTCGCTTGGCGAGAGAGCCACCA TCAACTGCCGGGCCTCCAAGAGCGTCAGCACAGGCGACCTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCGGGA CAGCCGCCAAGCTTGCTGATCTACTCCGGGTCCACCTTGCAATCTGGTGTCCCTGACCGGTT CTCCGGTTCCGGGTCGGGTACCGACTTCACGCTCACTATTTCGTCGCTGCAAGCCGAAGATG TGGCGTTTACTATTGCCAACAGCACAACAAGTACCCCTACACTTTTGGCGGAGGCACCAAG GTGGAAATCAAGGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGAGGGGGCTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGCGG CGGAGGAAGCGAAGTGCAACTCGTCGAGAGCGGGGGCGGACTGGTGCAGCCCGGGAGGAGCC TGAGGCTGTCCTGCGCTGCTCCGGCTACACCTTCACCTCCTACTGGATGAACTGGGTCAGA CAGGCACCTGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTGGCGCATTGACCCCTACGACTCCGAAACCCA TTACAATCAGAAATTCAAGGACCGCTTCACCATCTCCGTGGACAAAGCCAAGAGCACCGCGT ACCTCCAAATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGCCCGCGGAAAC TGGGATGATTACTGGGGCCAGGGAACCACTGTGACTGTGTCAAGCGCCAGCACAAAGGGCCC SAGCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTG CCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGT GACCGTGCCCTCCTCCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTC CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCC TTGCCCTGCCCCGAACTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGAC CCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCCATCGAG AAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGG CAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGTCCCCCGGCAAGTGA
hzCAR123-32 AA	1299	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSDYSYMHWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPYTFGG GTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY
		MRWSCIILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
		MWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYVTDAPGMEMGKDEFIRLKSNIEDAELGPRRMKPETFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV

Nombre	SEQ ID	Secuencia
scFv hzCAR123-32	1300	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQK PGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFG GGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSY WMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDRAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-32 VH	1301	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQ KFKDRFTISVDRAKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS
hzCAR123-32 VL	1302	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK

Las secuencias de las secuencias de CDR humanizadas de los dominios scFv de CAR 1-32 hzCD123 se muestran en la **tabla 26** para los dominios variables de cadena pesada y en la **tabla 27** para los dominios variables de cadena ligera. "ID" representa la SEQ ID NO respectiva para cada CDR.

Tabla 26. CDR del dominio variable de la cadena pesada

	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	CDR3H	SEQ ID NO:
hzCAR123	GYTFTSYWMN	1102	RIDPYDSETHYNQKFKD	1103	GXWDDY	1104

Tabla 27. CDR del dominio variable de cadena ligera

	CDR1L	SEQ ID NO:	CDR2L	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
hzCAR123	RASKSISKDLA	1105	SGSTLQS	1106	QQHNKYPYT	1107

En algunos casos, el CAR123 tiene una HCDR3 que tiene la secuencia

YCARGNWDDY (SEQ ID NO: _).

Los fragmentos de scFv CAR se clonaron a continuación en vectores lentivíricos para crear una construcción de CAR completo en un único marco de codificación, y se utilizó el promotor EF1 alfa para la expresión.

Construcciones biespecíficas CAR19/CAR22 y su función

Esta sección describe la producción y la función de construcciones CAR19/CAR22 biespecíficas. Se diseñaron dos fusiones biespecíficas de scFv en tándem: antiCD22 (HL)4G4S-antiCD19 (LH) y antiCD19-4G4S-antiCD22. La designación (HL) indica que la región variable de cadena pesada está cadena arriba de la región de cadena ligera dentro del scFv indicado y la designación (LH) indica que la región variable de cadena ligera está cadena arriba de la región de la cadena pesada dentro del scFv indicado. La molécula de base anti-CD22 es hCD22-2 y utiliza la orientación HL. La molécula base anti-CD19 es una secuencia anti-CD19 humanizada, proporcionada aquí como ID de construcción 104876 de la Tabla 2, que utiliza la orientación LH. Las construcciones se ilustran esquemáticamente en la FIG. 13.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de ambas construcciones biespecíficas, así como las porciones scFv de las mismas, se detallan a continuación en la Tabla 28.

Tabla 28. Construcciones CAR19/CAR22 biespecíficas

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
Secuencia de aminoácidos de scFv antiCD22-4G4S-antiCD19	1303	EVQLQQSGPGLVRPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEW LGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYY CARDLGWIAVAGTFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSER PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSINHVFGTG TKVTVLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLS CRASQDISNYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGG GSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEW IGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA KHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS	
Secuencia de aminoácidos de CAR antiCD22-CD19	1304	EVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEW LGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYY CARDLGWIAVAGTFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP ASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSER PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSLMHVFGTG TKVTVLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLS CRASQDISKYLNWYQQRPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDY TLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGG GSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEW IGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA KHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPATTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	
Secuencia nucleica de scFv antiCD22-4G4S-antiCD19	1305	gaagtgcagctccaacagtcaggaccaggactcgtcaaaccctcccaaa ccctcagccttacttgtgccatttccgggattccgtgtctgagcaattc cgccgcctggaactggatcaggcagtcccctgtgcgcgggctcgaatgg	

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
		ctggacgcacttactaccggtccaagtggtacaacgactacgccgtca gcgtgcagtccgcggatcaccattaacccggacacctccaagaaccagtt cagcctccaactgaaatccgtgacccctgaggataccgcggtctactat tgtgcccgggacctgggttgyattgccgtggccgggaccttcgattact ggggccagggaactctcgtcaccgtgtcctcgggagggggtggctcagg gggtggtggatcgggtggtggcggctcccagtccgcttctgactcagccc gcgtccgtgtccggttcccgggacagtcgatcaccatcagctgcactg gcacctcctccgacgtcggcggtacaactacgtgtcgtggtaccaaca gcaccctggaaaagcccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaagagg ccaagcggagtgtccaatcgcttttccggctccaagtcgggaacaccg ccagcctgactatctcgggactgcaggccgaggacgaggccgactacta ctgctcgtcttacacatcctcatcctgtgtaccgtgttcggaacggga accaaggtcaccgtgctgactggaggggagggctccggtggcggcggct ctggaggaggagggtccggcggaggaggatcggaaatcgtgatgaccca gtccccgcaaccctgtccctgagcccgggcgaaagagctaccctgtcg tgccgggcgtcgcaggacatctccaagtaccgtgaactggtaccagcaga agccaggccaggcaccgcgactgctgatctaccacactagccgcctgca ttccggtatccccgcacggttcagcggcagcgggagcggaaccgattac acgctcactatttcctcactgcaacccgaggatttcgctgtgtacttct gccaacaaggaaacaccctgccttataccttcggacagggtacaaagct ggagattaaggcaggaggaggtggctccggcggcggggcagcgggtggcggc ggaggccaggtccagctgcaggaatccggtccgggactcgtgaagccct ccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtcaggggtgtccctgccgga ctacggagtgtcctggattcggcaacctccggggaagggactggagtgg atcggagtgatctgggctccgaaactacctactaccagtcatcattga agtcaagagtgaccatttcgaaggacaacagcaagaaccaggtgtccct taaactgtccagcgtgaccgcgtggatactgccgtctactactgcgcc aagcactattactacggcggaagctatgcgatggactactgggacagg gcaccttggtcactgtgtcctcc

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
Secuencia de ácido nucleico de CAR antiCD22-CD19	1306	gaagtgcagctccaacagtcaggaccaggactcgtcaaaccctcccaaa cctcagccttacttgtgccatttccgggggattccgtgtcgagcaattc cgccgcctggaactggatcaggcagtcccctgtcgccgggctcgaatgg ctgggacgcacttactaccggtccaagtggtacaacgactacgccgtca gcgtgaagtccgcggatcaccattaaccccgacaccttccaagaaccagtt cagcctccaactgaactccgtgacccctgaggataccgcggtctactat tgtgccccgggaccctgggttggattgccgtgggccgggaccttcgattact ggggccagggaaccttcgtcaccgtgtcctcgggaggcggtggctcagg gggtggtggatcgggtggtggcggctcccagtccccgctctgactcagccc gcgtccgtgtccggttcccccgggacagtcgatcaccaatcagctgcactg gcaccttctccgacgtcggcgggtacaactacgtgtcgtggtaccaaca gcacctggaaaagcccccgaaggctgatgatctacgacgtgtccaagagg ccaagcggagtgtcaaatgctttttccggctcgaagtcgcggaaacaccg ccagccctgactatctccgtgactgcaggccgaggacgaggccgactacta ctgctcgtcttacaccttcttcatcttgaaccacgtgttcggaaccgga accaagctcaccgtgctgactggagggtgaggctccggtggcggcggct ctggaggaggaggtcccggcggaggaggatccggaaatcgtgttgacccca gtccccctgccaaccctgtccctgagccctgggtgaaagagctaccctgtcg tgccgggcgtccgcaggacatctccaagtacctgaactggtaccagcaga agccccggccaggcaccgagactgctgatctaccacactagccgcctgca ttccggtatccccgccacggttcagcggcagcgggagcggaacgattac acgtcactatttcctcactgccaacccgaggatttgctgtgtacttct gccaacaaggaaacaccctgccttatacctttcggacagggtacaaagct ggagatcaaggtgaggagtgggtctccggcggcgtgggtgcagccgggcggc ggaagccaggtccagctgcaggaatccggtccgggactcgtgaagcct ccgaaactctctccctcacgtgcaccgtgtcaggggtgtccctgccgga ctacggagtgtcctggattcggcaacctccgggaagggactggagtgg atcggagtgatctgggtctccgaaactacctactaccagtcatctttga agtcaagagtgaccatttcgaaggacaacagcaagaaccaggtgtccct taaactgtccagcgtgaccgccgtggatactgccgtctactactgcgcc aagcactattactacggcggaagctatgccgatggactactgggggacagg gcaccttggtcactgtgtcctcaccactaccccagcaccgaggccacc
		cacccggctcctaccatgcctcccagcctctgtccctgcgtccggag gcatgtagaccccgcagctggtgggccgtgcatacccgggggtcttgact tcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcgggct cctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtgaagcggtcggaaag aagctgctgtacatctttaagcaaccctttcatgaggcctgtgcagacta ctcaagaggaggacggctgttcatgccggttccccagaggaggaggaagg cggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcagggccagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgga gagaggagtacgacgtgctggacaagcgcgaggcgggacccagaaat ggcggcggaagccgcgcgcaggaagaatcccccaggaggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcgaggcctatagcgagattgggtatgaaag gggaacgccggaggcgcacgaccggcactgtacccagggactcag cacgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccg cctcgg

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
Secuencia de aminoácidos de scFv antiCD19-4G4S-antiCD22	1307	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIY HTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTF GQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNS KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQ FSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLGWIAVAGTFDYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLNNVFGTGTKVTVLT	
secuencia de aminoácidos del CAR antiCD 19-4G4S-antiCD22	1308	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIY HTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTF GQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYQSSLKSRVTISKDNS KNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQ FSLQLNSVTPEDTAVYYCARDLGWIAVAGTFDYWGQGTLVTVSSGGGGS GGGSPGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQ QHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYTSSSTLNNVFGTGTKVTVLTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR KILLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRPGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	
Secuencia de ácido nucleico de scFv antiCD19-4G4S-antiCD22	1309	gaaatcgtgatgacccagtccccgcaaccctgtccctgagccccgggcg aaagagctaccctgtcgtgccgggcgtcgcaggacatctccaagtacct gaactggtaccagcagaagccgggccaggcaccgagacgcgatctac cacactagccgcctgcattccggtatcccgcaacggttcagcggcagcg ggagcggaaccgattacacgctcactatttcctcactgcaaccccgagga tttcgctgtgtacttctgccaacaaggaaacacccctgccttatacctt cggacaggtacaaagctggagattaagggaggagggggcctccggcggcg ggggcagcgggggcggcggaagccaggtccagctgcaggaatccggtcc gggactcgtgaagcctccgaaactctctcccttacgtgcaccgtgtcca gggtgtcccctgccggactacggagtgtcctggattcggcaacctccgg ggaagggactggagtggatcggagtgatctgggggctccgaaactacct actaccagtcatcattgaagtcaagagtgaccatttcgaaggacaacagc aagaaccaggtgtcccttaaactgtccagcgtgaccgccgccgatactg ccgtctactactgcgccaagcactattactacggcggaagctatgcgat ggactactgggga cagggcaccttggtcaccgtgtcctccggaggggga ggctccggtggcggcggctctggaggaggagggtccggcggaggaggat cggaagtgcagctccaacagtcaggacctggactcgtcaaaccctccca aacactcagccttacttgtgccatttccggggattccgtgtcgagcaat tccgccgcctggaactggatcaggcagtccccgtcgcgcgggctcgaat

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
		ggctgggacgcacttactaccggtccaagtggtacaacgactacgccgt cagcgtgaagtcgcggatccccattaaccccgacaacctccaagaaccag ttcagcctccaactgaactccgtgaccctgaggatacgcggtctact attgtgcccgggacctgggttggattgccgtggccgggaccttcgatta ctgggqccagggaactctcgtcaccgtgtcctcgggagggggtggctca ggggggtggtggatcgggtggtgggcggctcccagtccgctcgactcagc ccgcgtccgtgtccggttccccgggacagtcgatcaccaatcagctgcac tggcacctcctccgacgtcggcgggtacaactacgtgtcgtggtaccaa cagcaccctggaaaagcccccgaagctgatgatctacgacgtgtcccaaga ggccaagcggagtgtcaaatcgcttttccgggtcgaagtcgggaaacac ccgccagcctgactatctcgggactgcaggccgaggacgaggccgactac tactgctcgtcttacacctcctcatcctggaaccacgtgttcggaaccg gaaccaaggtcacgtgctgact

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
secuencia de ácido nucleico CAR antiCD 19-4G4S-antiCD22	1310	gaaatcgtgatgacccagtcccccgcaaccctgtccctgagccccgggccg aaagagctaccctgtcgtgccgggcgtccgcaggacatctccaagtacct gaactggtaccagcagaagccgggccaggcaccgagactgcigatctac cacactagccgcctgcattccggtatccccgcacggttcagcggcagcg ggagcggaaccgattacacgctcactatttcctcactgcaacccgaggga tttgctgtgtacttctgccaacaaggaaacaccctgccttatacctte ggacagggtacaaagctggagattaagggaggaggggtcccggccgcg ggggcagccggggcggcggaagccaggtccagctgcaggaatccggtcc gggactcgtgaagcctccgaaactctctccttacgtgcaccgtgtca ggggtgtcctgccggactacggagtgtctggattcggcaacctccgg ggaagggactggagtggctggagtgatctgggggctccgaaactaccta ctaccagtcatcattgaagtcaagagtgaccatttcgaaggacaacagc aagaaccaggtgtccttaaactgtccagcgtgaccgccgccggatactg ccgtctactactgcgccaagcactattactacggcggaagctatgcgat ggactactgggggcaagggcaccttggtcactgtgtcctccggaggggga ggctccggtggcggcggctctggaggcggagggtccggcggaggaggat cggaagtgcagctccaacagtcaggacccaggactcgtcaaaccctccca aacctcagccttactgtgccattcccggggattccgtgtcgagcaat tccgccgccgtggaactggatcaggccagtccccgtcgccgggctcgaat ggctgggacgcacttactaccggtccaagtggtacaacgactacgccgt cagcgtgaagtcgcggatcaccattaaccccgacacctccaagaaccag ttcagcctccaactgaactccgtgaccccctgaggataccggcggtctact attgtgccccgggacctgggttggattgccgtggccgggaccttcgatta ctggggccagggaactctcgtcaccgtgtcctcgggaggggtggtcgca ggggtggtggcatcgggtggtggcggctccccagtccgcctctgactcagc ccgcgtccgtgtccggttccccgggacagtcgatcacaatcagctgcac tggcacctccccgacgtcggcggctacaactacgtgtcgtggtaccaa cagcaccctggaaaagcccccgaagctgatgatctacgacgtgtccaaga ggccaagcggagtgtccaatcgctttccggctccgaagtcgggaaacac cgccagcctgactatctcgggactgcaggccgaggacgaggccgactac tactgctcctcttacaacctcctcatcttgaaccacgtgttcggaaccg gaaccaaggtcaccgtgctgactaccactaccccagcaccgaggccacc cacccccggctcctacccatcgcctccccagcctctgtccctgcgtccggag gcatgtagaccccgcagctggtggggccgtgcataccnggggtcttgact tcgcctgcgatatctacatttgggccccctctggctggtacttgcggggt cctgctgtcttccactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaag aagctgctgtacatcttcaagcaaccctccatgaggccctgtgcagacta ctccaagaggaggacggctgttcatgccgtttccagaggaggaggaggaag cggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagccgcagatgctccagcc tacaagcagggccagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcgga gagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaat gggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag gggaacgcagaaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcag caccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccg cctcgg	

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada enumerada en la Tabla 28. En algunos casos, el dominio de unión a antígeno comprende además una CDR1 LC, una CDR2 LC y una CDR3 LC. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una LC CDR1, una LC CDR2 y una LC CDR3 de cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera enumerada en la Tabla 28.

En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena ligera LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3 enumeradas en la Tabla 28, y una, dos o todas las secuencias de aminoácidos del dominio de unión de cadena pesada HC CDR1, HC CDR2 y HC CDR3 enumeradas en la Tabla 28.

En algunos casos, las CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia o una combinación de los mismos.

Las construcciones biespecíficas CD19-CD22 y CD22-CD19 descritas anteriormente se ensayaron en un ensayo NFAT, como se describe en los ejemplos a continuación. Como controles, se usaron un CAR anti-CD19 solo y un CAR anti-CD22 solo. Los resultados de este ensayo se muestran en la FIG. 14. Los datos indicaron que tanto los scFv anti-CD19 como los anti-CD22 son activos contra sus dianas.

EJEMPLOS

La divulgación se describe adicionalmente en detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique lo contrario.

Sin más descripción, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, preparar y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo señalan específicamente diversos aspectos de la presente divulgación, y no deben interpretarse como limitantes de modo alguno del resto de la divulgación. La invención se define en las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Linfocitos T CAR CD19 para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple.

Incluso con los regímenes actuales de quimioterapia, terapias dirigidas y trasplante autólogo de células madre, el mieloma se considera una enfermedad incurable. El presente ejemplo describe el tratamiento de mieloma múltiple (MM) con linfocitos T autólogos dirigidos a CD19 con un receptor quimérico para antígeno (lentivirus/CD19:4-1BB:CD3zeta; también conocido como "CART19" o CTL019). Este ejemplo demuestra que las terapias con CAR dirigidas a CD19 tienen el potencial de establecer remisiones profundas y duraderas a largo plazo basadas en el direccionamiento a las células madre del mieloma y/o las células tumorales que expresan niveles muy bajos (indetectables por la mayoría de los métodos) de CD19.

Al tratar a un paciente con una leucemia de células plasmáticas secundaria agresiva, se descubrió que CART19 administrado dos días después de un trasplante autólogo de células madre de rescate dio lugar a una eliminación rápida de la leucemia de células plasmáticas y una muy buena respuesta parcial en una paciente que había progresado a través de múltiples líneas de quimioterapia. Esta paciente era dependiente de transfusiones durante meses antes del tratamiento; a los dos meses del tratamiento ha recuperado su hemograma (con recuentos de plaquetas y glóbulos blancos dentro de la normalidad) y no ha requerido transfusiones desde que fue dada de alta hospitalaria de su tratamiento.

Debido a que las células de mieloma no expresan de forma natural CD19, el hallazgo de que el tratamiento con CART19 indujo una respuesta tumoral rápida y significativa en este tumor fue sorprendente. Sin desear limitarse a una teoría en particular, se razonó que CART19 podría usarse para tratar el mieloma porque: (1) mientras que tradicionalmente se cree que las células de mieloma son negativas para la expresión de CD19 por citometría de flujo, hay datos que indican que las células de mieloma pueden expresar niveles muy bajos de CD19, de modo que la expresión es detectable por ARN pero no por citometría de flujo o inmunohistoquímica; y (2) el concepto de dirigirse al linfocito B clonotípico, que se cree que es la célula madre cancerosa que da lugar al mieloma múltiple y es particularmente resistente a la quimioterapia. Existe una relación clonal entre los linfocitos B y las células tumorales del mieloma, pero la terapia tradicional del mieloma está dirigida a las células plasmáticas malignas en lugar de a los linfocitos B. Por lo tanto, CART19 para el tratamiento del mieloma se dirige a una población celular diferente a la de la mayoría de las terapias para el mieloma.

En la experiencia de los inventores con una sola paciente, la paciente tenía células plasmáticas circulantes y se pudo analizar sus células tumorales para detectar la expresión de CD19. Aproximadamente el 1-2 % de sus células tumorales expresaron el antígeno CD19. Por lo tanto, se razonó que CART19 puede tener un efecto directo en una población muy pequeña de sus células tumorales; una respuesta parcial muy buena, aunque no se habría previsto en función de la orientación únicamente a la población muy pequeña de células tumorales CD19+.

En este caso, se administró CART19 después de un trasplante autólogo de células madre después de una dosis alta de melfalán. Aunque esta es una terapia convencional en el mieloma, no es curativa. Asimismo, este paciente se había sometido previamente a trasplantes autólogos de células madre en tándem y recayó pronto (<6 meses) después del trasplante. Sin desear limitarse a una teoría particular, el uso de linfocitos CART19 como se describe en el presente ejemplo puede tener un mecanismo no solapante en el tratamiento del mieloma cuando se combina con un trasplante autólogo de células madre de rescate.

Diez pacientes adicionales con mieloma múltiple serán tratados con CART19 en un ensayo de Fase I y se han tratado al menos tres pacientes hasta la fecha.

Justificación de la dosis y riesgos/beneficios

Se ha optado por utilizar una dosificación plana a través de la vía de administración intravenosa para este protocolo. El objetivo principal de este protocolo fue probar la seguridad y viabilidad de administrar linfocitos CART-19 a pacientes con mieloma múltiple. Las principales toxicidades que se anticiparon son (I) liberación de citocinas cuando los CAR encuentran su antígeno CD 19 sustituto en células B malignas o normales; (2) agotamiento de células B normales, similar a la terapia con rituximab; (3) síndromes cutáneos y gastrointestinales sensibles a esteroides similares a la enfermedad de injerto contra huésped, como se ha visto previamente cuando las células T autólogas expandidas/coestimuladas se han acoplado con ASCT para MM. Una preocupación teórica fue si la transformación o proliferación descontrolada de las células T CART -19 podría ocurrir en respuesta a altos niveles de CD 19. Esto fue una preocupación menor en esta aplicación en comparación con otro estudio de pacientes con LLC, ya que se espera que la carga de linfocitos B clonotípicas en MM sea mucho menor que la carga de linfocitos B malignos en los pacientes con LLC refractarios tratados en ese estudio.

Justificación de la dosis

Con los 3 primeros pacientes, hemso observado actividad clínica a dosis que oscilan de $1,4 \times 10^7$ a $1,1 \times 10^9$ células CART-19. Esta observación demuestra, al menos en los 3 primeros pacientes tratados, que no existe una relación dosis-respuesta evidente. Se observó una respuesta completa en pacientes a los que se les administró una diferencia de dos veces logarítmica en la dosis. Por tanto, a diferencia de los fármacos convencionales que se metabolizan, los linfocitos CAR T pueden tener un amplio intervalo de respuesta a la dosis. Lo más probable es que esto se deba a que los linfocitos CAR T pueden proliferar ampliamente en los pacientes. Por lo tanto, establecimos un intervalo de dosis de $1\text{-}5 \times 10^8$ células CART-19 para infusión. En este estudio de un solo paciente ofrecido como uso compasivo, se le ofrecieron al paciente hasta 5×10^8 células CART19, sin límite de dosis inferior. Para el ensayo con diez pacientes, a los pacientes se les ofrecerán $1\text{-}5 \times 10^7$ células CART-19.

Diseño general

Este fue un estudio de un solo paciente ofrecido según uso compasivo; se modeló a partir de un estudio de Fase I para determinar si la infusión de linfocitos T autólogos transducidos para expresar CART-19 es segura. Los objetivos principales del estudio fueron determinar la seguridad, la tolerabilidad y el potencial de injerto de los linfocitos T CART-19 en pacientes que se sometieron a un TACM de rescate después de una recaída temprana después del primer TACM. El protocolo consiste en un estudio piloto abierto.

Al ingresar, los sujetos se someterán a una biopsia de médula ósea y una evaluación rutinaria de laboratorio y de imágenes de su MM. Los sujetos elegibles se someterán a aféresis en estado estacionario para obtener grandes cantidades de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para la fabricación de CART-19. Los linfocitos T se purificarán a partir de las PBMC, se transducirán con el vector lentivírico TCRζ/4-1BB, se expandirán *in vitro* y después se congelarán para futuras administraciones. Se registrará el número de pacientes que tienen colecciones, expansión o fabricación de linfocitos T inadecuadas en comparación con el número de pacientes que tienen linfocitos T fabricados con éxito; no se espera que la viabilidad de la fabricación del producto sea problemática en esta población de pacientes.

Por lo general, los sujetos habrán tenido suficientes células madre de sangre periférica que permanecen almacenadas desde la movilización/recogida realizada en preparación para su primer TACM para realizar dos TACM adicionales. Aquellos que no, se someterán a un segundo procedimiento de movilización/recogida ya sea antes o después de su aféresis en estado estacionario con un régimen según la preferencia del médico tratante. Aproximadamente dos semanas después de la leucaféresis inicial, los sujetos ingresarán en el hospital y recibirán una dosis alta de melfalán (día -2) seguida de una infusión de células madre autólogas dos días después (día 0), y todos los sujetos recibirán una infusión de linfocitos CART-19 de doce a catorce días después (día +12-14). Se inscribirán hasta 10 pacientes.

Todos los sujetos se someterán a análisis de sangre para evaluar la seguridad, el injerto y la persistencia de los linfocitos CART-19 a intervalos regulares hasta la semana 4 del estudio. El día +42 y el día +100, los sujetos se someterán a aspiraciones/biopsias de médula ósea para evaluar la carga de células plasmáticas de la médula ósea y el transporte de linfocitos CART-19 a la médula ósea. Se realizará una evaluación de respuesta formal el día 100 según los criterios del Grupo de Trabajo Internacional sobre Mieloma (IMWG) 136 y se controlará la TTP de acuerdo con la práctica clínica habitual para pacientes con mieloma múltiple. El principal resultado de eficacia medido en este estudio será una comparación de TTP después del TACM inicial de un paciente con TTP después del TACM en este estudio.

Como el punto final principal de este estudio es la seguridad y viabilidad de la infusión de células CART-19 con ASCT, el estudio empleará una regla de interrupción temprana. En resumen, si ocurren menos de 2 acontecimientos adversos graves e inesperados entre los primeros cinco sujetos tratados, el estudio acumulará cinco sujetos adicionales hacia una inscripción diana de 10. Se observará a los sujetos tratados durante 40 días después de la infusión de CART-19 (es decir, hasta la primera evaluación de respuesta oficial el día 42) antes de inscribir a un sujeto posterior hasta que se hayan inscrito y observado cinco sujetos. Para el tratamiento del segundo grupo de cinco pacientes, no se requerirá periodo de espera entre sujetos.

Después de los 6 meses de seguimiento intensivo, los sujetos serán evaluados al menos trimestralmente durante dos años con historial médico, examen físico y análisis de sangre. Después esta evaluación, los sujetos ingresarán en un estudio de renovación para seguimiento anual por teléfono y cuestionario durante hasta trece años adicionales para evaluar el diagnóstico de problemas de salud a largo plazo, tal como el desarrollo de una nueva neoplasia maligna.

Criterios de valoración primarios del estudio

Este ensayo piloto está diseñado para probar la seguridad y viabilidad de las células T autólogas transducidas con CD 19 TCRζ/4-1BB en pacientes sometidos a ASCT de rescate para MM después de una recaída temprana después del primer ASCT.

Los criterios de valoración primarios de seguridad y viabilidad incluyen:

Aparición de acontecimientos adversos relacionados con el estudio, definidos como NCJ CTC 2: signos/síntomas de grado 3, toxicidades de laboratorio y acontecimientos clínicos que posiblemente, probablemente o definitivamente estén relacionados con el tratamiento del estudio en cualquier momento desde la infusión hasta la semana 24. Esto incluirá la toxicidad de la infusión y cualquier toxicidad posiblemente relacionada con los linfocitos CART-19, incluidas, pero sin limitación, las siguientes:

a. Fiebres

b. Erupción

c. Neutropenia, trombocitopenia, anemia, aplasia medular

d. Disfunción hepática

e. Infiltrados pulmonares u otra toxicidad pulmonar

f. Síndromes similares a GVHD que afectan al tubo digestivo o a la piel.

Viabilidad para fabricar linfocitos CART-19 a partir de productos de aféresis de pacientes. Se determinará la cantidad de productos fabricados que no cumplan con los criterios de liberación de eficiencia de transducción de vectores, pureza de linfocitos T, viabilidad, esterilidad y contaminación tumoral.

Se comparará la profundidad y la duración de la respuesta después del trasplante autólogo de células madre con CART 19 con la profundidad y la duración de la respuesta que cada paciente logró inicialmente después del trasplante autólogo de células madre estándar.

Selección y retiro de sujetos

Criterios de inclusión

Los sujetos deben haberse sometido a un TACM previo para MM y haber progresado en los 365 días posteriores a la infusión de células madre. Son elegibles los sujetos que se hayan sometido a dos TACM anteriores como parte de un régimen planificado de consolidación de TACM en tándem. La progresión se definirá de acuerdo con los criterios IMWG para enfermedad progresiva o, para pacientes que alcanzaron CR o sCR después del ASCT inicial, los criterios de recaída de CR (Durie et al. Leukemia 2006;20(9): 1467-1473). N.B.: No existe un requisito de que los pacientes deban inscribirse en los 365 días posteriores al TACM anterior y los pacientes pueden ser tratados con otros agentes, incluidos los agentes experimentales, después de una recaída/progresión después de un TACM anterior antes de la inscripción en este estudio.

Los sujetos deben haber firmado un consentimiento informado por escrito.

Los sujetos deben tener una función adecuada de los órganos vitales para recibir dosis altas de melfalán según lo definido por los siguientes criterios, medido en las 12 semanas anteriores a la fecha de la infusión de melfalán: a. Creatinina sérica ≤2,5 o eliminación estimada de creatinina ≥30 ml/min y no dependiente de diálisis. b. AST ≤3 veces el límite superior de la normalidad y bilirrubina total ≤2,0 mg/dl (excepto en pacientes en los que la hiperbilirrubinemia se atribuye al síndrome de Gilbert). c. Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) ≥45 % o, si la FEVI es <45 %, una evaluación formal realizada por un cardiólogo que no identifique un deterioro de la función cardiovascular clínicamente significativo. La evaluación de la FEVI debe haberse realizado dentro de las seis semanas posteriores a la inscripción. d. Función pulmonar adecuada con FEV1, FVC, TLC, DLCO (después del ajuste adecuado para el volumen pulmonar y la concentración de hemoglobina) ≥40 % de los valores previstos. Las pruebas de función pulmonar deben haberse realizado dentro de las seis semanas posteriores a la inscripción.

Los sujetos deben tener un estado funcional ECOG de 0-2, a menos que un estado funcional más alto se deba únicamente al dolor óseo.

Criterios de exclusión

Los sujetos no deben:

Tener ninguna infección activa y descontrolada.

Tener hepatitis B, hepatitis C o infección por VIH activas.

Cualquier trastorno médico descontrolado que impida la participación como se describe. *Pauta terapéutica*

Terapia para el mieloma múltiple recidivante/progresivo

Los pacientes pueden recibir, antes de la inscripción, terapia para el mieloma múltiple recidivante/progresivo según la preferencia de sus médicos tratantes. La terapia puede continuar después de la inscripción.

Los pacientes deben suspender toda la terapia durante dos semanas antes de la aféresis y durante dos semanas antes de la dosis alta de melfalán. Si se espera que transcurran más de dos semanas entre la aféresis y la dosis alta de melfalán, los pacientes pueden reanudar la terapia después de la aféresis a discreción de sus médicos tratantes.

Dosis alta de melfalán (día -2)

Los pacientes serán admitidos en el hospital el día -3 o -2 y se someterán a examen por el médico tratante y pruebas de laboratorio de rutina, que incluirán parámetros de seguimiento para el síndrome de lisis tumoral, antes del inicio del protocolo de tratamiento. Se extraerá sangre para las pruebas de laboratorio de supervisión de MM (EPS, inmunoglobulinas cuantitativas y análisis de cadenas ligeras libres en suero) antes del inicio de la terapia si dichas pruebas no se habían realizado en los 7 días posteriores a la admisión.

La terapia de dosis alta consistirá en melfalán a una dosis de 200 mg/m^2 administrado por vía intravenosa durante aproximadamente 20 minutos el día -2. La dosis de melfalán se reducirá a 140 mg/m^2 para pacientes >70 años o para pacientes de cualquier edad que, a criterio del médico tratante, no toleren una dosis de 200 mg/m^2 Todos los pacientes recibirán profilaxis antiemética convencional, que puede incluir dexametasona y profilaxis antibiótica convencional.

Reinfusión de células madre (día 0)

La infusión de células madre se realizará el día 0, al menos 18 horas después de la administración de la dosis alta de melfalán. Las células madre se infundirán por vía intravenosa durante aproximadamente 20 a 60 minutos después de la premedicación de acuerdo con la práctica institucional convencional. Deberían infundirse al menos 2 × 10^6 progenitores de CD34+/kg de peso corporal. Además, debe estar disponible al menos 1 × 10^6 progenitores CD34+/kg de peso corporal como un producto de células madre de respaldo para ser infundido en caso de retraso en el injerto o falla tardía del injerto. El G-CSF debe administrarse s.c. a partir del día +5, dosificado según la práctica institucional convencional. Otras medidas de tratamiento de apoyo, tal como el apoyo de transfusiones, se realizarán de acuerdo con las pautas institucionales convencionales.

Infusión de linfocitos CART19 (día + 12-14)

Se administrará una dosis única de células T transducidas con CART-19 compuesta por hasta 5 × 10^7 células CART-19. La dosis mínima aceptable para la infusión de células transducidas con el vector CD19 TCRζ4-1BB en este protocolo de paciente único es 1 × 10^7. Los linfocitos CART-19 se administrarán como una dosis única mediante infusión i.v. rápida el día + 12-14 después de la infusión de células madre. Si el paciente no cumple con alguno de los criterios de inclusión descritos en el presente documento en la ventana de 12-14 días, la infusión de CART-19 puede retardarse más allá del día +12-14 hasta que se cumplan los criterios.

Lenalidomida de mantenimiento

Los sujetos que recibieron y toleraron lenalidomida de mantenimiento después de su primer TACM reiniciarán la terapia de mantenimiento de lenalidomida aproximadamente el día + 100, suponiendo que no haya contraindicaciones a juicio del médico tratante. La dosis inicial será de 10 mg diarios a menos que la experiencia previa dicte una dosis inicial alternativa para un paciente en particular. La terapia de mantenimiento continuará hasta la progresión de la enfermedad o la intolerancia.

Preparación y administración del fármaco del estudio

Los linfocitos T CART-19 se preparan en el CVPF y no se liberan del CVPF hasta que se cumplan los criterios de liberación aprobados por la FDA para las células infundidas (p. ej., dosis celular, pureza celular, esterilidad, número promedio de copias de vectores/célula, etc.). Una vez liberadas, las células se llevan a la cabecera para su administración.

Descongelación celular. Las células congeladas se transportarán en hielo seco a la cabecera del sujeto. Las células se descongelarán a la cabecera utilizando un baño de agua mantenido entre 36 °C y 38°C. La bolsa se masajeará suavemente hasta que las células se hayan descongelado. No deben quedar grumos congelados en el recipiente. Si el producto de linfocitos CART-19 parece estar dañado o la bolsa tiene fugas, o parece estar comprometida de alguna otra manera, no debe infundirse y debe devolverse al CVPF como se especifica a continuación.

Premedicación. Los efectos secundarios posteriores a las infusiones de células T incluyen fiebre transitoria, escalofríos y/o náuseas; véase Cruz et al. para una revisión (Cytotherapy 2010; 12(6):743-749). Se recomienda que el sujeto sea premedicado con paracetamol y clorhidrato de difenhidramina antes de la infusión de linfocitos CART-19. Estos medicamentos pueden repetirse cada seis horas según sea necesario. Se puede recetar un ciclo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos si el paciente continúa teniendo fiebre que no se alivia con paracetamol. Se recomienda que los pacientes no reciban corticosteroides sistémicos tales como hidrocortisona, prednisona, metilprednisolona o dexametasona en ningún momento, excepto en el caso de una emergencia que ponga en peligro la vida, ya que esto puede tener un efecto adverso sobre los linfocitos T.

Reacción febril. En el improbable caso de que el sujeto desarrolle septicemia o bacteriemia sistémica después de la infusión de linfocitos CAR T, se deben iniciar los cultivos y el tratamiento médico adecuados. Si se sospecha que un producto de linfocitos T CART-19 está contaminado, se puede volver a analizar la esterilidad del producto utilizando muestras archivadas que se almacenan en el CVPF.

Administración. La infusión se realizará en una sala aislada en Rhoads, tomando las precauciones para pacientes inmunodeprimidos. Los linfocitos T transducidos se administrarán mediante una infusión intravenosa rápida a un caudal de aproximadamente 10 ml a 20 ml por minuto a través de un equipo de sangre tipo Y sin látex de calibre 18 con una llave de paso de 3 vías. La duración de la infusión se basará en el volumen total para infundir y la velocidad de infusión recomendada. Cada bolsa de infusión tendrá adherida una etiqueta que contendrá lo siguiente: "SOLO PARA USO AUTÓLOGO". Además, la etiqueta tendrá al menos dos identificadores únicos, tales como las iniciales del sujeto, la fecha de nacimiento y el número de estudio. Antes de la infusión, dos personas verificarán de forma independiente toda esta información en presencia del sujeto y así confirmarán que la información coincide correctamente con el participante.

El equipo médico de emergencia (es decir, un carrito de emergencia) estará disponible durante la infusión en caso de que el sujeto tenga una respuesta alérgica, una crisis hipotensiva grave o cualquier otra reacción a la infusión. Se tomarán los signos vitales (temperatura, frecuencia respiratoria, pulso y presión arterial) antes y después de la infusión, luego cada 15 minutos durante al menos una hora y hasta que estos signos sean satisfactorios y estables. Se le pedirá al sujeto que no se vaya hasta que el médico considere que es seguro que lo haga.

Embalaje

La infusión estará compuesta por una dosis única de 1-5 × 10^7 células transducidas con CART 19, con una dosis mínima aceptable de 1 × 10^7 células CART-19 para infusión. Cada bolsa contendrá una alícuota (volumen dependiente de la dosis) de criomedio que contiene los siguientes reactivos de uso en infusión (% v/v): 31,25 % de plasmalito-A, 31,25 % de dextrosa (5 %), 0,45 % de NaCl, hasta 7,5 % de DMSO, 1 % de dextrano 40, 5 % de seroalbúmina humana.

Aféresis

Un procedimiento de aféresis de gran volumen (12-15 litros o 4-6 volúmenes de sangre) se lleva a cabo en el centro de aféresis. Se obtienen PBMC para CART-19 durante este procedimiento. A partir de una única leucocitaféresis se pretende recolectar al menos 5 × 10^9 glóbulos blancos para fabricar células T CART-19. También se obtienen y crioconservan leucocitos sanguíneos de referencia para los requisitos de revisión retrospectiva de la FDA y para la investigación. Se espera que el producto celular esté listo para su lanzamiento aproximadamente de 2 a 4 semanas después. Cuantificación de subconjuntos de linfocitos por citometría de flujo, incluida la determinación de linfocitos B CD19 y CD20. Se realiza una evaluación de referencia para el anticuerpo anti-VSV-G humano y anti-murino (HAMA). Si un sujeto ha tenido previamente una recogida de aféresis adecuada almacenada según las Buenas Prácticas de Fabricación actuales en la Instalación de Producción de Vacunas y Células Clínicas, estas células pueden usarse como fuente de células para la fabricación de CART-19. El uso de un producto de aféresis almacenado evitaría el gasto, el tiempo y el riesgo para el sujeto de someterse a una recogida de aféresis adicional.

Quimioterapia citorreductora

La quimioterapia de linfoagotamiento será dosis altas de melfalán como se describe en el presente documento.

Infusión de CART-19

La infusión comenzará el día + 12-14 después de la reinfusión de células madre.

Los días +12 a 14 antes de la primera infusión, los pacientes tendrán un hemograma completo con diferencial y una evaluación de los recuentos de CD3, CD4 y CD8, ya que la quimioterapia se administra en parte para inducir la linfopenia.

La primera dosis se administrará en dosis única. Las células se descongelan en la cabecera del paciente. Las células descongeladas se administrarán a una velocidad de infusión tan rápida como se tolere, de modo que la duración de la infusión sea de aproximadamente 10 a 15 minutos. Para facilitar la mezcla, las células se administrarán simultáneamente utilizando un adaptador en Y. Se infundirá y premedicará a los sujetos como se describe en el presente documento. Se evaluarán los signos vitales de los sujetos y se realizará una oximetría de pulso antes de la dosificación, al final de la infusión y, a partir de entonces, cada 15 minutos durante 1 hora y hasta que sean estables y satisfactorios. Se obtiene una muestra de sangre para determinar un nivel de CART-19 de referencia en cualquier momento antes de la primera infusión y de 20 minutos a 4 horas después de cada infusión (y se envía a TCSL).

A los pacientes que experimentan toxicidades relacionadas con dosis altas de melfalán se les retrasará el programa de infusión hasta que estas toxicidades se hayan resuelto. Las toxicidades específicas que justifican el retraso de las infusiones de linfocitos T incluyen: 1) Pulmonar: Necesidad de oxígeno complementario para mantener la saturación por encima del 95 % o presencia de anomalías radiográficas en la radiografía de tórax que son progresivas; 2) Cardíaca: Arritmia cardíaca nueva no controlada con control médico 3) Hipotensión que requiere apoyo vasopresor. 4) Infección activa: Hemocultivos positivos para bacterias, hongos o virus en las 48 horas posteriores a la infusión de linfocitos T.

Control de la toxicidad

Proliferación descontrolada de linfocitos T. La toxicidad asociada con infusiones de linfocitos T alogénicos o autólogos se ha controlado con un ciclo de inmunosupresión farmacológica. Se ha informado de que la toxicidad asociada con los cuerpos T responde a los corticosteroides sistémicos. Si se produce una proliferación descontrolada de linfocitos T (toxicidad de grado 3 o 4 relacionada con los linfocitos CART-19), los sujetos pueden tratarse con corticosteroides. Los sujetos serán tratados con pulsos de metilprednisolona (2 mg/kg i.v. divididos cada 8 h x 2 días), seguido de una reducción gradual rápida.

Además, con base en las observaciones de sujetos tratados con otro protocolo, existe cierta preocupación por el síndrome de activación de macrófagos (MAS), aunque se espera que la carga tumoral CD 19+ sea mucho menor en pacientes con mieloma que en pacientes con LLC. El tratamiento y el momento del tratamiento de esta toxicidad quedarán a criterio del médico del paciente y del investigador del estudio. El control sugerido podría incluir: si el sujeto tiene fiebre superior a 38,33 °C (101 °F) que dura más de 2 días consecutivos y no hay pruebas de infección (cultivos de sangre negativos, CXR u otra fuente), se puede considerar tocilizumab 4 mg/kg. Se puede considerar la adición de corticosteroides y terapia anti-TNF a discreción del médico.

Agotamiento de linfocitos B. Es posible que ocurra agotamiento de linfocitos B e hipogammaglobulinemia. Esto es común con las terapias dirigidas anti-CD20. En caso de hipogammaglobulinemia clínicamente significativa (es decir, infecciones sistémicas), los sujetos recibirán inmunoglobulina intravenosa (IGIV) según las pautas de dosificación clínicas establecidas para restablecer los niveles normales de inmunoglobulina sérica, como se ha hecho con Rituximab.

Fallo primario del injerto. El fallo primario del injerto (es decir, la falta de injerto) puede ser más común después del segundo TACM en comparación con el primer TACM. Los criterios de elegibilidad estipulan que debe haber suficientes células madre disponibles para la reinfusión de rescate a discreción del médico tratante en caso de fallo primaria del injerto.

Resultados

Tres pacientes con mieloma múltiple avanzado refractarios al tratamiento se han tratado ahora con CTL019 en este ensayo en curso. Los resultados de dos de estos pacientes muestran que ambos han tenido efectos antitumorales sustanciales de la terapia de CTL019 según la evaluación de eficacia primaria en el punto temporal de tres meses. El tercer paciente aún no ha alcanzado el punto temporal de tres meses. Los resultados para los dos pacientes se describen con más detalle a continuación.

La primera paciente con mieloma completó su evaluación de respuesta de +100 días y tuvo una muy buena respuesta a la terapia con CART19. Se realizaron las siguientes pruebas con los siguientes resultados:

- SPEP/inmunofijación: negativo

- inmunofijación en orina: una banda de cadena ligera kappa débil e inmensurable en su inmunofijación (también presente en el día 38, por lo que no es nueva)

De lo contrario, el paciente cumple con los criterios de remisión completa estricta, que incluyen:

- relación de cadena ligera libre de suero: normal

- biopsia de médula ósea: negativa

- inmunofenotipado de IgA: IgA está por debajo del límite de detección

Aparte del resultado débil e inmedible de la cadena ligera kappa de la inmunofijación de la orina, el paciente cumplió con todos los criterios de "remisión completa estricta". El sumario del inmunofenotipado de células plasmáticas en 3 momentos (día -2, día +38, día +103) se muestra en la FIG. 8 y demuestra que la IgA del paciente está por debajo del límite de detección. El sumario muestra una gran carga de mieloma el día -2 y ninguna detectable los días +38 y +103, lo que clasifica al paciente como "EMR negativo" mediante análisis de flujo. En el día +103, el sumario muestra la recuperación de células plasmáticas CD19+ y linfocitos B normales, policlonales. El paciente no presentaba síntomas de enfermedad o terapia y actúa como una persona normal.

El segundo paciente tratado aún no ha alcanzado el punto temporal de +100 días. Sin embargo, en este momento, le está yendo bien, pero es demasiado pronto para determinar el efecto de la infusión de CTL019.

Ejemplo 2: Terapia de linfocitos CAR19 T para el linfoma de Hodgkin

La terapia con linfocitos CAR19 T también se puede usar para tratar el linfoma de Hodgkin (LH). El linfoma de Hodgkin se caracteriza por la presencia de células malignas de Hodgkin Reed-Sternberg (HRS) que proceden de linfocitos B clonales del centro germinal. Hay varios factores que indican la eficacia terapéutica de la terapia con linfocitos CAR19 T para LH. La tinción con CD19 de tumores LH muestra células que expresan CD19 ($CD19^+$) dentro del tumor y microambiente tumoral (FIG. 2). Un estudio ha demostrado que una población de células B clonales ($CD20^+CD27^+ALDH^+$) que expresa CD19 es responsable de la generación y el mantenimiento de líneas celulares de linfoma de Hodgkin, y también circula en la sangre de la mayoría de los pacientes con LH (Jones et al., Blood, 2009, 113(23):5920-5926). También se ha sugerido que esta población de linfocitos B clonales da lugar o contribuye a la generación de células HRS malignas. Por tanto, la terapia con CART19 agotaría esta población de linfocitos B que contribuye a la tumorigénesis o al mantenimiento de las células tumorales. Otro estudio mostró que el agotamiento de los linfocitos B retrasa el crecimiento de tumores sólidos en múltiples modelos murinos (Kim *et al.*, *J Immunotherapy*, 2008, 31(5):446-57). En apoyo de la idea de que el agotamiento de los linfocitos B en el microambiente tumoral de LH produce algún efecto antitumoral, las terapias actuales, tales como el rituxan, se están probando clínicamente para detectar y eliminar los linfocitos B tumorales en el LH (Younes *et al.*, *Blood*, 2012, 119(18):4123-8). También se ha mostrado que la carcinogénesis de nueva aparición relacionada con la inflamación crónica depende de los linfocitos B (de Visser, *et al.*, *Cancer Cell*, 2005, 7(5):411-23). Los resultados de estos estudios indican que el direccionamiento de la población de linfocitos B, particularmente en el microambiente del tumor LH, sería útil para tratar LH, al reducir o inhibir la progresión de la enfermedad o el crecimiento tumoral.

Además, los linfocitos B normales que expresan CD19 también se infiltran en el microambiente tumoral en el LH. Estudios previos con terapia CART19 en LLC y LLA (p. ej., descritos en los ejemplos 4 y 5) muestran que la exposición de CART19 a dianas CD19+ conduce a la producción de citocinas y macrófagos. Por tanto, la modulación del microambiente tumoral de LH de un microambiente protumoral a un microambiente antitumoral puede lograrse mediante la infusión de CART19 para que interactúe con los linfocitos B CD19+ normales presentes en el LH. Por ejemplo, la exposición de CART19 a dianas que expresan CD19 causa la producción de citocinas, p. ej., citocinas inflamatorias, que promueven la actividad antitumoral a través de la expansión de los linfocitos T citotóxicos, la activación de macrófagos y el reclutamiento de otras células efectoras inmunitarias con diversas funciones que inhiben el crecimiento tumoral, tales como leucocitos, macrófagos y células presentadoras de antígenos. Debido a que los linfocitos B CD19+ diana pueden no ser malignos (p. ej., linfocitos B que circulan normalmente), se puede preferir un efecto CART19 transitorio en lugar de prolongado para la modulación del microambiente tumoral.

Se puede realizar un estudio para examinar la eficacia terapéutica de la terapia CART 19 en pacientes con LH como se describe a continuación (FIG. 3). El estudio también evaluará la seguridad y la tolerabilidad de CART19 en sujetos con LH y determinará el efecto de los linfocitos CART19 en el microambiente tumoral de LH.

En este estudio se tratan 8 pacientes con LH clásico. Los pacientes son de todas las edades, aunque se pueden establecer protocolos separados para el suministro de fármacos para pacientes pediátricos y adultos. Los pacientes de este estudio no tienen opciones de tratamiento potencialmente curativas disponibles (tales como trasplante alogénico o autólogo de células madre (TACM)), o no son aptos para dichas opciones de tratamiento curativo. Por ejemplo, los pacientes pueden ser cualquiera de los siguientes: PET+ después de quimioterapia de rescate, PET+ después de tratamiento con brentuximab o PET+ después de TACM con o sin exposición previa a brentuximab. Los pacientes tendrán un pronóstico limitado (una supervivencia esperada entre varios meses y menor o igual a 2 años) con las terapias actualmente disponibles. Y, finalmente, los pacientes no habrán recibido terapia con anticuerpos anti-CD20. Los pacientes se excluyen debido a la falta de viabilidad, p. ej., si el paciente tiene un número insuficiente de linfocitos T para 6 infusiones de CART19.

Se produce un ARNm de CAR19 mediante transcripción *in vitro*. El ARNm de CAR19 se introduce por electroporación en los linfocitos T del donante y las células resultantes se expanden y estimulan mediante incubación con perlas CD3/CD28. Se administran al paciente dosis que contienen entre 1×10^8 - 5×10^8 células T CAR19 electroporadas con ARN tres veces por semana durante dos semanas (por ejemplo, los días 0, 2, 4, 7, 9 y 11). La tasa de respuesta general se evaluará mediante exploración clínica, CT y PET 1 mes después del tratamiento. La respuesta y la supervivencia se controlarán mensualmente durante los primeros 6 meses, luego cada 3 meses hasta 2 años después de la primera infusión de CART19 (día 0). Las técnicas de control incluyen la biopsia del tumor o del ganglio linfático (p. ej., para el análisis inmunohistoquímico y/o el ARN para el perfil de expresión génica) y la exploración por TEP antes y después del tratamiento con CART19. Por ejemplo, el efecto de los linfocitos CART19 en el microambiente del tumor LH se analiza comparando los resultados del perfil de expresión génica realizado en biopsias de ganglios linfáticos accesibles de pacientes seleccionados antes del tratamiento y aproximadamente una semana después del tratamiento (o el tiempo apropiado después del tratamiento para permitir la alteración del fenotipo celular). Para evaluar la seguridad y la tolerabilidad del tratamiento con CART19, se informa de la frecuencia y la gravedad de los acontecimientos adversos, incluida la frecuencia del síndrome de liberación de citocinas (SLC) y el síndrome de activación de macrófagos (SHF).

La quimioterapia se puede administrar al mismo tiempo que el tratamiento con CART19. La primera dosis de CART19 puede estar precedida por quimioterapia de linfoagotamiento, p. ej., cytoxan.

Ejemplo 3: El subconjunto de pacientes con LLC que no responde muestra una mayor expresión de moléculas inhibidoras de puntos de control inmunitarios

En este estudio, se evaluó la expresión de moléculas inhibidoras de puntos de control inmunitarios en linfocitos CART19 de fabricación clínica de 34 pacientes con LLC, tales como PD-1, LAG3 y TIM3. Se conocía la respuesta de esta cohorte a CART19 y, por lo tanto, se pudo evaluar una correlación entre la respuesta y los patrones de expresión de biomarcadores.

Los linfocitos CART19 fabricados de pacientes con LLC con diferentes respuestas a la terapia con CART se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de CAR y las moléculas inhibidoras del punto de control inmunitario PD-1, LAG3 y TIM3. Los linfocitos CART19 procedían de: donantes sanos (DS) (n=2); pacientes con LLC que respondieron a la terapia con CART (CR) (n=5); pacientes con LLC que respondieron parcialmente a la terapia con CART (PR) (n=8); pacientes con LLC que no respondieron a la terapia con CART (NR) (n=21). Las células se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia que reconocen específicamente CD3, CD4, CD8, CD27, CD45RO, la molécula CAR19 y las moléculas de puntos de control inmunitarios PD-1, LAG3 y TIM3, según métodos convencionales para análisis de citometría de flujo conocidos en la técnica. La expresión de cada marcador, p. ej., CD4+, CD8+, etc., se determinó mediante un programa informático de análisis de citometría de flujo, y las subpoblaciones (p. ej., linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ o linfocitos T que expresan CAR19) se analizaron más a fondo para determinar la expresión de las moléculas de puntos de control inmunitarios PD-1, LAG3 y TIM3.

En la FIG. 4A y 4B se muestra un ejemplo del análisis de perfiles de citometría de flujo utilizado para determinar la expresión del marcador de superficie. Los linfocitos T que expresan CD4 se determinaron mediante citometría de flujo y se analizaron adicionalmente para determinar la expresión de CAR19 y PD-1, de modo que el eje de abscisas de los perfiles indica la expresión de CAR19 (los cuadrantes superior izquierdo (C5) e inferior izquierdo (C8) muestran las células CD4+ negativas para CAR19, mientras que los cuadrantes superior derecho (C6) e inferior derecho (C7) muestran las células CD4+ que expresan CAR19) y el eje de ordenadas muestra la expresión de PD-1 (los cuadrantes inferior izquierdo (C8) y derecho (C7) muestran las células CD4+ negativas para PD-1 y los cuadrantes superior izquierdo (C5) y derecho (C6) muestran las células CD4+ que expresan PD-1). En la población de CD4+ de un sujeto que responde a CART, el 44,7 % de las células CD4+ en general expresaron PD-1, y aproximadamente el 22,3 % de las células que expresan CAR19 fueron positivas para PD-1, mientras que el 27,2 % de las células que expresan CAR19 fueron negativas para PD-1 (FIG. 4A). Por el contrario, en la población de CD4+ de un sujeto que no responde, hubo una disminución significativa en las células que expresan CAR19 en general (aproximadamente 15,3 % en comparación con el 49,5 % en CR), siendo el 14,7 % de las células que expresan CAR19 siendo positivas para PD-1 mientras que sólo el 0,64 % fue negativo para PD-1 (FIG. 4B). La comparación entre los perfiles de la FIG. 4A y la FIG. 4B muestra que un porcentaje mucho mayor de células CD4+

de un sujeto que no responde expresa PD-1 (aproximadamente el 92,9 %) en comparación con el sujeto que responde a CART (aproximadamente 44,7 %).

Utilizando los métodos y análisis descritos anteriormente, se determinó el porcentaje de células que expresan PD-1 (PD-1+) de la población CD4+ y la población CD8+ para cada paciente en cada grupo de respuesta. Se demostró que los sujetos que no respondían tenían un mayor porcentaje de células PD-1+ en las poblaciones CD4+ (FIG. 4C) y CD8+ (FIG. 4D) en comparación con los que respondieron a la terapia con CAR (CR); el aumento del porcentaje promedio de PD-1 fue estadísticamente significativo para las poblaciones CD4+ y CD8+. Los sujetos con respuestas parciales (PR) presentaron porcentajes más altos de células PD-1+ que los que respondían (CR) en las poblaciones tanto CD4+ (FIG. 4C) como CD8+ (FIG. 4D).

A continuación, se determinó el porcentaje de células que expresan PD-1 (PD-1+) de la población CD4+ que expresa CAR19 y la población CD8+ que expresa CAR19 para cada paciente en cada grupo de respuesta. Se realizó un análisis similar al anterior, con la etapa adicional de analizar las células CD4+ y CD8+ para determinar la expresión de CAR19 y, después de identificar las células que expresan CAR19, determinar el porcentaje de células con expresión de PD-1 de las poblaciones de células que expresan CAR19. Se observó una tendencia similar a la observada en las poblaciones generales CD4+ y CD8+ para las poblaciones CD4+ y CD8+ que expresan CAR19: se mostró que los sujetos que no respondían tenían un mayor porcentaje de células PD-1+ en las poblaciones CD4+ (FIG. 5A) y CD8+ (FIG. 5B) en comparación con los que respondieron a la terapia con CAR (CR); el aumento del porcentaje promedio de PD-1 fue estadísticamente significativo para las poblaciones tanto CD4+ como CD8+. Los sujetos con respuestas parciales (PR) presentaron porcentajes más altos de células PD-1+ que los que respondían (CR) en las poblaciones tanto CD4+ (FIG. 5A) como CD8+ (FIG. 5B).

Se realizó un análisis adicional para determinar la distribución de células que expresan PD-1, LAG3 y TIM3 de pacientes con diferentes respuestas a la terapia con CAR. En la FIG. 6 se muestra un análisis de perfil celular representativo para la expresión de PD-1, LAG3 y TIM3 en la población CD4+. En primer lugar, se analizó la expresión de CD4+ y CD8+ en las poblaciones celulares. A continuación, se analizó la población CD4+ (o población CD8+, no mostrada) para determinar la expresión de PD-1 y CAR19 (FIG. 6, perfiles de la izquierda). Como se describió anteriormente, los sujetos que no respondían (NR) tenían un porcentaje significativamente mayor de células que eran PD-1+ en general en comparación con los sujetos que respondían a CART (CR) (aproximadamente 92,9 % de PD-1 positivo para NR en comparación con el 44,7 % de PD-1 positivo para CR). Por otra parte, en los sujetos que no responden, las células que expresaban CAR19 eran en su mayoría positivas para PD-1 (14,7 % positivas para PD-1 y CAR+ en comparación con 0,64 % negativas para PD-1 y CAR+). A continuación, las poblaciones se analizaron para determinar la coexpresión de PD-1 y LAG3 (FIG. 6, perfiles intermedios). Las células que expresaron tanto PD-1 como LAG3 se muestran en el cuadrante superior derecho (C2). Los sujetos que no respondieron tenían un porcentaje significativamente mayor de células que expresaban ambos inhibidores de puntos de control inmunitarios, PD-1 y LAG3, en comparación con los que respondieron a CART (67,3 % en comparación con 7,31 %). La expresión de PD-1 también se analizó con la expresión de TIM3. En la FIG. 6, perfiles de la derecha, el recuadro indica las células que expresan tanto PD-1 como TIM3. De forma similar a los resultados obtenidos con PD-1 y LAG3, los sujetos que no respondían tenían un porcentaje significativamente mayor de células que expresaban ambos inhibidores de puntos de control inmunitarios, PD-1 y TIM3, en comparación con los sujetos que respondían a CART (83,3 % en comparación con 28,5 %). El porcentaje de células que expresan PD-1 (PD1+), células que expresan PD-1 y LAG3 (PD1+LAG3+) y células que expresan PD-1 y TIM3 (PD1+TIM3+) se determinó para cada paciente en cada grupo de respuesta usando el análisis de citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. Se mostró que los sujetos que no respondían tenían un porcentaje mayor de células PD1+ LAG3+ (FIG. 7A) y células PD1+TIM3+ (FIG. 7B) en comparación con sujetos que no respondían a CART que fue estadísticamente significativo para ambas poblaciones de células. Los respondedores parciales también mostraron un mayor porcentaje de ambas poblaciones celulares en comparación con los respondedores de CART, disminuyendo los promedios en comparación con los no respondedores.

Estos resultados indican que los pacientes que no responden a la terapia con CAR presentan una mayor expresión de los inhibidores del punto de control inmunitario (p. ej., PD-1, LAG3 y TIM3) en comparación con los pacientes que responden total o parcialmente a la terapia con CAR. Por tanto, estos resultados muestran que los agentes que inhiben o disminuyen la expresión de los inhibidores de puntos de control inmunitarios, p. ej., PD-1, LAG3 o TIM3, pueden ser útiles para administrar a pacientes que reciben terapia con CAR para prevenir la supresión inmunitaria a través de vías de puntos de control inmunitarios (p. ej., mediada por PD-1, LAG3 o TIM3), aumentando así la eficacia de las células que expresan CAR.

Ejemplo 4: Efectos de la inhibición de mTOR sobre la inmunosenescencia en ancianos

La eficacia de la inhibición de mTOR sobre la inmunosenescencia se describe, p. ej., en el ejemplo 1 de la solicitud internacional WO/2015/073644.

Ejemplo 5: Mejora de la Respuesta Inmunitaria a la Vacuna en Sujetos Ancianos

La eficacia de la inhibición de mTOR sobre la mejora de una respuesta inmunitaria se describe, p. ej., en el ejemplo 2 de la solicitud internacional WO/2015/073644.

Ejemplo 6: La inhibición de dosis bajas de mTOR aumenta la energía y el ejercicio;

El efecto de la inhibición de mTOR sobre la energía y el ejercicio se describe, p. ej., en el ejemplo 3 de la solicitud internacional WO/2015/073644.

Ejemplo 7: Inhibición de la quinasa P70 S6 con RAD001

El efecto de la inhibición de mTOR sobre la inhibición de la cinasa P70 S6 se describe, p. ej., en el ejemplo 4 de la solicitud internacional WO/2015/073644.

Ejemplo 8: La IL-7 exógena mejora la función de los célula CAR T

Después de la transferencia adoptiva de célula CAR T, algunos pacientes experimentan una persistencia limitada de los célula CAR T, lo que puede dar lugar a niveles subóptimos de actividad antitumoral. En este ejemplo, los efectos de la administración de IL-7 humana exógena se evalúan en modelos de xenoinjerto de ratón en los que se ha observado una respuesta subóptima inicial a los célula CAR T.

La expresión del receptor IL-7 CD 127 se evaluó por primera vez en diferentes líneas de células cancerosas y en células que expresan CAR. Se analizaron dos líneas celulares de linfoma de células del manto (RL y Jeko-1) y una línea celular LLA-B (Nalm-6) mediante citometría de flujo para determinar la expresión de CD127. Como se muestra en la FIG. 9A, de las tres líneas de células cancerosas analizadas, se demostró que RL tenía la expresión más alta de CD127, seguido de Jeko-1 y Nalm-6. Se infundieron célula CART19 en ratones NSG y se evaluó la expresión de CD127 en las células CART19 circulantes mediante citometría de flujo. Como se muestra en la FIG. 9B, CD127 se expresa uniformemente en todos los linfocitos CART19 circulantes.

A continuación, se evaluó el efecto del tratamiento con IL-7 exógena sobre la actividad antitumoral de las células CART19 en un modelo animal de linfoma. A los ratones NSG se les injertó una línea celular del manto que expresa luciferasa (RL luc) el día 0 (D0), seguido de un tratamiento con células CART19 el Día 6. Los ratones NSG se dividieron en grupos, en donde un grupo no recibió células CART19, un el segundo grupo recibió 0,5 $\times 10^6$ células CART19, un tercer grupo recibió 1×10^6 células CART19 y un cuarto grupo recibió 2×10^6 células CART19. El tamaño del tumor se controló midiendo la bioluminiscencia media de los tumores injertados durante más de 80 días. Sólo los ratones que recibieron 2 x 10^6 células CART19 demostraron rechazo del tumor e inhibición del crecimiento del tumor (FIG. 10A). Los ratones de los dos grupos que recibieron 0,5 $\times 10^6$ células CART19 o 1 $\times 10^6$ células CART19 mostraron una respuesta antitumoral subóptima. Luego, los ratones de estos dos grupos se aleatorizaron, en donde tres ratones (ratón nº 3827 y nº 3829 que recibieron $0{,}5 \times 10^6$ células CART19, y el ratón nº 3815 que recibió 1×10^6 células CART19) recibieron IL-7 humana recombinante exógena a una dosis de 200 ng/ratón mediante inyección intraperitoneal tres veces por semana a partir del Día 85, y dos ratones no lo hicieron. La carga tumoral de ratones que recibieron IL-7 exógena desde el día 85-125, detectada por bioluminiscencia media, se muestra en la FIG. 10B. Todos los ratones que recibieron IL-7 mostraron una respuesta considerable de 1-3 log de reducción de la carga tumoral. Los ratones que originalmente recibieron una dosis más alta de células CART19 (ratón n.º 3815 que recibió 1×10^6 células CART19) mostraron una respuesta más profunda. Al comparar la carga tumoral de ratones que recibieron tratamiento con IL-7 con el control, antes y después del tratamiento con IL-7, la reducción tumoral en la carga tumoral solo se observó en los ratones que habían recibido tratamiento con IL-7 (FIG. 10C).

También se examinó la dinámica de células T después del tratamiento con IL-7 en el modelo animal de linfoma. Células CART19 humanas no eran detectables en la sangre antes del tratamiento con IL-7. Tras el tratamiento con IL-7, hubo un aumento rápido, pero variable, en el número de linfocitos T en los ratones tratados (FIG. 11A). El grado de expansión de células T observado en los ratones que recibieron IL-7 también se correlacionó con la respuesta del tumor. El ratón con el número más alto de linfocitos T detectados en la sangre en la expansión máxima durante el tratamiento con IL-7 (ratón n.º 3815) tuvo la reducción más sólida en la carga tumoral (véase la FIG. 10B). Por otra parte, el momento de la expansión máxima se correlacionó con la dosis de células T inyectada como valor de referencia. El número/nivel de células que expresan CD3 en la sangre también se midió antes y después del tratamiento con IL-7. En los ratones de control, se detectaron muy pocas células que expresaban CD3, mientras que los ratones tratados con IL-7 mostraron un aumento significativo de células CD3+ después del tratamiento con IL-7 (FIG. 11B).

En conjunto, los resultados de este ejemplo demuestran que el tratamiento con IL-7 exógena aumenta la proliferación de células T y la actividad antitumoral *in vivo*, lo que indica que el uso de IL-7 en pacientes con resultados subóptimos después de la terapia CAR puede mejorar la respuesta antitumoral en estos pacientes.

Ejemplo 9: Evaluación de CAR CD22

Ensayo celular automatizado de Jurkat-NFAT-Luciferasa (JNL)

Se realizó un ensayo automatizado para determinar la reactividad de clones CART CD22 específicos. Se sembraron $3e^4$ células de la línea celular Jurkat transducidas de forma lentivírica que expresan luciferasa a partir de un promotor NFAT (células JNL) en una placa de 96 pocillos con líneas celulares diana que expresan CD22 (Daudi, Raji) y una línea celular que no expresa CD22 (K562) como control negativo. Al día siguiente, se añadió sustrato de luciferina a cada pocillo de la placa de 96 pocillos y se determinó la luminiscencia relativa del indicador de luciferasa. En este ensayo, las construcciones de CAR CD22 se compararon con una construcción de CAR CD19 y una construcción de CAR CD22 (derivada de m971) (m971-HL) que sirvieron como controles positivos. Una construcción CAR m971-LH, que contiene las cadenas VH y VL de m971-HL pero en orientación inversa (L-H en lugar de H-L), contenía un CAR pero no pudo unirse a la diana debido a la falta de especificidad y sirvió como control negativo. Los linfocitos T no transducidos que no contenían CAR (cnt Neg) también sirvieron como control negativo. Se representó gráficamente la actividad de luciferasa de la activación de linfocitos T Jurkat. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que varios de los clones de JNL transducidos con CD-22 mostraron una reactividad específica hacia las líneas celulares que expresan CD22 que aumentó de manera dependiente de la dosis (FIGS. 18A-18C).

Expresión de CAR CD22 en linfocitos T humanos primarios

Los linfocitos T humanos primarios se activaron con microesferas estimulantes anti-CD3/antiCD28 el día 0, seguidas de la transducción lentivírica de construcciones CAR específicas el día 1. Las células se expandieron *in vitro* hasta el día 10, momento en el que se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión superficial de CAR. Se utilizaron dos enfoques diferentes para determinar la expresión superficial de CAR: Proteína-L-biotina seguida de estreptavidina-PE y CD22-Fc humano recombinante seguido de anti-Fc-alexafluor 488. Los resultados se muestran en la FIG. 19. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que el clon 2 (hCD22-2), el clon 5 (hCD22-5), el clon 7 (hCD22-7), el clon 8 (hCD22-8), el clon 10 (hCD22-10), el clon 12 (hCD22-12), el clon 30 (hCD22-30) y el clon 31 (hCD22-31) de CAR CD22 mostraron expresión superficial positiva. El CAR CD22 m971 actuó como control positivo para unir tanto la Proteína-L como hrCD22-Fc, y el Isotipo CAR sin especificidad (anti-gH) sirvió como control positivo para la Proteína-L. Se usaron linfocitos T que no expresaban CAR como control negativo.

Ensayo de destrucción de diana de tumor de linfocitos T primarios

Los linfocitos T primarios activados y transducidos como se ha descrito anteriormente se mezclaron con líneas celulares diana que expresaban luciferasa de forma estable en las relaciones indicadas (FIG. 20A-20F). Las líneas celulares diana Raji, SEM, K562-hCD22, Daudi y Nalm6 expresaron todas la diana CD22, mientras que la línea celular K562 no expresó CD22 y sirvió como control negativo (FIG. 20A-20F). Los resultados presentados en el presente documento demuestran que varios clones de CAR CD22 (p. ej., clones de CAR CD22 2, 5, 7, 8, 10, 12, 30 y 31) y el control positivo CAR CD22 m971-HL presentaron destrucción de células diana dependiente de la dosis, variando el grado de destrucción según el tipo de célula diana. Los linfocitos T no transducidos (UTD, por sus siglas en inglés) carecían de la capacidad de destruir las líneas celulares diana.

Matriz primaria de microesferas de citocinas de linfocitos T

Se investigó la capacidad de las líneas celulares que expresan CD22 para inducir la liberación de citocinas proinflamatorias de los linfocitos CART que expresan CD22. La concentración de citocinas proinflamatorias se determinó utilizando un kit de matriz de perlas de citocinas en muestras tomadas del ensayo primario de destrucción de linfocitos T. Se midieron interferón-g (IFN-g), factor de necrosis tumoral alfa (TNFa) e interleucina 2 (IL-2) en muestras de relaciones 2,5:1 E:T y 10: 1 E:T. Los resultados se muestran en la FIG. 21A-21F. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que múltiples clones de CAR CD22 indujeron significativamente más IFN-g, TNFa e IL-2 que CAR m971-LH (control negativo) o linfocitos T no transducidos (UTD), variando los niveles de inducción de citocinas según el tipo de célula diana.

Ejemplo 10: Estudio de aumento de dosis del tratamiento con CART CD22

Se realiza un ensayo clínico de fase 1 para determinar la dosis óptima de CART CD22 con o sin CART CD19 en los sujetos con LLA que han recibido y no han recibido previamente terapia con CART. El fin de este estudio es determinar la viabilidad de producir linfocitos T modificados con CAR anti-CD22 que cumplan con los criterios de liberación establecidos y evaluar la seguridad de administrar dosis crecientes de linfocitos T autólogos modificados con CAR anti-CD22 en niños y adultos jóvenes con neoplasias malignas de linfocitos B después de un régimen de linfoagotamiento de ciclofosfamida/fludarabina.

Los sujetos tienen entre 1 y 30 años de edad y pesan al menos 15 kg con LLA CD22+. La actividad de la enfermedad se puede medir mediante análisis de médula ósea o FDG-PET. Se permiten sujetos con actividad residual mínima de la enfermedad. Se permiten sujetos con un estado del sistema nervioso central (SNC) de 1 o 2. Los sujetos deben tener una función orgánica adecuada y un recuento de CD3 adecuado.

Se realiza un estudio de aumento de dosis de fase 1 con una cohorte de expansión. Los sujetos se estratifican según hayan recibido o no terapia con CART previamente. Los sujetos reciben uno de los cuatro niveles de dosis de cuatro dosis de linfocitos T autólogos modificados con CAR anti-CD22: 3×10^5 células/kg de peso corporal, 1×10^6 células/kg de peso corporal, 3×10^6 células/kg de peso corporal y 1×10^7 células/kg de peso corporal. A un subconjunto de los sujetos que reciben la dosis de 3×10^6 células/kg de peso corporal también se les administran células T modificadas con CAR anti-CD19. Los primeros 2 pacientes en cada nivel de dosis tienen 16 años de edad o más.

Después de determinar la elegibilidad, se realiza una aféresis para aislar los linfocitos T. A continuación, los sujetos se someten a quimioterapia preparatoria. Los sujetos son tratados con 25 mg/m^2 de fludarabina al día durante tres días y se les administra una dosis única de 900 mg/m^2 de ciclofosfamida. A continuación, se administran linfocitos T manipulados con CAR anti-CD22 y 28 días después se evalúan la respuesta y la toxicidad.

Ejemplo 11: Utilización de receptores de antígenos quiméricos dirigidos a CD20 (CARS) para el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B

Se realizó un ensayo de células Jurkat-NFAT-Luciferasa (JNL) para determinar la reactividad de clones de CART CD20 específicos. Se transdujeron de forma lentivírica células Jurkat que expresaban luciferasa de forma estable a partir de un promotor NFAT (células JNL) con construcciones de CAR que se muestran en la FIG. 15A-15C. Se mezclaron células JNL que expresan CAR (3e4) con líneas celulares diana Daudi (FIG. 15A) y Raji (FIG. 15B) que expresan CD20, y un control negativo K562 que no expresa CD20 (FIG. 15C) en relaciones de célula efectora:célula diana (E:T) de 0,5:1, 1:1, 2:1 y 4:1. Se sembraron células JNL transducidas de forma lentivírica en una placa de 96 pocillos con líneas celulares diana que expresan CD20 (Daudi, Raji) y una línea celular que no expresa CD20 (K562) como control negativo. Al día siguiente, se añadió sustrato de luciferina a cada pocillo de la placa de 96 pocillos y se determinó la luminiscencia relativa del indicador de luciferasa (de la activación de linfocitos T Jurkat). En este ensayo, las construcciones de CAR CD20 se compararon con una construcción de CAR CD19 y una construcción de CAR CD22 (derivada de m971) descritas en Haso *et al.*, *Blood*, 14 de febrero de 2013, vol. 121, n.º 7 que actuaron como controles positivos. El CAR de isotipo, que contenía un CAR pero no pudo unirse a la diana debido a la falta de especificidad y los linfocitos T no transducidos que no contenían CAR (cnt Neg) actuaron como controles negativos. Los resultados se muestran en la FIG. 15A-15C. Varios de los clones de JNL transducidos con CD20 mostraron una reactividad específica hacia las líneas celulares que expresan CD20 que aumentó de manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 12: Identificación de factores que predicen la recaída del sujeto a la terapia con CART CD19 en la leucemia linfocítica aguda de linfocitos B (LLA-B)

El presente ejemplo describe, entre otras cosas, la identificación de nuevas identificaciones genéticas transcripcionales que predicen la recaída del paciente a la terapia con CART CD19 (p. ej., terapia con CTL019) en la leucemia linfocítica aguda de linfocitos B (LLA-B), para su uso de acuerdo con la presente invención.

Entre otras cosas, el presente ejemplo describe identificaciones genéticas novedosas basadas en los niveles de expresión de ARNm de genes seleccionados en el paciente antes del tratamiento con CART CD19 (p. ej., CTL019) (aféresis o médula ósea) o en muestras de productos CART CD19 fabricados (p. ej., CTL019) antes de la reinfusión. En una realización, el presente ejemplo describe identificaciones genéticas novedosas que diferencian a los recidivantes frente a la terapia con CTL019 en LLA-B de los no recidivantes frente a la terapia con CTL019 en LLA-B.

El presente ejemplo describe métodos de selección imparcial de características para descubrir nuevas identificaciones genéticas que predicen la recaída del sujeto a la terapia con CD19CART (p. ej., CTL019) en LLA-B, para su uso de acuerdo con la presente invención.

El presente ejemplo también describe métodos de análisis de conjuntos de genes para descubrir nuevas identificaciones genéticas, para su uso de acuerdo con la presente invención.

Se identificaron nuevas identificaciones genéticas basadas en los niveles de expresión de ARNm en muestras de productos CART CD19 fabricados antes de la reinfusión que predicen la recaída del sujeto a la terapia con CART CD19 en la leucemia linfocítica aguda de linfocitos B (LLA-B). Las identificaciones identificadas se descubrieron en un estudio de secARN de genoma completo de muestras de productos fabricados que incluían 7 muestras de sujetos de LLA-B. Las muestras de sujetos de LLA-B (7 en total) se estratificaron de la siguiente manera: se tomaron muestras biológicas de 4 sujetos que no recayeron ("no recidivantes") después de la terapia con CTL019 y 3 sujetos que recayeron ("recidivantes") después de la terapia con CTL019. Se descubrieron varias identificaciones genéticas que diferencian a los recidivantes de los no recidivantes y a los recidivantes de los no recidivantes en muestras de productos fabricados y se describen con más detalle a continuación.

A continuación, se descubrieron nuevas identificaciones genéticas utilizando diversos enfoques analíticos de datos: 1) selección de características imparcial; 2) análisis de conjunto de genes; y 3) análisis de expresión diferencial de genes seleccionados de interés.

Se descubrieron nuevas identificaciones genéticas derivadas de una selección de características imparcial al determinar qué genes se expresaron de manera diferencial entre la comparación de 2 grupos de recidivantes y no recidivantes que comparó los 3 recidivantes con los 4 no recidivantes. Los genes se definieron como expresados diferencialmente si su expresión diferencial era estadísticamente significativa en la comparación de 2 grupos con un valor de corte de p de FDR de 0,25. La lista de genes para la comparación recidivante frente a no recidivante (N=17) se tabula en la Table 29. Se aplicaron modelos estadísticos de 2 grupos para determinar si el metagen era estadísticamente diferente entre los grupos y en la FIG. 32 se ilustra un esquema ejemplar que ilustra el enfoque. La FIG. 32 representa un mapa de calor ilustrativo de genes regulados positivamente en linfocitos T_{EF} activado frente a T_{EF} en reposo para sujetos con respuesta completa (CR), con respuesta parcial (PR) y que no respondían (NR) con LLC.

Sin desear limitarse a una teoría en particular, estos datos indican que el estado de diferenciación de los linfocitos T en el producto de CART CD19 (p. ej., CTL019) se correlaciona con la respuesta del sujeto (es decir, CR, PR o NR) y predicen la recaída del sujeto a la terapia con CART CD19 (p. ej., terapia con CTL019) en LLA-B. Las identificaciones genéticas de respondedores completos son muy probablemente células T_{REG} y T_{EFF} *en reposo*. Entre otras cosas, las identificaciones genéticas para recidivantes (p. ej., un sujeto con respuesta completa que recae frente a la terapia con CTL019) contienen genes regulados al alza en linfocitos T_{REG} frente a T_{EF} en reposo. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, estos datos indican que los recidivantes frente a la terapia con CART (p. ej., CTL019) en LLA-B tienen niveles mayores de T_{REG} en comparación con los no recidivantes frente a la terapia con CART (p. ej., CTL019). La FIG. 17 representa resultados ilustrativos que ilustran que los T_{REG} se enriquecen diferencialmente en los recidivantes (R) frente a los no recidivantes, p. ej., los recidivantes expresan altos niveles de genes de T_{REG} en comparación con sujetos con respuesta completa (CR) (p. ej., no recidivantes).

Tabla 29: Genes ilustrativos que predicen la recaída del paciente a la terapia con CTL019

Gen	**miRBase**	**Unigene**	**N.º de referencia**	**FDR**
MIR199A1	MI0000242		NR_029586,1	2,11E-05
PPIAL4D		Hs.730589	NM_001164261,1	3,94E-05
MIR1203	MI0006335		NR_031607,1	4,63E-03
uc021ovp				6,73E-03
ITM2C		Hs.111577	NM_001012514,2	1,17E-01
			NM_001012516,2	
			NM_001287240,1	
			NM_001287241,1	
			NM_030926,5	
HLA-DQB1		Hs.409934	NM_001243961,1	1,17E-01
			NM_001243962,1	
		Hs.534322		
			NM_002123,4	
TTTY10		Hs.461175	NR_001542,1	1,25E-01
TXLNG2P		Hs.522863	NR_045128,1	2,27E-01
			NR_045129,1	
MIR4650-1	MI0017277		NR_039793,1	2,27E-01
KDM5D		Hs.80358	NM_001146705,1	2,27E-01
			NM_001146706,1	

Gen	miRBase	Unigene	N.º de referencia	FDR
			NM_004653,4	
USP9Y		Hs.598540	NM_004654,3	2,27E-01
PRKY		Hs.584730	NR_028062,1	2,27E-01
RPS4Y2		Hs.367761	NM_001039567,2	2,27E-01
RPS4Y1		Hs.282376	NM_001008,3	2,27E-01
NCRNA00185		Hs.138453	NR_001543,3	2,28E-01
			NR_125733,1	
		Hs.729534	NR_125734,1	
		Hs.734681	NR_125735,1	
			NR_125736,1	
			NR_125737,1	
SULT1E1		Hs.479898	NM_005420,2	2,33E-01
EIF1AY		Hs.461178	NM_001278612,1	2,38E-01
			NM_004681,3	

Los siguientes genes mostraron niveles aumentados en recidivantes y niveles disminuidos en no recidivantes: MIR199A1, MIR1203, uc021ovp, ITM2C y HLA-DQB1. Los siguientes genes mostraron niveles disminuidos en recidivantes y niveles aumentados en no recidivantes: PPIAL4D, TTTY10, TXLNG2P, MIR4650-1, KDM5D, USP9Y, PRKY, RPS4Y2, RPS4Y1, NCRNA00185, SULT1E1 y EIF1AY.

El análisis del conjunto de genes produjo una serie de identificaciones genéticas que predicen la recaída del sujeto a la terapia con CTL019 en LLA-B.

Entre otras cosas, el presente ejemplo describe nuevas identificaciones de genes basadas en el análisis de conjuntos de genes, que predicen una recaída patente a la terapia con CART CD19 (p. ej., CTL019) en LLA-B. El análisis del conjunto de genes se realizó en tres conjuntos de genes, es decir, los conjuntos de genes se obtuvieron de (1) experimentos adicionales basados en experimentos no publicados de Szabo et al. (descritos a continuación); (2) conjuntos de genes publicados por Abbas et al. en Genome Research 2005; y (3) conjuntos de genes publicados por Gattinoni et al. en Nature Medicine 2011. Los conjuntos de genes definidos por Szabo, Abbs y Gattinoni y considerados en este análisis se describen en el Ejemplo 1 de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. 62/061553.

El conjunto de genes centrales de Szabo incluye los siguientes genes que están regulados al alza en los linfocitos Tef (16 h frente a 0 h): AIM2, ALAS1, B4GALT5, BATF, C3orf26, C4orf43, CCL3, CCL4, CCT3, CCT7, CD40LG, CHAC2, CSF2, CTNNA1, EBNA1BP2, EDARADD, EEF1E1, EIF2B3, EIF2S1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GFOD1, GLRX2, HSPD1, HSPE1, IFNG, IL15RA, IL21, IL2RA, IL3, KCNK5, KIAA0020, LARP4, LRP8, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MTCH2, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, OTUD7B, PAM, PDIA6, PEA15, PFKM, PGAM1, PGAM4, PPIL1, PRDX4, PRSS23, PSMD1, PSMD11, PSMD14, PTRH2, PUS7, RBBP8, RPF2, RPP25, SFXN1, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SORD, SPR, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TMCC2, TMEM165, TNFRSF9, TXN, TXNDC5, UCK2, VDR, WDR12, YWHAG y ZDHHC16. El conjunto de genes centrales de Szabo también incluye los siguientes genes que están regulados al alza en los linfocitos Treg (16 h frente a 0 h): AIM2, ALAS1, BATF, C5orf32, CCL17, CD40LG, CHAC2, CSF1, CTSL1, EBNA1BP2, EDARADD, EMP1, EPAS1, FABP5, FAM40B, FKBP4, FOSL1, GCLM, GK, GPR56, HMOX1, HSPD1, HSPE1, IKBIP, IL10, IL13, IL15RA, IL1RN, IL2RA, IL3, IL4, IL5, IL9, KCNK5, LTA, MANF, MIR1182, MIR155, MIR155HG, MYOF, NDUFAF1, NLN, NME1, NME1-NME2, PANX2, PDIA6, PGAM4, PPIL1, PPPDE2, PRDX4, PRKAR1B, PSMD1, PSMD11, PUS7, RBBP8, SLC27A2, SLC39A14, SLC43A3, SRXN1, STIP1, STT3A, TBX21, TNFRSF11A, TNFRSF1B, TNFRSF8, TNFRSF9, TXN, UCK2, VDR, VTRNA1-3, WDR12, YWHAG, ZDHHC16 y ZNF282.

Cada conjunto de genes (p. ej., conjuntos de genes Szabo, conjuntos de genes Abbas y conjuntos de genes Gattinoni) se evaluó para determinar su asociación con la respuesta del sujeto (es decir, recidivante o no recidivante) de la siguiente manera: se calculó un metagen para cada sujeto, donde la puntuación del metagen para el sujeto *j* se definió como

$$m_j = \sum_{i=G}^{1} x_{ij} - \mu(x_j) \Big/ \sigma(x_j)$$

donde x_{ij} es el valor de expresión del gen *i* en el sujeto j para un conjunto de genes dado *n=1,..,G*; $\mu(x_j)$ es la media de genes *1, ...*,G en el sujeto j; y $\sigma(x_j)$ es la desviación estándar de genes *1, ..., G* en el sujeto j.

Se aplicó un modelo estadístico de 2 grupos a cada conjunto de genes para determinar si el metagen era estadísticamente diferente entre el producto CTL019 fabricado de recidivantes y no recidivantes. En la FIG. 16 se proporciona un esquema que ilustra este enfoque. De los conjuntos de genes de Szabo, Abbas y Gattinoni, hubo un conjunto de genes que se enriqueció de forma significativamente diferencial entre los recidivantes y los no recidivantes. Este conjunto de genes era de la colección Szabo y contiene genes regulados al alza en linfocitos T_{REG} frente a T_{EF} en reposo, y se correlacionó con la recaída del paciente a la terapia con CTL019. Específicamente, se encontró que este conjunto de genes estaba enriquecido en los recidivantes, lo que indica que los recidivantes tienen niveles más altos de T_{REG} en comparación con los no recidivantes. Por ejemplo, se encuentra que la puntuación del metagen para el conjunto de genes compuesto por genes regulados positivamente en linfocitos T_{REG} en comparación con T_{EF} se correlacionan con la recaída del paciente en las muestras del producto (véase la FIG. 17). La FIG. 17 representa resultados ilustrativos (p = 0,000215) que ilustran que los genes de T_{REG} tienen altos niveles de expresión en recidivantes (R) en comparación con los no recidivantes, con respuesta completa (CR). El eje de abscisas son muestras por grupo de respuesta donde CR = respuesta completa y R = recidivante. El eje y son puntuaciones de expresión metagénica normalizadas.

Sin desear limitarse a una teoría en particular, estos datos indican que la disminución de la identificación de T_{REG} en el paciente antes de la aféresis o durante la fabricación del producto de CART reduce significativamente el riesgo de recaída del paciente.

Ejemplo 13: Las mutaciones de inserción son un mecanismo de resistencia a la terapia con CTL019 en la leucemia linfoide aguda de linfocitos B (LLA-B)

Se han descubierto varios mecanismos de resistencia al comparar los datos de secuenciación de ARNm de muestras de pacientes con LLA-B tomadas al inicio y después de la recaída. Determinados mecanismos de resistencia se denominan "recaída de CD19-", es decir, las células tumorales del paciente se caracterizan como CD19- ya que no se unen al epítopo FMC63 utilizado en CTL019 medido por citometría de flujo. Se han descubierto varios mecanismos de resistencia y se describen en detalle en este ejemplo.

Se realizó secuenciación de ARNm (secARN) para comparar los perfiles transcripcionales de pacientes con LLA-B antes del tratamiento con CTL019 y después de la recaída. Se consideraron tres pacientes: un paciente (Paciente #29), que era CD19- en el momento de la recaída, y dos pacientes (Pacientes #104 y #105), que eran CD19+ en el momento de la recaída. Véase la Tabla 30 a continuación para obtener una lista de pacientes, su clasificación y el porcentaje de leucemia en ambos puntos temporales.

Tabla 30.

Muestra	Tipo de recaída	% de leucemia en MO, inicial	% de leucemia en MO, recaída
Paciente n.º 29	CD19-	N/D	N/D
Paciente n.º 104	CD19+	33%	98,5%
Paciente n.º 105	CD19+	46 % pre-CART	65%

El análisis de los datos de secARN para el gen de CD19 reveló varias observaciones notables.

Se encontraron tres inserciones en el exón 2 de CD19. Las inserciones solo se encontraron en la muestra de recaída del paciente n.º 29. No se observaron lecturas que respaldaran ninguna de las tres inserciones, o cualquier otra inserción en el exón 2 de CD19, en los otros dos pacientes y al inicio del estudio para el paciente n.º 29. Las localizaciones genómicas y las inserciones reales se tabulan en la Tabla 31 a continuación.

Tabla 31.

Inserción	Ubicación	Tipo salvaje	Secuencia insertada
1	28943706	C	C → CA
2	28943707	A	A → AT
3	28943811	T	T → TTTGG

Las longitudes de las tres inserciones son de 1, 1 y 4 bases respectivamente y es probable que todas sean inserciones de cambio de marco. Las tres inserciones dan lugar a codones de parada prematuros dentro del exón 2 (para las inserciones 1 y 2 se produce un nuevo codón de parada en c16:28943752 y para la inserción 3 en c16:28943887). En la Tabla 32 a continuación se enumera el número de lecturas que respaldan la inserción y el

tipo salvaje, así como los porcentajes asociados. La inserción más frecuente es la "inserción 3", que es una inserción de 4 bases y se produce ~30 %. Por otra parte, de las 15 lecturas emparejadas que abarcan más de una inserción, ninguna de las lecturas emparejadas contenía más de una inserción, lo que sugiere que las inserciones se excluyen mutuamente.

Tabla 32.

Muestra	Ins1 (Ins, ts)	Ins2 (Ins, ts)	Ins3 (Ins, ts)
29B	0, 62	0, 62	0, 50
29R	21, 308	4, 327	67, 151
104B	0, 69	0, 69	0, 79
104R	0, 392	0, 398	0, 413
105B	0, 42	0, 42	0, 63
105R	0, 184	0, 185	0, 212

En la tabla, la "Muestra" enumera el número de paciente seguido de "B" para la muestra inicial o "R" para una muestra tomada tras la recaída. La columna etiquetada Ins1 indica el número de lecturas que muestran Ins1 (número de la izquierda) frente a la secuencia de tipo silvestre en esa posición (número de la derecha); la columna etiquetada Ins2 indica el número de lecturas que muestran Ins2 (número de la izquierda) frente a la secuencia de tipo silvestre en esa posición (número de la derecha); y etiquetada como Ins3 indica el número de lecturas que muestran Ins3 (número de la izquierda) frente a la secuencia de tipo silvestre en esa posición (número de la derecha). La tabla indica que solo el paciente 29 mostró estas tres inserciones, y las inserciones solo se observaron tras la recaída. Estos resultados sugieren que las inserciones en el exón 2 de CD19 generan resistencia en algunos pacientes.

Este trabajo identificó mecanismos de resistencia a la terapia con CTL019 en LLA-B, a saber, inserciones en el exón 2 de CD19 mediante las cuales las células tumorales se vuelven CD19- y resistentes a la terapia con CTL019. Esta observación brinda apoyo para una estrategia de combinación de CTL019 con CAR contra dianas distintas de CD19, p. ej., CD20, CD22 y ROR1.

Ejemplo 14: Expresión de antígenos de linfocitos B en pacientes con cáncer de LLA recidivante

Se determinó la expresión de diversos antígenos de linfocitos B en pacientes con cáncer de leucemia linfoblástica aguda (LLA) recidivantes que se habían tratado previamente con una terapia contra el cáncer distinta a la terapia con CAR, es decir, no habían sido tratados con ninguna terapia con CAR.

Métodos

Las muestras se obtuvieron como muestras de ensayo de médula ósea (MO) y sangre periférica (SP) de LLA humana primaria anonimizadas. Los anticuerpos anti-humanos se adquirieron de Abcam, Biolegend, Invitrogen, eBioscience o Becton Dickinson. Se aislaron células mononucleares mediante separación por Ficoll, se lavaron una vez en PBS complementado con suero de ternero fetal al 2 % y se tiñeron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la cuantificación del número de células se utilizaron perlas Countbright (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En todos los análisis, la población de interés se seleccionó en función de las características de dispersión directa frente a lateral seguidas de la compuerta singulete, y las células vivas se seleccionaron utilizando Live Dead Aqua (Invitrogen). Se incluyó el control de tiempo para el control de calidad. Para estudios en animales, se añadió el anticuerpo murino anti-CD45 (Biolegend) para eliminar los leucocitos murinos. La expresión superficial de CD22 se detectó mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD22 del clon HIB22 (Biolegend). La expresión superficial de CD123 se detectó mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD123 del clon 6H6 (ebioscience). La expresión superficial de FLT3 se detectó mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti-FLT3 del clon IM2234U (Beckman Coulter). La expresión superficial de ROR1 se detectó mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti-ROR1 del clon 2H6 (Abcam). La expresión superficial de CD79b se detectó mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti- CD79b del clon CB3-1 (Biolegend). La expresión superficial de CD79a se detectó mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD79a del clon HM47 (R&D Systems). La expresión superficial de CD10 se detectó mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD10 del clon eBioCV - CALLA (ebioscience). La expresión superficial de CD34 se detectó mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD34 del clon 561 (Biolegend). La expresión superficial de CD20 se detectó mediante tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD20 del clon L27 (BD Biosciences). La cuantificación de la expresión de antígeno celular en unidades de capacidad de unión de anticuerpos (ABC) se realizó utilizando QuantumTM Simply Cellular® (Bangs Lab., Inc) de acuerdo con el procedimiento estándar (http://static.abdserotec.com/uploads/ifu/fcsc815b.pdf). La citometría de flujo se realizó en un citómetro Fortessa-LSR de cuatro láseres (Becton-Dickinson) y se analizó con FlowJo X 10.0.7r2 (Tree Star).

Resultados

En los pacientes con LLA recidivante, se expresaron varios antígenos de linfocitos B, incluidos CD19, CD22, CD123, FLT-3, CD10 y CD34. Véase la FIG. 22.

Con el fin de identificar posibles dianas adicionales de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B), se analizaron muestras de 16 pacientes r/r mediante citometría de flujo multiparamétrica para los siguientes marcadores: CD19 (16 ptos), CD22 (16 ptos), CD123 (16 ptos), FLT-3 (9 ptos), ROR-1 (3 ptos), CD79b (15 ptos), CD179b (8 ptos), CD79a (16 ptos), CD10 (16 puntos), CD34 (16 puntos) y CD20 (16 puntos). CD22 y CD123 tuvieron expresión alta (>60 %) y homogénea en los blastos de pacientes con LLA r/r (la barra indica la mediana del % de expresión, respectivamente 99,50 %, 98,80 %, 95,70 %, 72,00 %, 47,00 %, 15,00 %, 13,45 %, 4,200 %, 98,00 %, 87,65 % y 7,00 %). (Figura 22).

Ejemplo 15: Expresión de antígenos de linfocitos B en pacientes con cáncer CD19 negativo recidivante

Se determinó la expresión de diversos antígenos de linfocitos B en pacientes que habían sido tratados previamente con un CAR CD19 y que habían recaído con tumores CD19 negativos. Se usó citometría de flujo según los métodos del ejemplo 14 para determinar la expresión de los antígenos, con una estrategia de activación representada en la FIG. 23.

La expresión de CD22 y CD123 se analizó en muestras de MO y SP de 6 pacientes recidivantes con leucemia negativa para CD19, tanto antes del tratamiento con CART19 (valor inicial) como después (recaída negativa para CD19). En todos los análisis, la población de interés se seleccionó en función de las características de dispersión directa frente a lateral seguidas de la compuerta singulete, y las células vivas se seleccionaron utilizando Live Dead Aqua (Invitrogen). Se incluyó el control de tiempo para el control de calidad. La estrategia de activación incluía: control temporal → SSC bajo → singuletes → vivo → CD45dim → CD10+.

Resultados

Casi todos los pacientes que se volvieron CD19 negativos permanecieron tanto CD22 positivos como CD-123 positivos. Véase la FIG. 24 y FIG. 25. Los resultados se resumen en la FIG. 26 y demuestran que, si bien el tratamiento CART con CD 19 produce una pérdida de la expresión de CD 19 (medida mediante citometría de flujo), la expresión de CD22 y CD123 sigue siendo alta.

Ejemplo 16: Tratamiento de acceso ampliado con linfocitos CART redirigidos a CD22 autólogos en neoplasias malignas de linfocitos B refractarias

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linfocitos B recidivante/refractaria (r/r) se asocia con un mal pronóstico tanto en pacientes pediátricos como adultos. Las nuevas terapias dirigidas a CD19 en blastos leucémicos, tales como los linfocitos T de receptores quiméricos para antígeno anti-CD19 (CART19, CTL019) o los anticuerpos anti-CD19/CD3 biespecíficos (blinatumomab) inducen respuestas significativas en esta población. Sin embargo, se han notificado recaídas negativas para CD19 en el 5-10 % de los pacientes que siguen terapias con CART19 o blinatumomab.

Métodos

Línea celular y muestras primarias

Las células de la línea celular de LLA, NALM-6, se mantuvieron en cultivo con medio RPMI complementado con suero de ternero fetal al 10 %, penicilina y estreptomicina. Para algunos experimentos, las células NALM-6 se transdujeron con luciferasa/GFP+ y, a continuación, se clasificaron para obtener una población positiva >99 %. Las líneas celulares de leucemia mieloide aguda MOLM-14 o K562 y la línea celular LLA-T JURKAT se usaron como controles negativos para CD22.

Se obtuvieron muestras de médula ósea (MO) y sangre periférica (SP) de LLA humana primaria no identificada y muestras de MO y SP de dos pacientes que recayeron después de la terapia con CART-19. Se recogieron blastos de LLA de pacientes tratados con CART-19 y recidivantes para leucemia negativa para CD19 al inicio (IR82, antes de la terapia con CART19) y en recaída (IR243). Las explosiones primarias de estos 2 puntos de tiempo se expandieron in vivo en ratones NSG y se transdujeron con luciferasa/GFP después de varios pasajes (Barrett, D et al. (2011) Blood 118(15):e112-117). Para todos los estudios funcionales, las células de LLA se descongelaron al menos 12 horas antes del análisis y se dejaron reposar a 37 °C.

Generación de construcciones de CAR y linfocitos CAR T

Se generó un receptor de antígeno quimérico (CAR) contra CD22 utilizando las secuencias de cadena ligera (L) y pesada (H) del fragmento variable de cadena única anti-CD22 descritas en la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2011/0020344 A1, que describe la generación de un anticuerpo monoclonal completamente humano anti-CD22 m971 (Xiao, X et al. (2009) MAbs. 1(3):297-303). Se optimizaron los codones de las secuencias y se generaron dos construcciones de CAR diferentes usando dos orientaciones de cadena variable diferentes (H a L y L a H). Estos dos scFv anti-CD22 se clonaron después en una cadena principal de CAR19 murino (bisagra de CD8, dominio coestimulante 41BB y dominio de señalización CD3 zeta) y posteriormente en el vector lentivírico pTRPE. El CAR19 murino se generó como se describió previamente (Milone, M et al. (2009) Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 17(8):1453-1464).

La producción de células T CAR positivas se realizó como se describió previamente (Gill, S et al. (2014) Blood 123(15):2343-2354). Se sembraron linfocitos T CD4 positivos y CD8 positivos de donantes normales a la concentración de 1e6/ml, con una relación CD4:CD8 de 1:1 y se expandieron en medio X-vivo 15 (Lonza, 04-418Q), suero humano AB 5 % (Gemini, 100-512), penicilina/estreptomicina (Gibco, 15070063) y Glutamax (Gibco, 35050061) utilizando Dynabeads anti-CD3/CD28 (Life Technologies, 11161D) añadidas el día 1 del cultivo y eliminadas el día 6. Los linfocitos T se transdujeron con lentivirus que portaban CAR22, CAR19 o se transfectaron de forma simulada el día 2. Los linfocitos T se expandieron en cultivo durante 10-15 días y se recogieron cuando la mediana del volumen celular estaba por debajo de 300 fl. A continuación, los linfocitos T se crioconservaron en FBS DMSO al 10 % para experimentos futuros. Antes de todos los experimentos, los linfocitos T se descongelaron y se dejaron reposar durante una noche a 37 °C.

Análisis de citometría de flujo multiparamétrico

Se adquirieron anticuerpos anti-humanos de Biolegend, eBioscience o Becton Dickinson. Las células se aislaron de cultivos *in vitro* o de animales, se lavaron una vez en PBS complementado con suero de ternero fetal al 2 % y se tiñeron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la cuantificación del número de células se utilizaron perlas Countbright (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En todos los análisis, la población de interés se seleccionó en función de las características de dispersión directa frente a lateral seguidas de la compuerta singulete, y las células vivas se seleccionaron utilizando Live Dead Aqua (Invitrogen). Se incluyó el control de tiempo para el control de calidad. Para estudios en animales, se añadió el anticuerpo murino anti-CD45 (Biolegend) para eliminar los leucocitos murinos. La expresión superficial de CAR anti-CD22 se detectó mediante tinción con proteína CD22-His (11958-H08H-50) y anticuerpo monoclonal anti-His-APC (IC050A). Se detectó CAR19 como se describió previamente (Kalos, M et al. (2011) Science translational medicine 3(95):95ra73). La cuantificación de la expresión del antígeno celular CD19 y CD22 en unidades de capacidad de unión de anticuerpos (ABC) se realizó en NALM-6 y controles utilizando QuantumTM Simply Cellular® (Bangs Lab., Inc) de acuerdo con el procedimiento estándar (http://static.abdserotec.com/uploads/ifu/fcsc815b.pdf). La citometría de flujo se realizó en un citómetro Fortessa-LSR de cuatro láseres (Becton-Dickinson) y se analizó con FlowJo X 10.0.7r2 (Tree Star).

Ensayo de desgranulación

El ensayo de desgranulación se realizó como se ha descrito previamente. Los linfocitos T se incubaron con células diana en una relación de 1:5 en medio de linfocitos T. Se añadieron al cocultivo anticuerpos anti-CD107a-PECY7 (Biolegend), anti-CD28 (BD Biosciences), anti-CD49d (BD Biosciences) y monensina (BD Biosciences) 30 minutos después del tiempo de inicio. Después de 4 horas, las células se recogieron y se tiñeron para expresión de CAR, tinción de CD3, CD8 y Live Dead aqua (Invitrogen). Las células se fijaron y permeabilizaron (tampones Invitrogen Fix/Perm) y luego se realizó la tinción intracelular para detectar múltiples citocinas (IFN, TNFa, IL-2, GM-CSF, MIP1b).

Ensayo de proliferación

Las células T se lavaron y resuspendieron a 1x107/ml en 100 µl de PBS y se tiñeron con 100 µl de CFSE 2,5 µM (Invitrogen) durante 5 minutos a 37 °C. Luego, la reacción se extinguió con medio frío y las células se lavaron tres veces. Las dianas se irradiaron a una dosis de 100 Gy. Los linfocitos T se incubaron en una relación 1:1 con las células diana irradiadas durante 120 horas, añadiendo medios a las 24 horas. A continuación, se recogieron las células, se tiñeron para CD3, CAR y Live Dead aqua (Invitrogen), y se añadieron perlas Countbright (Invitrogen) antes del análisis de citometría de flujo para la cuantificación absoluta.

Ensayos de citotoxicidad

Se utilizaron células NALM-6 luciferasa/eGFP+ o muestras de LLA primaria para el ensayo de citotoxicidad como se ha descrito previamente. Se incubaron 4 dianas en las relaciones indicadas con linfocitos T efectores durante 4 o 16 horas. La muerte se calculó bien mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia en una cámara IVIS-200 Spectrum de Xenogen o bien mediante citometría de flujo. Para esta última, las células se extrajeron y se añadieron perlas Countbright y 7-AAD (Invitrogen) antes del análisis. Las células diana vivas residuales eran positivas para CFSE y negativas para 7-AAD.

Mediciones de citocinas

Las células efectoras y diana se incubaron conjuntamente en una relación de 1:1 en medio de linfocitos T durante 24 horas. El sobrenadante se recolectó y analizó mediante una matriz Luminex de 30 plex (Luminex Corp, FLEXMAP 3D) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen) (Kalos, M et al. (2011)).

Experimentos in vivo

Se obtuvieron ratones cadena NOD-SCID-γ -/- (NSG). Todos los experimentos se realizaron conforme a protocolos autorizados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de la Universidad de Pensilvania. Los esquemas de los modelos de xenoinjerto utilizados se analizan en detalle en la sección de los resultados. Se inyectaron células (NALM-6 o linfocitos T) en 200 ul de PBS a la concentración indicada en las venas de la cola de los ratones. Se realizaron imágenes bioluminiscentes utilizando una cámara Xenogen IVIS-200 Spectrum y se analizaron con el programa informático LivingImage v. 4.3.1 (Caliper LifeSciencies). Los animales se sacrificaron al final del experimento o cuando fue necesario según las normas de IACUC.

Inmunohistoquímica

Se realizaron micromatrices de tejido (TMA) de 28 tejidos humanos normales (adiposo, suprarrenal, apéndice, cerebelo, cuello uterino, colon, endometrio, esófago, grasa, corazón, riñón, hígado, ganglio linfático, pulmón, músculo, ovario, páncreas, paratiroides, placenta, próstata, salival, espinal, bazo, estómago, testículo, timo, tiroides, amígdala) para evaluar la expresión de CD22 fuera del tumor (por triplicado). La tinción inmunohistoquímica (IHC) de tejidos incluidos en parafina fijados con formalina se realizó en un instrumento Leica Bond-III utilizando el sistema de detección de refinamiento de polímeros Bond. Los anticuerpos contra CD22 (Clon FPC1; Leica PA0249) se utilizaron sin diluir. La recuperación de epítopos inducida por calor se realizó durante 20 minutos con solución ER2 (Leica Microsystems AR9640). Las imágenes se adquirieron digitalmente utilizando el Aperio ScanScopeTM.

Perfiles de expresión génica.

La base de datos de expresión de ARN de acceso público (GeneAtlas U133A, gc) se analizó utilizando el sitio web BioGPS.org para la expresión de CD22. La mediana de la expresión de ARN de CD22 se indicó para 75 tipos de células normales humanas diferentes y 7 líneas de células tumorales (véase la figura 39).

Ensayo de liberación de 51-cromo

Para evaluar la posible toxicidad de CART22 fuera del tumor, se realizó un ensayo de liberación de cromo utilizando como diana tejidos humanos normales (CD34+, neuronas humanas, progenitores neuronales humanos, queratinocitos) y K562 o NALM-6 como controles. Las células diana se incubaron con 51Cr 50 µCi/0,5e6 células durante 1-2 horas a 37 °C. Las células se lavaron y se sembraron en placas por triplicado con células efectoras en diferentes relaciones E:T. Después de 4 horas de incubación, se colocó una alícuota de cada pocillo en una placa lectora y se secó durante una noche. Al día siguiente, se cuantificó la liberación de cromo usando un contador de centelleo líquido Microbeta Plus 1450. Resultados

Tabla 33: Sumario de los donantes y los respectivos experimentos realizados para la evaluación de CART22.

Donantes	Expansión	Desgran. + i.c. citocinas	Prolif. + Luminex	Destrucción	*In vivo*	Cribado de toxicología
1	✓	✓ X2	✓ X2	✓ X2	✓	
2	✓	✓				
3	✓				✓	✓
4	✓					
5	✓				✓	

Con el fin de identificar dianas potenciales de LLA-B, las muestras de 16 pacientes r/r y 4 pacientes recidivantes con enfermedad negativa para CD19 después del tratamiento con CART19 se examinaron mediante citometría de flujo multiparamétrica para el marcador de linfocitos B, CD22. CD22 tuvo expresión alta (>60 %) y homogénea en los blastos de 11/15 pacientes con LLA r/r (figura 27A). CD22 también fue positivo en 4/4 pacientes recidivantes con leucemia negativa para CD19, tanto antes del tratamiento con CART19 (valor inicial) como después (recaída negativa para CD19) (se muestran 2 pts) (figura 27B). (Estrategia de selección: SSC bajo → singletes → vivos → CD45dim).

Se muestra el esquema de las construcciones de CAR22 que se generaron usando diferentes orientaciones de cadena (H a L y L a H) en la figura 28A. El scFv anti-CD22 (m971) se optimizó por codones y se clonó en el vector murino CAR19 que contenía bisagra CD8, 41-BB coestimulante y dominios de señalización CD3 zeta. La expresión de CD19, CD22 y control de isotipo en la línea celular de LLA NALM6 se muestra como intensidad de fluorescencia media (IFM) (FIG. 28B) y capacidad de unión a anticuerpos (ABC) (FIG. 28C). Los resultados presentados en el presente documento demuestran que en las células NALM-6, la expresión de CD19 es mayor que la de CD22. Sin embargo, en la mayoría de las muestras de LLA primaria, las expresiones de CD19 y CD22 son similares (véase la FIG. 28A).

Se llevaron a cabo expansiones de linfocitos T de donantes normales para generar CART22 y CART19 (junto con células no transducidas (UTD)). Los tiempos de duplicación de la población y el volumen de linfocitos T se midieron en relación con los días de cultivo. Al final de la expansión (día 11 en cultivo) los CART22 y los linfocitos T de control alcanzaron alrededor de 4,5 duplicaciones de población (DP), sin diferencias significativas en comparación con CART19 o células UTD (figura 29A). El día 6 de cultivo, el volumen máximo fue aproximadamente 450 fl, mientras que, en los días siguientes, el volumen disminuyó hasta 300 fl cuando las células se recogieron y congelaron (figura 29B). No se observaron diferencias significativas frente a CART19 o UTD. La expresión de CAR en linfocitos T CD4-positivos y CD8-positivos se observó el día 11 de expansión mediante citometría de flujo (figura 29C). La selección de la expresión de CAR se basa en UTD. (Estrategia de selección: Linfocitos FSS frente a SSC → singletes → vivos → CD3+).

Se llevó a cabo un ensayo de desgranulación de CD107a con producción de citocinas intracitoplasmáticas. Se cocultivaron CART19, CART22 HtoL y LtoH con diferentes dianas (solo, PMA/IONOMICINA, MOLM-14 y NALM-6). CART19 y CART22 HtoL mostraron altos niveles de desgranulación de CD107a, producción de IL-2, IFNg y TNFa cuando se cultivan conjuntamente con la línea celular de LLA (NALM-6), pero no cuando se cultivan conjuntamente con controles negativos (figura 30). UTD y CART22 LtoH no muestran desgranulación ni producción de citocinas (figura 30). (Estrategia de selección: Linfocitos FSS frente a SSC → singuletes → vivo → CD3+).

En un ensayo de destrucción basado en luciferasa, CART22 y CART19 HtoL, pero no UTD, pudieron lisar las células NALM-6 cuando se cocultivaron durante 24 horas (figura 31). Se observó una correlación directa entre la actividad citotóxica y las relaciones E:T, con un mejor efecto antileucémico en una relación E:T 2:1 (78 % y 75 % de destrucción para CART19 y CART22).

En un ensayo de proliferación basado en CFSE, el cultivo conjunto durante 5 días de CART22 y CART19 con la línea celular NALM-6 de LLA condujo a una proliferación significativa de linfocitos T (94 % y 92,9 % respectivamente). También se muestran los controles (TCM= medio solo, P-I= PMA/ionomicina, MOLM-14) (figura 32A). Los histogramas que muestran la dinámica de la dilución de CFSE en CART19 y CART22 demuestran que la mayoría de los linfocitos T experimentaron múltiples ciclos proliferativos (figura 32B). (Estrategia de selección: Linfocitos FSS frente a SSC → singletes → vivos → CD3+)

Los linfocitos CART22, CART19 y UTD se incubaron durante 24 horas con diferentes dianas irradiadas (solo, PMA/ionomicina, MOLM-14 y NALM-6). Cuando se cocultivaron con la línea celular NALM-6 de LLA, solo CART22 y CART19 HtoL pudieron liberar múltiples citocinas (aquí se muestran IFNg, IL-2, GM-CSF, TNFa y MIP1b) (figura 33).

Los linfocitos CART22, CART19 y UTD se incubaron conjuntamente durante 4 horas con blastos procedentes de un paciente con LLA (CHP-959-101) al inicio y después del tratamiento con CART19 cuando el paciente tuvo recaída de una enfermedad negativa para CD19. Se midió la desgranulación. Tanto CART19 como CART22 fueron capaces de desgranular al inicio (cuando los blastos son CD19+ y CD22+) pero en la recaída solo CART22 estaba desgranulando (cuando la enfermedad es negativa para CD19) (figura 34A). La desgranulación de CD107a se midió en el efector de CART19 y CART22 CD8 positivo y CD8 negativo después de la incubación con la muestra de CHP101 en la recaída. Solo CART22 mostró desgranulación en linfocitos T tanto CD8 como CD4 (figura 34B). (Estrategia de selección: Linfocitos FSS frente a SSC → singuletes → vivo → CD3+).

La eficacia de CART22 *in vivo* contra NALM-6 se evaluó de la siguiente manera: Se inyectaron 1 millón de células luciferasa+ NALM-6/ratón i.v. en ratones NSG. Después de 6 días, se evaluó el injerto del tumor mediante bioluminiscencia. A continuación, los ratones se aleatorizaron para recibir linfocitos T no transducidos o diferentes dosis de CART22 (de 1,25 a 5 millones de células totales/ratón, con un 75 % de expresión de CAR). A continuación, se supervisó la carga tumoral, la expansión de linfocitos T SP y la supervivencia de los ratones (figura 35A). Se midió la carga tumoral por bioluminiscencia (BLI) y se observó una respuesta antileucémica relacionada con la dosis. Los ratones que recibieron 5e6 linfocitos CART22 mostraron un mejor control del tumor (figura 35B). Los ratones tratados con CART22 mostraron una mejor supervivencia general (SG) estadísticamente significativa en comparación con los ratones tratados con UTD. Para la SG hubo una correlación significativa entre la dosis más alta de CART22 y una mejor SG (figura 35C). La expansión de linfocitos T *in vivo* se supervisó semanalmente mediante extracción de sangre retrorbitaria. Una semana después de la infusión de linfocitos T, los ratones que recibieron la dosis más alta de CART22 mostraron la mejor expansión de CART (mediana de 12 linfocitos T/µl) (figura 35D).

La comparación *in vivo* entre CART22 y CART19 frente a NALM-6 se evaluó de la siguiente manera: Se inyectaron 1 millón de células luciferasa+ NALM-6/ratón i.v. en ratones NSG. Después de 6 días, se evaluó el injerto del tumor mediante bioluminiscencia. A continuación, los ratones se aleatorizaron para recibir linfocitos T no transducidos, CART19 o CART22 (5 millones de células en total, con un 75 % de expresión de CAR). A continuación, se controló la carga tumoral, la expansión de linfocitos T SP y la supervivencia de los ratones (figura 36A). Se midió la carga tumoral por bioluminiscencia (BLI) y se observó una respuesta antileucémica en los ratones tratados con CART22 y CART19, mientras que los ratones UTD progresaron rápidamente (figura 36B). Los ratones tratados con CART19 mostraron una mejor supervivencia general (SG) en comparación con CART22, posiblemente debido a la diferente expresión diana en NALM-6 (CD19>>CD22) (figura 36C).

CART22 y CART19 se compararon *in vivo* en un modelo de LLA primaria. Los blastos de un paciente con LLA primaria (JH331) se pasaron *in vivo* y se transdujeron con luciferasa para seguir la carga tumoral. Se inyectaron 1 millón de células luciferasa+ JH331/ratón i.v. en ratones NSG. Después de 14 días, se evaluó el injerto del tumor mediante bioluminiscencia. A continuación, los ratones se aleatorizaron para recibir linfocitos T no transducidos, CART19 o CART22 (5 millones de células en total, con un 75 % de expresión de CAR). A continuación, se controló la carga tumoral, la expansión de linfocitos T SP y la supervivencia de los ratones (figura 37A). Se midió la carga tumoral por bioluminiscencia (BLI) y se observó respuesta antileucémica en ratones tratados con CART22 y CART19, mientras que los ratones tratados con células UTD progresaron rápidamente (figura 37B).

Se realizaron micromatrices de tejido para la expresión de CD22 en 28 tejidos humanos normales mediante tinción inmunohistoquímica. Los órganos linfoides resultaron positivos para la expresión de CD22 (amígdala, ganglio linfático, bazo y timo) (figura 38A). Ninguno de los órganos no linfoides mostró expresión de CD22 (figura 38B). Se observaron linfocitos B residentes positivos para CD22 en múltiples tejidos (figura 38C).

Se observó expresión de ARN de CD22 en un alto nivel en linfocitos B, amígdalas y ganglios linfáticos, como se muestra en los datos de expresión de GeneAtlas U133A. Las líneas celulares de linfoblastos B y leucemia/linfoma también fueron muy positivas (figura 39).

Tanto CART22 como CART19, pero no los linfocitos UTD, desencadenaron la lisis de la línea celular de LLA NALM-6 en un ensayo de liberación de 51-cromo para la toxicidad de CART22 (figura 40). No se observó ningún efecto citotóxico de CART22 en ningún tejido normal (CD34+, progenitores neuronales humanos o neuronas y queratinocitos) o control (línea celular K562).

Ejemplo 17: Combinación de linfocitos CAR T anti-CD19 y anti-CD123 para el tratamiento y la prevención de recaída por pérdida del antígeno

La leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B) recurrente o refractaria (r/r) a la quimioterapia se asocia con un mal pronóstico pero, como se ha demostrado recientemente, sigue siendo sumamente sensible al sistema inmunitario. En particular, los linfocitos T con receptor quimérico para antígeno anti-CD19 (CART19, CTL019) y anticuerpos biespecíficos anti-CD19/CD3 (blinatumomab) generan tasas de respuesta completa sin precedentes de 45-90 % de esta población de pacientes. Ambas estrategias redirigen linfocitos T autólogos para que reconozcan células que expresan CD19. Blinatumomab utiliza una infusión a largo plazo continua de una construcción biespecífica que combina un fragmento variable monocatenario (scFv) anti-CD19 con un scFv anti-CD3; en el caso de CART19 los linfocitos T se modifican genéticamente para expresar un scFv anti-CD19 fusionado con el receptor de linfocitos T que señaliza con dominios coestimulantes integrados. Un estudio reciente mostró que un 90 % de los pacientes con LLA-B r/r tratados con CTL019 alcanzan una remisión completa (RC) con una supervivencia general (SG) de un 78 % a los 6 meses. También se obtuvieron resultados alentadores con CART19 en pacientes con otras neoplasias de linfocitos B tales como la leucemia linfocítica crónica y linfoma no hodgkiniano.

Sin embargo, un subconjunto de pacientes tratados con CART19 o blinatumomab tiene recaídas y una porción significativa de estas recaídas están caracterizadas por la pérdida de CD19. En LLA-B, se ha informado de recaídas negativas para CD19 en un 10-20 % de los pacientes que seguían terapias con CART19 o blinatumomab y esto no se ha descrito en las configuraciones de otros tratamientos; en general aproximadamente un 30 % de las recaídas después de blinatumomab y hasta un 50 % después de CART19 son negativas para CD19. CD19 es un marcador de linfocitos B prototípico que se expresa desde etapas muy tempranas del desarrollo de linfocitos B hasta el linfocito B maduro. CD19 desempeña una función importante en la biología de linfocitos B ya que los linfocitos B deficientes en CD19 muestran una desventaja de crecimiento selectiva. Por lo tanto, la ausencia de CD19 es un hallazgo muy inusual en la B-ALL y se ha informado solo en pacientes raros antes de la era de las inmunoterapias potentes dirigidas a CD 19. El posible mecanismo de pérdida del antígeno se está investigando en la actualidad y lo más probable es que esté provocado por la presión selectiva en los subclones de leucemia ejercida por estos potentes agentes anti-CD19. Debido a la reciente aprobación por la FDA de blinatumomab y la condición de gran avance otorgada a CTL019, es probable que un número creciente de pacientes con LLA-B r/r sean tratados con estos agentes. Por tanto, se necesitan estrategias eficaces novedosas con el fin de ser capaces de tratar aquellos pacientes que tendrán recaídas con blastos negativos para CD19 después de CART19 o

blinatumomab. Idealmente, una nueva estrategia trataría no solo a los pacientes con una recaída activa por pérdida de antígeno sino que si se empleara desde el principio podría potencialmente prevenir su aparición.

El receptor alfa de interleucina-3 (o CD123) está implicado en la hematopoyesis y se ha mostrado que está expresado en varias neoplasias hemáticas, que incluyen leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoide aguda (LLA), neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, tricoleucemia y linfoma de Hodgkin. A diferencia de los antígenos superficiales asociados al linaje tales como CD33 (mieloide) o CD19 (linfoide B), CD123 se expresa de manera jerárquica en las células progenitoras hematopoyéticas y en LMA CD123 se expresa en células madre leucémicas que están implicadas en la resistencia a la quimioterapia y la recaída después del tratamiento inicial. Debido a estas características, CD123 ha generado un gran interés para la terapia dirigida, y se están desarrollando múltiples agentes tales como la proteína de fusión IL3-toxina diftérica (SL-401, DT388IL3), anticuerpos monoclonales anti-CD123 desnudos (CSL-360, CSL-362), conjugados anticuerpo-fármaco, anticuerpos biespecíficos o construcciones de fusión CD3Fc-IL3 y, más recientemente, linfocitos T con receptor antigénico quimérico anti-CD123. Algunas de estas estrategias se están validando en la actualidad en ensayos clínicos y muchas más serán estudiadas en entornos clínicos en los próximos años. El direccionamiento a CD123 con linfocitos T receptores quiméricos para antígenos (CART123) puede conducir a respuestas profundas y a largo plazo en xenoinjertos de LMA primaria humana y puede establecer una memoria de linfocitos T antileucémica. Aquí, CD123 se expresa en recaídas de LLA-B negativas para CD19 que se producen después de terapias dirigidas a CD19 y que los linfocitos T CAR-123 combinadas con CART19 (CTL019) son una terapia eficaz para el tratamiento y la prevención de recaídas de pérdida de antígeno en xenoinjertos de LLA-B.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y muestras primarias. Las líneas celulares se obtuvieron originalmente de ATCC (Manassas, VA) (K-562) o DSMZ (Braunschweig, Alemania) (MOLM-14 y NALM-6). Se analizaron todas las líneas celulares para detectar la presencia de contaminación por micoplasma (MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit, LT07-318, Lonza, Basilea, Suiza). Para algunos experimentos, las líneas celulares se transdujeron con luciferasa de luciérnaga/eGFP y a continuación se clasificaron para obtener una población positiva >99 %. La línea celular K-562 positiva para luciferasa también se transdujo con CD19 truncado o CD123 truncado para obtener líneas celulares que expresaban solamente CD123, solamente CD19 o ninguno de ellos. MOLM-14 y K562 se utilizaron como controles como se indica en las figuras relevantes. Las líneas celulares se mantuvieron en cultivo con medio RPMI 1640 (Gibco, 11875-085, LifeTechnologies, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Gemini, 100-106, West Sacramento, CA) y 50 UI/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco, LifeTechnologies, 15070-063). Se obtuvieron muestras no identificadas de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) de LLA humana primaria de las consultas clínicas de la Universidad de Pensilvania/Hospital Infantil de Filadelfia conforme al protocolo del Comité de Revisión Institucional (IRB, por sus siglas en inglés), adquirido del Centro de Células Madre y Xenoinjertos (*Stem Cells and Xenograft Core*) de la Universidad de Pensilvania o de muestras de investigación de los ensayos clínicos con CTL019 actuales (Laboratorio de Traslación y Estudios Correlativos (*Translation and Correlative Study Laboratory*), en la Universidad de Pensilvania). Para todos los estudios funcionales, las células primarias se descongelaron al menos 12 horas antes del experimento y se dejaron reposar a 37 °C.

Expansión *in vivo* de blastos de LLA-B primaria. Métodos divulgados en D. M. Barrett, A. E. Seif, C. Carpenito, D. T. Teachey, J. D. Fish, C. H. June, S. A. Grupp, G. S. Reid, Noninvasive bioluminescent imaging of primary patient acute lymphoblastic leukemia: a strategy for preclinical modeling. *Blood* 118, e112-117 (2011).

Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) e inmunohistoquímica. El análisis FISH y la inmunohistoquímica se realizaron según el método convencional y como se describe. (M. A. Belaud-Rotureau, M. Parrens, P. Dubus, J. C. Garroste, A. de Mascarel, J. P. Merlio, A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*, Inc 15, 517-525 (2002)). El análisis FISH se realizó según el método convencional. En resumen, las células de LLA recogidas se suspendieron en fijador (ácido acético y metanol), se depositaron en los portaobjetos y se dejó que se secaran. Se aplicó la sonda de color doble para fusión génica BCR/ABL (Abbott Molecular) en la solución de tampón de hibridación. Los portaobjetos se cubrieron, se sellaron y se dejaron dentro de una cámara HYBrite a 37 °C durante 6 h. Después de retirar el sellante y el cubreobjetos, los portaobjetos se lavaron dos veces, se secaron con una sustancia absorbente, se secaron y se contratiñeron con DAPI. Los portaobjetos se examinaron en un microscopio fluorescente, y se evaluaron como mínimo 200 núcleos en cada muestra.

Generación de construcciones de CAR y linfocitos CAR T. El receptor quimérico para antígeno anti-CD19 murino (bisagra CD8, dominio coestimulante 4-1BB y dominio de señalización CD3 zeta) se generó como se ha descrito previamente. (Milone, *et al., Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 1453-1464 (2009) e Imai *et al., Leukemia* 18, 676-684 (2004)). Esta es la misma construcción utilizada en la actualidad en los ensayos clínicos con CTL019 en la Universidad de Pensilvania. Para scFv CAR123 anti-CD123 (construcción 1172 (SEQ ID NO: 707, y como se describe en el documento PCT/US2014/017328) se utilizó y el mismo constructo de esqueleto de CAR19. La producción de células T que expresan CAR se realizó como se

describió previamente. (Gill *et al., Blood* 123, 2343-2354 (2014)). Las células T CD4 y CD8 de donantes normales o las células mononucleares PB (PBMC) se obtuvieron del Núcleo de Inmunología Humana de la Universidad de Pensilvania. Las células T se sembraron a 1×10^6/ml con una relación CD4:CD8 de 1:1 y se expandieron en medio X-vivo 15 (Lonza, 04-418Q), suplementado con suero AB humano al 5% (Gemini, 100-512), penicilina/estreptomicina (Gibco, 15070063) y Glutamax (Gibco, 35050061) utilizando Dynabeads anti-CD3/CD28 (Life Technologies, 11161D) añadidos el día 1 del cultivo y retirados el día 6. Las células T se transdujeron con lentivirus el día 2. Los linfocitos T se expandieron en cultivo durante 8-15 días y se recogieron cuando la mediana del volumen celular estaba por debajo de 300 fl. A continuación, se crioconservaron los linfocitos T en FBS con un 10 % de DMSO para experimentos futuros. Antes de todos los experimentos, los linfocitos T se descongelaron y se dejaron reposar durante una noche a 37 °C.

Citometría de flujo multiparamétrica Se realizó citometría de flujo tal como se ha descrito previamente (Kenderian, *et al., Leukemia*, (2015)). Se adquirieron anticuerpos anti-humanos de Biolegend, eBioscience o Becton Dickinson. Las células se aislaron de cultivos *in vitro* o de animales, se lavaron una vez en PBS complementado con suero de ternero fetal al 2 % y se tiñeron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la cuantificación del número de células se utilizaron perlas Countbright (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. En todos los análisis, la población de interés se seleccionó en función de las características de dispersión frontal frente a lateral y después se realizó una selección de singuletes, y las células vivas se seleccionaron utilizando Live Dead Fixable Aqua (Invitrogen). Se incluyó el control de tiempo para el control de calidad. La expresión superficial de CAR19 se detectó como se ha descrito previamente, utilizando un anticuerpo anti-idiotípico. La detección de CAR123 se realizó utilizando anticuerpo de cabra anti-ratón (Jackson Laboratories) o CD123-Fc/His (Sino Biologicals) y anti-His-APC (R&D) o PE (AbCam). La citometría de flujo se realizó en un citómetro de cuatro láseres Frotessa-LSR II (Becton-Dickinson) y se analizó con FlowJo X 10.0.7r2 (Tree Star).

Ensayos de la función efectora de linfocitos T *in vitro*. Los ensayos de desgranulación, proliferación con CFSE y citotoxicidad se realizaron como se ha descrito previamente. (Gill *et al., Blood* 123, 2343-2354 (2014) y Kalos *et al., Science translational medicine* 3, 95ra73 (2011)).

Ensayo de desgranulación. En resumen, los linfocitos T se incubaron con células diana en una relación 1:5 en medio para linfocitos T. Se añadieron al co-cultivo anticuerpos anti-CD107a-PECY7 (Biolegend), anti-CD28 (BD Biosciences), anti-CD49d (BD Biosciences) y monensina (BD Biosciences). Después de 4 horas, las células se recogieron y se tiñeron para expresión de CAR, tinción de CD3, CD8 y Live Dead aqua (Invitrogen). Las células se fijaron y permeabilizaron (tampones Invitrogen Fix/Perm) y a continuación se realizó una tinción intracelular para detectar múltiples citocinas (IFN, TNFα, IL-2, GM-CSF, MIP1β).

Ensayo de proliferación. Las células T se lavaron y resuspendieron a 1×10^7/ml en 100 ul de PBS y se tiñeron con 100 ul de CFSE 2,5 uM (Invitrogen) durante 5 minutos a 37 °C. Luego, la reacción se extinguió con medio frío y las células se lavaron tres veces. Las dianas se irradiaron a una dosis de 100 Gy. Las células T se incubaron en una relación 1:1 con las células diana irradiadas durante 120 horas, añadiendo medios a las 24 horas. A continuación, se recogieron las células, se tiñeron para CD3, CAR y Live Dead aqua (Invitrogen), y se añadieron perlas Countbright (Invitrogen) antes del análisis de citometría de flujo para la cuantificación absoluta.

Ensayos de citotoxicidad. Se utilizaron líneas celulares de luciferasa/eGFP+ para el ensayo de citotoxicidad como se ha descrito previamente. En resumen, las dianas se incubaron a las relaciones indicadas con linfocitos T efectores durante 24 horas. La destrucción se calculó mediante imágenes de bioluminiscencia en una cámara Xenogen IVIS-200 Spectrum.

Mediciones de citocinas. Las células efectoras y diana se incubaron conjuntamente en una relación de 1:1 en medio para linfocitos T durante 24. El sobrenadante se recogió y se analizó mediante una matriz 30-plex Luminex (Luminex Corp, FLEXMAP 3D) según el protocolo del fabricante (Invitrogen).

Experimentos en animales. Los experimentos *in vivo* se realizaron tal como se ha descrito previamente. (Kenderian, *et al., Leukemia*, (2015)). Los esquemas de los modelos de xenoinjerto utilizados se analizan en detalle en las figuras relevantes, resultado. Se compraron NOD-SCID-cadena γ -/- (NSG) obtenidos originalmente de Jackson Laboratories del Centro de Células Madre y Xenoinjertos de la Universidad de Pensilvania. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con un protocolo (n.º 803230) aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC, por sus siglas en inglés) que se adhiere a la guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Las células (líneas celulares de leucemia o linfocitos T) se inyectaron en 200 ul de PBS a la concentración indicada en la vena de la cola de ratones. Se realizaron imágenes bioluminiscentes utilizando una cámara Xenogen IVIS-200 Spectrum y se analizaron con el programa informático LivingImage v. 4.3.1 (Caliper LifeSciencies). Los animales se sacrificaron al final del experimento o cuando cumplieron los puntos finales preespecificados según los protocolos de IACUC.

Microscopia multifotónica. Los ratones se anestesiaron y se mantuvieron a una temperatura central de 37 °C. Se obtuvieron imágenes de la médula ósea después de retirar el cuero cabelludo e inmovilizar el cráneo. La obtención de imágenes se realizó utilizando un sistema de microscopio 2-fotónico Leica SP5 (Leica Microsystems)

equipado con un láser de picosegundos (Coherent). Cada adquisición de imágenes duró 20 minutos seguida por una evaluación de la sedación del ratón. Se excitaron Violeta CellTrace, GFP y Naranja CellTrace (o TRITC) utilizando luz láser de 850 nm. Las imágenes se obtuvieron utilizando una lente de inmersión en agua 20x. Las imágenes resultantes se analizaron con el software Velocity (PerkinElmer).

Análisis estadístico. Todos los estudios estadísticos se realizaron como se indica utilizando GraphPad Prism 6 para Windows, versión 6.04 (La Jolla, CA). Se utilizó la prueba de la t de Student para comparar dos grupos; en el análisis en el que se compararon múltiples grupos, se realizó un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con corrección de Holm-Sida para comparaciones múltiples. Cuando se compararon múltiples grupos en múltiples puntos temporales/relaciones, se utilizó la prueba de la t de Student o ANOVA para cada punto temporal/relación. Las curvas de supervivencia se compararon utilizando la prueba del orden logarítmico. En las figuras, los asteriscos se utilizan para representar los valores de p (*=<0,05, **=<0,01, ***=<0,001, ****=<0,0001) y "ns" significa "no significativo" (p>0,05). Se enumeran detalles adicionales de los estudios estadísticos para cada experimento en las leyendas de las figuras.

RESULTADOS

CD123 se expresa en LLA-B, en las células madre de leucemia y en las recaídas negativas para CD19

Con el fin de evaluar la expresión de CD123 en la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B, se analizaron 42 muestras de pacientes con LLA adultos y pediátricos, incluidos 14 sujetos participantes en los presentes ensayos clínicos con CTL019 de los autores. Como se muestra en la figura 49A, 49B y 49A, CD123 está expresado de manera elevada y homogénea en la superficie de la mayoría de blastos de LLA, y representa un candidato ideal para la terapia dirigida. Además, también se ha observado que CD123 se expresa en las células madre de leucemia (LSC, por sus siglas en inglés) potenciales, identificadas como CD34+ CD38- (figura 49C). Se pueden identificar pequeños subconjuntos de blastos negativos para CD19 en algunos pacientes con LLA-B y estas células podrían contribuir a las recaídas por pérdida de antígeno, si contienen células con un fenotipo maligno. Para evaluar la presencia de la enfermedad en subconjuntos negativos para CD19, se clasificaron células CD19-CD123+ de una población masiva de B-ALL positiva para el cromosoma Filadelfia (CD45dim, estrategia de selección que se muestra en la Figura 56B). Se observó que estas células fueron clonales para la translocación BCR-ABL, aunque con una frecuencia menor que los blastos CD19+ (figura 49D). Este hallazgo indica que tener como diana solo CD19 podría, en algunos casos, conllevar una recaída subclonal derivada de células CD19-CD123+. Además, este hallazgo sugiere que tener como diana CD123 podría conllevar respuestas más profundas mediante la eliminación de LSC y posiblemente clones de leucemia negativos para CD19.

Finalmente, la expresión de CD123 también se evaluó en las muestras de pacientes con LLA-B recidivantes después de CTL019 con pérdida de CD19. De manera importante, en contraste con la pérdida completa de CD19, la mayoría de los pacientes mantuvieron la expresión de CD123 en la recaída (figuras 49E, 49F y 56C). Estos hallazgos indican que CD123 representa un marcador ideal cuando se tienen como diana blastos LLA negativos para CD19 que se producen después de CART19 o blinatumomab.

Los linfocitos T con receptor quimérico para antígeno anti-CD123 son activos contra LLA-B humano in vitro e in vivo

Se generaron linfocitos T receptores de antígeno quimérico anti-CD123 (CART123) que se transdujeron de forma lentivírica y se expandieron con perlas magnéticas anti-CD3/CD28. Se evaluaron la actividad *in vitro* e *in vivo* de CART123 contra leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B como se describe en el presente documento.

Se utilizaron la línea celular LLA-B NALM-6 que es CD19++ y CD123+ (figuras 50A y 57A) y muestras de LLA-B primaria. Una comparación *in vitro* directa entre CART123 y CART19 reveló tasas similares de desgranulación con CD107a cuando los linfocitos T se cocultivaron con NALM-6 o LLA primaria (figura 50B). Los CART123 también fueron capaces de provocar la muerte de células NALM-6 con una eficacia similar a CART19 de una manera dependiente de la dosis (figura 50C). En experimentos a mayor plazo, CART123 proliferó (figuras 50D y 50E) y produjo múltiples citocinas (figura 50F) cuando se cocultivó con NALM-6 o LLA primaria durante 3-5 días. Estos resultados indican que CART123 presenta una potencia equivalente a CART-19 contra múltiples dianas de LLA-B.

Con el fin de confirmar estos datos en un modelo *in vivo*, se utilizó un modelo de LLA primaria. En este modelo, se realizó un pase de blastos primarios obtenidos de pacientes con LLA-B a ratones NOD-SCID-supresión de la cadena γ (NSG) y se transdujeron con una construcción indicadora que contenía eGFP y luciferasa de elatéridos (GFP/Luc). A todos los ratones se les inyectó GFP/blastos de LLA primaria Luc+ i.v. (JH331, CD19+, CD123+, añadir fenotipo) y, después del injerto, los ratones se distribuyeron aleatoriamente para recibir CART19, CART123 o linfocitos T no transducidos (UTD) de control. Los ratones tratados con linfocitos T de control sucumbieron rápidamente a la enfermedad, mientras que los ratones tratados con CART19 o CART123 mostraron erradicación del tumor y supervivencia a largo plazo (figuras 51A y 51B). Los linfocitos T CAR123 se expandieron significativamente en la sangre periférica (SP) de los ratones en comparación con los linfocitos T de control y expresaron niveles elevados de CAR123 (figura 51C). La actividad antileucémica de CART123 fue específica y

basada en el reconocimiento de CD123 en la superficie de los blastos ya que cuando los autores injertaron en ratones una leucemia CD123- CD19+ (AV576), solo CART19 mostró actividad antileucémica, mientras que CART123 no tuvo efecto en comparación con los controles UTD (figuras 57B y 57C).

Para detectar una posible correlación entre la dosis de CART 123 y la actividad antitumoral, se desarrolló un modelo in vivo de ratones con alta carga de leucemia (utilizando la línea celular NALM-6). En este modelo, las dosis convencionales de CART123 (2 millones de células CAR+) no son capaces de eliminar el tumor. A estos ratones se les inyectaron diferentes dosis de CART123 (1,25, 2 y 5 millones de células CAR+) y se observó una actividad antileucémica relacionada con la dosis (figura 57D).

CART123 pero no CART19 son muy activos en un modelo preclínico nuevo de recaída con pérdida de antígeno

Con el fin de estudiar nuevas estrategias para tener como diana recaídas negativas para CD19, se desarrolló un modelo *in vivo* novedoso de recaída por pérdida de antígeno. Se recogieron blastos de linfocitos B de un paciente (CHP101) participante en uno de los ensayos clínicos con CTL019 de los autores en la situación inicial (antes de la terapia con CTL019), cuando la enfermedad era CD19++ y CD123+, y con recaída después de CTL019 cuando el paciente desarrolló una enfermedad negativa para CD19 (CD123 aún se expresaba, figura 58A). A continuación, se expandieron los blastos en ratones NSG y se transdujeron con luciferasa verde de elatéridos (CBG, por sus siglas en inglés) para la enfermedad inicial (CD19+) o luciferasa roja de elatéridos (CBR, por sus siglas en inglés) para recaídas (CD19-) (véase la sección de métodos). De manera importante, durante la expansión *in vivo*, los blastos mantuvieron la identidad de linfocitos B excepto para CD19 (datos que no se muestran). En un primer experimento, se injertó en ratones NSG la enfermedad inicial CD19+ (CBG, verde) o la leucemia negativa para CD19 (CBR, roja). Ambos grupos se distribuyeron de manera aleatoria para recibir CART19 o linfocitos T de control (UTD) (figura 52A). Como se muestra en la figura 52B, en ambos grupos los ratones tratados con UTD mostraron una evolución rápida tanto de la enfermedad inicial como con recaída, independientemente de la expresión de CD19. En cambio, en el grupo de ratones tratados con CART19, solo los ratones con injerto de la enfermedad inicial (positivos para CD19) respondieron al tratamiento con CART19 mientras que los ratones con injerto de la enfermedad con recaída (negativa para CD19) mostraron resistencia como se esperaba. Esto también se reprodujo in vitro en un ensayo de desgranulación con CD107a (figura 58B). Para simular in vivo la presencia de diferentes clones que expresan CD 19 o carecen de él, se injertaron ratones NSG con una mezcla 1:1 de enfermedad basal y de recaída; el día 8, los ratones fueron aleatorizados para recibir CART19 o células T de control. La carga tumoral se controló con imágenes de bioluminiscencia que podían discriminar entre el crecimiento relativo de leucemia CD19+ (CBG, verde)/CD19- (CBR, rojo) in vivo. Como se muestra en la figura 52C, en los ratones que recibieron UTD tanto la leucemia CD19+ (verde) como la CD19- (roja) presentes el día 6 aumentaron de manera similar el día 11, mientras que en los ratones tratados con CART19 la enfermedad inicial (verde) se eliminó completamente mientras que la enfermedad recidivante (roja) mostró progresión.

Este modelo único de xenoinjerto de LLA-B primaria CD19-negativa y falla de CART 19 se utilizó para evaluar el papel de CART123 en el tratamiento de recaídas por pérdida de antígeno. Se inyectaron blastos negativos para CD19 primarios (CBR positivo) en ratones NSG (figura 52D) y los ratones se distribuyeron aleatoriamente para recibir CART19, CART123 o linfocitos T de control. CART19 y los linfocitos T de control mostraron una ausencia total de actividad antitumoral, mientras que CART123 dio lugar a una erradicación completa de la enfermedad y supervivencia a largo plazo en estos ratones (figuras 52E y 52F). De hecho, en un modelo preclínico de B-ALL primaria refractaria a CART 19, el nuevo CART123 es capaz de erradicar la enfermedad y conferir supervivencia a largo plazo.

Con el fin de entender el comportamiento diferencial de CART19 y CART123 en este modelo *in vivo* a un nivel unicelular, se realizaron una serie de experimentos inyectando una mezcla de CART19 (Violeta CellTrace, azul) y CART123 (Naranja CellTracker o TRITC, rojo) marcados de manera diferencial en ratones que portaban blastos primarios positivos para CD19 (GFP) o blastos de recaída negativa para CD19 (GFP) y se controló su comportamiento utilizando microscopia 2-fotónica intravital de la médula de la bóveda craneal aproximadamente 24 horas después de la inyección (esquema experimental, figura 53A). Estos estudios mostraron que CART19 y CART123 se desplazaron a espacios con médula ósea que contenían leucemia y que el reconocimiento de los linfocitos CART del antígeno afín se correlaciona con la parada de la movilidad. Específicamente, en ratones con injerto de leucemia CD19+CD123+ inicial, se observó que un 62,9 % +/- 3,8 de CART19 y un 81,1 % +/- 1,2 de CART123 se habían detenido con una morfología redondeada al lado de los blastos, mientras que en ratones con injerto de leucemia CD19-CD123+ recidivante, únicamente los linfocitos CART123 se detuvieron al lado de las células tumorales (80,9 % +/- 5,1 de CART123 frente a 12,4 % +/- 2,2 de CART19) (figuras 53B y 53C). Estos hallazgos indican que en LLA con recaída negativa para CD19 únicamente los CART123 fueron capaces de establecer sinapsis productivas con las células de leucemia (GFP) y, por lo tanto, redujeron su movilidad, mientras que los linfocitos CART19 continuaron rastreando y moviéndose en el entorno sin reconocer los blastos leucémicos.

La combinación de CART123 y CART19 es capaz de prevenir las recaídas negativas para CD19

CART123 demostró ser eficaz en el tratamiento de recaídas negativas para CD19 producidas después de terapias dirigidas a CD19 en un modelo preclínico de resistencia a CART19. Sin embargo, una estrategia combinatoria podría tratar la enfermedad positiva para CD19 activa a la vez que se previenen las recaídas por pérdida de antígeno. Con el fin de probar esta hipótesis, se generó un modelo del problema cínico emergente de LLA-B con posibilidad de escape por negatividad de CD19 inyectando juntas la enfermedad primaria CD19- y CD19+ en ratones NSG. A continuación, los ratones se distribuyeron aleatoriamente para recibir linfocitos T de control (UTD), CART19 o la combinación de CART19 y CART123, con la misma dosis total de linfocitos T (figura 54A). Como se muestra en la figura 54B, los ratones tratados con linfocitos T de control presentaron progresión de ambos clones de leucemia y CART19 mostró una progresión rápida principalmente de la enfermedad negativa para CD19 (roja). Por el contrario, los ratones tratados con la combinación de CART123 y CART19 mostraron eliminación de la enfermedad y mejora de la supervivencia global, como se muestra en la figura 54C. El análisis de los ratones sacrificados al final del experimento no mostró pruebas de leucemia residual en el grupo de linfocitos T CAR combinados. Por el contrario, los ratones con enfermedad progresiva después de la monoterapia con CART19 mantuvieron el fenotipo negativo para CD19 esperado (figura 54D).

Por último, los linfocitos T fueron transducidos con 2 lentivirus, uno que portaba CAR19 y el otro CAR123 con el fin de desarrollar un CART capaz de ser activado por CD19 y/o CD123. Como se muestra en la figura 55A, se detectaron cuatro subconjuntos de linfocitos T transducidos de manera diferente: linfocitos T doblemente negativos para CAR19 y CAR123, monopositivos para CAR19, monopositivos para CAR123 y doblemente positivos para CAR19/CAR123. Se clasificaron estos cuatro subconjuntos y se estudió su funcionalidad y especificidad contra K562-WT, K562 CD19+ o K562 CD123+. La figura 55B muestra los resultados de un ensayo de desgranulación con CD107a donde los subconjuntos monopositivos responden a su diana específica mientras que solo la población doblemente positiva es capaz de desgranulación en presencia de K562 que expresa tanto CD19 como CD123. Además, los linfocitos CART estimulados dualmente presentaron una citotoxicidad más potente contra una diana doblemente positiva en comparación con un número equivalente de linfocitos CART estimulados individualmente, lo que sugiere un posible incremento de la eficacia utilizando un CAR que es activado por dos antígenos diferentes (figura 55C).

ANÁLISIS

Las inmunoterapias dirigidas a CD19 están cambiando el paradigma de tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda recidivante y refractaria. Los pacientes con un desenlace que previamente era sombrío ahora disponen de una posibilidad realista de conseguir una respuesta completa y una remisión de la enfermedad a largo plazo. Sin embargo, como se muestra en algunas circunstancias para leucemia tratada con otras formas de potente terapia dirigida, las células de leucemia son capaces de desarrollar mutaciones con pérdida de antígeno que conllevan resistencia y recaídas. En el caso de CART19, se han observado dos patrones de recaídas principales. Los pacientes con una pérdida temprana de CART19 debido a un fracaso de la persistencia están en riesgo de recaídas del clon original; ciertamente, los análisis de la enfermedad residual mínima indican que puede que se necesiten entre 1-6 meses de actividad CART sostenida para erradicar completamente la neoplasia maligna. Por el contrario, aproximadamente un 50% de las recaídas se producen a pesar de la persistencia de CART19 y están caracterizadas por la aparición de una leucemia negativa para CD19. La última observación implica una presión selectiva potente por parte de CART19. Notablemente, también se han producido recaídas negativas para CD19 después de la terapia con blinatumomab aunque estas representan la minoría de apariciones de recaídas después de esta terapia presumiblemente menos potente. Hay múltiples mecanismos potenciales para el desarrollo de enfermedad CD 19-negativa. Uno de estos es la selección y ventaja de supervivencia relativa de los clones negativos para CD19 que estuvieran presentes en la situación inicial con una frecuencia muy baja, y esto se consideró inicialmente el factor más probable que conllevaba recaídas negativas para CD19. Más recientemente, también se han considerado importantes otros mecanismos, tal como desregulación del ayuste de CD 19. Aquí se demuestra por primera vez que los blastos CD19-ve raros en B-ALL pueden contener las anomalías citogenéticas características encontradas en los blastos de leucemia CD19-positivos más comunes, lo que confirma esto como un mecanismo potencial de recaída CD19-negativo. Los autores han confirmado estos hallazgos al demostrar que los blastos CD123+CD19 negativos se pueden injertar en ratones inmunodeficientes, lo que indica que CD123 puede ser un marcador de células madre leucémicas en LLA-B tal como es en LMA.

El objetivo de este estudio fue definir estrategias novedosas para tratar pacientes con recaídas por pérdida de antígeno después de terapias dirigidas a CD19. CD 123 se expresó en gran medida en la mayoría de los casos de B-ALL, y en particular, CD123 permanece expresado en aquellos que recayeron con enfermedad CD19-negativa. Se demostró que la presencia de células leucémicas clonales en la población CD19-CD123+ indica que tener como diana CD123 en combinación con CART19 puede incrementar la probabilidad de erradicar subclones que podrían proliferar debido a la ventaja selectiva debida a la presión con CART19. CD 123 se ha validado previamente como un marcador de la célula madre leucémica en AML. Aquí se mostró que CD123 se va a expresar en la célula madre leucémica (LSC) definida inmunofenotípicamente en LLA, lo que plantea la posibilidad de que tener como diana CD123 en LSC podría promover la erradicación de LLA.

Para estudiar la función de CART123 en recaídas por pérdida de antígeno se desarrolló un modelo de xenoinjerto novedoso de recaídas negativas para CD19 a partir de blastos primarios derivados de un paciente con B-ALL

(CHP1010) participante en uno de los ensayos con CTL019 de la Universidad de Pensilvania/Hospital Infantil de Filadelfia. Este paciente, en la situación inicial tuvo un fenotipo CD19+CD123+ clásico pero posteriormente tuvo una recaída con una enfermedad CD19-CD123+ después de tratamiento con CART19. Utilizando este modelo, se demostró que CART123 podría erradicar la enfermedad recidivante y combinado con CART19 podría prevenir la recaída por pérdida de antígeno. Esta es la primera demostración de una combinación de CART doble en un modelo derivado de un paciente con relevancia clínica. Además, mediante el uso de obtención de imágenes intravitales, se mostró que los linfocitos CART entran en la médula ósea en menos de 24 horas después de la inyección intravenosa, buscan sus dianas y se ralentizan con el fin de interactuar con las células que portan el antígeno afín. Además, se mostró que una señalización doble CART123/19 fue más eficaz que cualquier CART solo o una combinación de ambos CAR, lo que es coherente con resultados publicados previamente.

Previamente, se mostró la eficacia preclínica del receptor antigénico quimérico anti-CD123 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda. CART123 provoca toxicidad hematopoyética debido al reconocimiento de CD123 en las células progenitoras y madre hematopoyéticas, un obstáculo potencialmente importante para la traslación clínica ya que una toxicidad profunda en las células madre podría conllevar una mieloablación permanente. Se ha hipotetizado que para minimizar la toxicidad hematopoyética, una construcción novedosa que activara linfocitos T solo tras la activación conjunta debida a CD19 o CD123 simultáneamente podría obviar esta toxicidad hematopoyética. Aquí se ha observado que los linfocitos CART que reciben una señal de activación del reconocimiento de CD19 y una señal estimulante del reconocimiento de CD123 podrían provocar la muerte de linfocitos LLA-B así como también evitar la profunda toxicidad hematopoyética que han descrito previamente los autores. Aunque este concepto se ha publicado previamente utilizando un sistema artificial de reconocimiento de CD19/PSMA, esta construcción con relevancia clínica representa un avance importante en el campo con una ruta relativamente libre de obstáculos para la traslación clínica. Notablemente, aunque un diseño de CAR doble de este tipo estará asociado probablemente con una toxicidad reducida, puede dejar sin abordar el problema de la recaída por pérdida de antígeno al hacer el reconocimiento de CAR más restrictivo, en lugar de menos. Sin embargo, si tener como diana CD123 erradica con éxito las células madre de LLA, esta estrategia podría ser tanto segura como eficaz.

Resumiendo, en el presente documento se demuestra una estrategia novedosa y eficaz para el tratamiento de LLA-B teniendo como diana CD123. Esta estrategia es especialmente atractiva debido a que CD123 se expresa en las raras células malignas negativas para CD19 en algunos pacientes con LLA-B y se conserva en las recaídas por pérdida de antígeno que ocurren después de las inmunoterapias dirigidas a CD19. Además, la combinación de CART19 con CART123 puede prevenir la aparición de recaídas negativas para CD19.

Ejemplo 18: Una dosis baja de RAD001 estimula la proliferación de CART en un modelo de cultivo celular

Se evaluó el efecto de dosis bajas de RAD001 en la proliferación de linfocitos T CAR *in vitro* cocultivando células que expresan CART con células diana en presencia de diferentes concentraciones de RAD001.

Materiales y métodos

Generación de linfocitos T transducidos con CAR

Se utilizó un vector de transferencia lentivírico CAR anti-CD19 humano (huCART19) humanizado para producir el material genómico empaquetado en las partículas lentivíricas pseudotipadas VSVg. La secuencia de aminoácidos y nucleótidos del CAR anti-CD19 humanizado (huCART19) humanizado es CAR 1, ID 104875, que se describe en la publicación PCT, WO2014/153270, presentada el 15 de marzo de 2014, y se designa SEQ ID NO 85 y 31 en ella.

El ADN del vector de transferencia lentivírico se mezcla con los tres componentes de empaquetamiento de VSVg env, gag/pol y rev en combinación con el reactivo de Lipofectamine para transfectar células Lenti-X 293T. El medio se cambia tras 24 h y 30 h después, el medio que contiene virus se recoge, se filtra y se almacena a -80 ºC. Los CART se generan mediante transducción de linfocitos T vírgenes frescos o congelados obtenidos mediante selección magnética negativa de sangre de donantes sanos o leukopak. Los linfocitos T se activan por incubación con perlas anti-CD3/anti-CD28 durante 24 h, tras lo cual se añade sobrenadante vírico o virus concentrado (MOI = 2 o 10, respectivamente) a los cultivos. Se permite que los linfocitos T modificados se expandan durante aproximadamente 10 días. El porcentaje de células transducidas (que expresan los CAR en la superficie celular) y el nivel de expresión de CAR (intensidad de fluorescencia relativa, media geo) se determinan mediante análisis por citometría de flujo entre los días 7 y 9. La combinación de una tasa de crecimiento más lenta y un tamaño de los linfocitos T que se aproxima a ~350 fl determina el estado de los linfocitos T que se crioconservarán para un análisis posterior.

Evaluación de la proliferación de CART

Para evaluar la funcionalidad de los CART, los linfocitos T se descongelan y se cuentan y la viabilidad se evalúa mediante Cellometer. El número de células positivas para CAR en cada cultivo se normaliza utilizando linfocitos T

no transducidos (UTD). Se estudió el impacto de RAD001 en CART en valoraciones con RAD001, comenzando con 50 nM. La línea celular diana utilizada en todos los experimentos de cocultivo es NALM6 (Nalm-6), una línea celular de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de linfocitos pre-B humana que expresa CD19 y transducida para expresar luciferasa.

Para medir la proliferación de CART, los linfocitos T se cultivan con células diana en una relación de 1:1. El ensayo se desarrolla durante 4 días, momento en que las células se tiñen para detectar la expresión de CD3, CD4, CD8 y CAR. Se evalúa el número de linfocitos T mediante citometría de flujo contando las perlas como referencia.

Resultados

Se estudió la capacidad proliferativa de linfocitos CART en un ensayo de cocultivo de 4 días. Se evaluó el número de linfocitos T positivos para CAR y positivos para CD3 (barras oscuras) y linfocitos T positivos para CD3 totales (barras claras) después de cultivar los linfocitos T transducidos con CAR y no transducidos con NALM6 (Nalm-6) (Fig. 59). Los linfocitos huCART19 se expandieron cuando se cultivaron en presencia de menos de 0,016 nM de RAD001, y en menor grado a concentraciones más elevadas del compuesto. De manera importante, tanto a 0,0032 como 0,016 nM de RAD001 la proliferación fue mayor que la observada sin la adición de RAD001. Los linfocitos T no transducidos (UTD) no mostraron una expansión detectable.

Ejemplo 19: Una dosis baja de RAD001 estimula la expansión de CART *in vivo*

Este ejemplo evalúa la capacidad de los linfocitos huCAR19 para proliferar *in vivo* con diferentes concentraciones de RAD001.

Materiales y métodos:

Células NALM6-luc: Se desarrolló la línea celular de leucemia linfoblástica aguda (LLA) humana NALM6 a partir de sangre periférica de un paciente con LLA recidivante. Las células se marcaron a continuación con luciferasa de luciérnaga. Estas células en suspensión se cultivaron en RPMI complementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado térmicamente.

Ratones: Se recibieron ratones NSG (NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJ) de 6 semanas de edad de Jackson Laboratory (número de lote 005557).

Implante del tumor: Las células NALM6-luc se cultivaron y expandieron *in vitro* en RPMI complementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado térmicamente. Las células se transfirieron a continuación a un tubo cónico de 15 ml y se lavaron dos veces con PBS estéril frío. Las células NALM6-luc se contaron entonces y se resuspendieron a una concentración de 10 x 10^6 células por mililitro de PBS. Las células se colocaron en hielo y se implantaron inmediatamente (en una hora o menos) en los ratones. Las células NALM6-luc se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola en un volumen de 100 µl, para un total de 1×10^6 células por ratón.

Dosificación de linfocitos T CAR: A los ratones se les administraron 5×10^6 células T CAR 7 días después de la implantación del tumor. Las células se descongelaron parcialmente en un baño de agua a 37 grados Celsius y a continuación se descongelaron completamente añadiendo 1 ml de PBS estéril frío al tubo que contenía las células. Las células descongeladas se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y el volumen final se ajustó a 10 ml con PBS. Las células se lavaron dos veces a 1000 rpm durante 10 minutos cada vez y, a continuación, se contaron en un hemocitómetro. Las células T se resuspendieron entonces a una concentración de 50×10^6 células T CAR por ml de PBS frío, y se mantuvieron en hielo hasta que se administró la dosis a los ratones. A los ratones se les inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola 100 µl de células T CAR para una dosis de 5×10^6 células T CAR por ratón. Se trataron ocho ratones por grupo con 100 µl de PBS solo (PBS) o linfocitos CAR T CD19 humanizados.

Dosificación de RAD001: Se formuló una microemulsión concentrada de 50 mg equivalente a 1 mg de RAD001 y, a continuación, se resuspendió en D5W (dextrosa al 5 % en agua) en el momento de la dosificación. A los ratones se les administraron las dosis por vía oral a diario (vía oral forzada) con 200 µl de las dosis deseadas de RAD001.

Análisis PK: A los ratones se les administraron las dosis de RAD001 a diario comenzando 7 días después del implante del tumor. Los grupos de dosificación fueron de la siguiente manera: 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg. Se extrajo sangre de los ratones los días 0 y 14 tras la primera y última dosis de RAD001, en los siguientes puntos temporales para el análisis PK: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas.

Resultados:

Se estudió la expansión y farmacocinética de RAD001 en ratones NSG con tumores NALM6-luc. La dosificación oral diaria de RAD001 solo no tuvo un impacto en el crecimiento de los tumores NALM6-luc (figura 60). El análisis farmacocinético de RAD001 mostró que es bastante estable en la sangre de los ratones portadores de tumores

(figuras 61A y 61B). Tanto el día 0 como el día 14 los análisis PK muestran que las concentraciones de RAD001 en la muestra son superiores a 10 nM incluso 24 horas después de la dosificación con la dosis más baja estudiada (0,3 mg/kg).

Basándose en estas dosis, se administraron dosis de los linfocitos CAR T huCAR19 con y sin RAD001 para determinar la capacidad proliferativa de estas células. La dosis más elevada utilizada fue de 3 mg/kg basada en los niveles de RAD001 en la sangre 24 horas después de la dosificación. Como la concentración de RAD001 fue superior a 10 nM 24 horas después de la dosis final de RAD001, se utilizaron varias dosis más bajas de RAD001 en el estudio *in vivo* con los linfocitos T CAR. Se administraron dosis de los linfocitos CAR T i.v. un día antes de comenzar la dosificación oral diaria de RAD001. Se supervisaron los ratones mediante FACS para determinar la expansión de linfocitos T.

Las dosis más bajas de RAD001 muestran una proliferación potenciada de los linfocitos CAR T (figuras 62A y 62B). Esta proliferación mejorada es más evidente y prolongada con los linfocitos CAR T CD4+ que con los linfocitos CAR T CD8+. Sin embargo, con los linfocitos CAR T CD8+, la proliferación potenciada se puede observar en puntos temporales tempranos tras la dosis con linfocitos CAR T.

Ejemplo 20: Determinados pacientes con LDLBG primario muestran células cancerosas positivas dobles CD3+/PD1+

Aunque ha habido avances atractivos en el espacio de inmunoterapia contra el cáncer recientemente en forma de linfocitos T modificados con receptor quimérico para antígeno (CAR) e inhibidores de puntos de control, las herramientas avanzadas para explorar los mecanismos terapéuticos de su combinación no están ampliamente disponibles. Para hacer frente a esta creciente necesidad, se desarrolló una sólida plataforma cuantitativa de inmunohistoquímica fluorescente que utiliza la tecnología multiplex AQUA (Análisis cuantitativo automatizado) para evaluar la expresión del inhibidor del punto de control, enumerar los linfocitos CAR T y determinar la interacción entre las células tumorales y las células inmunitarias a través de novedosos algoritmos de co-localización. La utilidad de este método se caracterizó tanto en sistemas de modelos preclínicos como clínicos. En un modelo de ratón inmunodeficiente de linfoma de linfocitos B, se evaluó la migración dirigida de linfocitos CAR T a linfocitos B malignos en órganos linfoides primarios. Se determinó el fenotipo y el estado funcional de los linfocitos CAR T mediante análisis multiplex de la expresión de CD4, CD8, PD1 y FOXP3. Además, para permitir las inmunoterapias combinadas en el contexto del linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), se examinó la prevalencia de los mecanismos de resistencia inmunitaria adaptativa en forma de expresión de PD1 y PD-L1 en los compartimentos de células tumorales e inmunitarias a través de puntos de referencia creados por tinciones citoplásmicas y nucleares en biopsias tanto primarias como secundarias de pacientes con LDLBG (n = 63). Para respaldar la selección de pacientes para los ensayos de CAR T, se cuantificó la expresión y la prevalencia de antígenos tumorales relevantes que no se podían puntuar de forma reproducible mediante métodos tradicionales para producir puntos de corte objetivos. Estos métodos de IHC multiplexados cuantitativos para la selección óptima de pacientes se pueden utilizar en los próximos ensayos de inmunoterapia de combinación novedosa.

La preparación de muestras, la obtención de imágenes y el análisis de imágenes para muestras de tejido LDLBG se realizaron en pacientes humanos con LDLBG primario (n = 49) y LDLBG secundario (15).

Preparación de las muestras. Se desparafinaron muestras de tejido fijadas en formol e incrustadas en parafina (FFPE). A continuación, los portaobjetos se rehidrataron a través de una serie de lavados de xileno a alcohol antes de incubarlos en agua destilada. A continuación, se realizó la recuperación del antígeno inducida por calor usando condiciones de presión y temperatura elevadas, se dejó enfriar y se transfirió a solución salina tamponada con Tris. A continuación, se realizó una tinción donde se llevaron a cabo los siguientes pasos. En primer lugar, se bloqueó la peroxidasa endógena, seguido de la incubación con una solución bloqueante de proteínas para reducir la tinción inespecífica de anticuerpos. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con un anticuerpo primario anti-PD1 de ratón. Después, los portaobjetos se lavaron antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-ratón HRP. Los portaobjetos se lavaron y después se detectó la tinción de PD-1 utilizando TSA+ Cy® 5 (Perkin Elmer). A continuación, los reactivos de anticuerpos primarios y secundarios se eliminaron mediante microondas. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de teñirlos con un anticuerpo primario anti-CD3 de conejo. Los portaobjetos se lavaron y después se incubaron con un cóctel de anticuerpo secundario anti-conejo HRP más 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y después se detectó la tinción de CD3 utilizando TSA-Cy® 3 (Perkin Elmer). Los portaobjetos se lavaron por última vez antes de cubrirlos con medios de montaje y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente.

Obtención de imágenes y análisis de las muestras. A continuación, se adquirieron imágenes de fluorescencia usando el sistema de análisis de portaobjetos inteligente Vectra 2 usando el software Vectra versión 2.0.8 (Perkin Elmer). En primer lugar, se obtuvieron imágenes monocromáticas del portaobjetos con un aumento de 4x utilizando DAPI. Se utilizó un algoritmo automatizado (desarrollado con inForm) para identificar las áreas del portaobjetos que contenían tejido.

Se obtuvieron imágenes de las áreas del portaobjetos en las que se identificó que contenían tejido con un aumento de 4x para los canales asociados con DAPI (azul), Cy®3 (verde) y Cy® 5 (rojo) para crear imágenes RGB. Estas imágenes de aumento 4x se procesaron usando un algoritmo de enriquecimiento automatizado (desarrollado con inForm) en el selector de campo de visión para identificar y clasificar los posibles campos de visión de aumento 20x según la expresión más alta de Cy® 3.

Se obtuvieron imágenes de los 40 campos de visión superiores con un aumento de 20x en las longitudes de onda de DAPI, Cy®3 y Cy® 5. Se revisó la aceptabilidad de las imágenes sin procesar, y las imágenes que estaban desenfocadas, carecían de células tumorales, presentaban mucha necrosis o contenían altos niveles de señal de fluorescencia no asociada con la localización esperada del anticuerpo (es decir, tinción de fondo) se rechazaron antes del análisis. Las imágenes aceptadas se procesaron utilizando AQUAduct (Perkin Elmer), en donde cada fluoróforo se desmezcló espectralmente mediante un desmezclador espectral en canales individuales y se guardó como un archivo separado.

Los archivos procesados se analizaron más a fondo utilizando AQUAnalysis™ o mediante un proceso completamente automatizado utilizando AQUAserve™. Cada imagen DAPI fue procesada por el enmascarador celular para identificar todos los núcleos celulares dentro de esa imagen y después se dilató en 2 píxeles para representar el tamaño aproximado de una célula completa. Esta máscara resultante representaba todas las células dentro de esa imagen. Cada imagen de Cy® 5 se procesó mediante enmascarador de biomarcador para crear una máscara binaria de todas las células que son PD-1 positivas. Cada imagen de Cy® 3 se procesó mediante enmascarador de biomarcador para crear una máscara binaria de todas las células que son CD3 positivas. Las máscaras binarias para todas las células positivas para PD-1 y positivas para CD3 se combinaron para crear una máscara binaria de todas las células que son doblemente positivas para PD-1 y CD3. El % de positividad de biomarcadores (PBP) para todas las células CD3 que expresan PD-1 se obtuvo, usando una calculadora de positividad, dividiendo el área total, medida en píxeles y determinada por el evaluador de área, de la máscara de todas las células tumorales positivas para PD-1 entre el área total, medida en píxeles y determinada por el evaluador de área, de la máscara de todas las células positivas para CD3. En la Figura 63 se muestran valores representativos de PBP para todas las células CD3 positivas que expresan PD-1 en muestras humanas de DLBCL primario y secundario. El estado de CD3 y PD-1 mostró que las tasas de prevalencia de células CD3+/PD-1+ en el entorno de LDLBG primario son más altas que en el secundario, lo que brinda la oportunidad de seleccionar pacientes para un tratamiento único o combinado.

Se realizó un experimento similar en el que se detectó PD-L1 utilizando un anticuerpo primario anti-PDL1 de conejo y TSA+Cy5 (Perkin Elmer) en muestras de tejido LDLBG de pacientes humanos con LDLBG primario. También se detectaron PD1 y CD3 en las mismas muestras. El experimento mostró que los microambientes tumorales comprenden células que expresan PD1, CD3 y PDL1. El experimento también identificó una subpoblación de células que es CD3+PD1+ (datos no mostrados). Estos resultados respaldan el modelo de que un microambiente tumoral fomenta las células inmunosupresoras que pueden ser dianas de agentes específicos para las células PD1+ o PD-L1+.

Ejemplo 21: Expresión mutuamente excluyente de CD19 y PD-L1 en muestras que comprenden células LDLBG

Preparación de las muestras. Se desparafinaron muestras de tejido fijadas en formol e incrustadas en parafina (FFPE). A continuación, los portaobjetos se rehidrataron a través de una serie de lavados de xileno a alcohol antes de incubarlos en agua destilada. A continuación, se realizó la recuperación del antígeno inducida por calor usando condiciones de presión y temperatura elevadas, se dejó enfriar y se transfirió a solución salina tamponada con Tris. A continuación, se realizó una tinción donde se llevaron a cabo los siguientes pasos. En primer lugar, se bloqueó la peroxidasa endógena, seguido de la incubación con una solución bloqueante de proteínas para reducir la tinción inespecífica de anticuerpos. A continuación, los portaobjetos se tiñeron con un anticuerpo primario de conejo anti-PDL1. A continuación, los portaobjetos se lavaron antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-HRP de conejo. Los portaobjetos se lavaron y después se detectó la tinción de PDL1 utilizando TSA+ Cy® 3 (Perkin Elmer). A continuación, los reactivos de anticuerpos primarios y secundarios se eliminaron mediante microondas. Los portaobjetos se lavaron de nuevo antes de teñirlos con un anticuerpo primario de ratón anti-CD19. Los portaobjetos se lavaron y después se incubaron con un cóctel de anticuerpo secundario anti-HRP de ratón más 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se lavaron y después se detectó la tinción de CD19 utilizando TSA-Cy® 5 (Perkin Elmer). Los portaobjetos se lavaron por última vez antes de cubrirlos con medios de montaje y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente.

Obtención de imágenes y análisis de las muestras. A continuación, se adquirieron imágenes de fluorescencia usando el sistema de análisis de portaobjetos inteligente Vectra 2 usando el software Vectra versión 2.0.8 (Perkin Elmer). En primer lugar, se obtuvieron imágenes monocromáticas del portaobjetos con un aumento de 4x utilizando DAPI. Se utilizó un algoritmo automatizado (desarrollado con inForm) para identificar las áreas del portaobjetos que contenían tejido.

Se obtuvieron imágenes de las áreas del portaobjetos en las que se identificó que contenían tejido con un aumento de 4x para los canales asociados con DAPI (azul), Cy®3 (verde) y Cy® 5 (rojo) para crear imágenes RGB. Estas imágenes de aumento 4x se procesaron usando un algoritmo de enriquecimiento automatizado (desarrollado con inForm) en el selector de campo de visión para identificar y clasificar los posibles campos de visión de aumento 20x según la expresión más alta de Cy® 3.

Se obtuvieron imágenes de los 40 campos de visión superiores con un aumento de 20x en las longitudes de onda de DAPI, Cy®3 y Cy® 5. Se revisó la aceptabilidad de las imágenes sin procesar, y las imágenes que estaban desenfocadas, carecían de células tumorales, presentaban mucha necrosis o contenían altos niveles de señal de fluorescencia no asociada con la localización esperada del anticuerpo (es decir, tinción de fondo) se rechazaron antes del análisis. Las imágenes aceptadas se procesaron utilizando AQUAduct (Perkin Elmer), en donde cada fluoróforo se desmezcló espectralmente mediante un desmezclador espectral en canales individuales y se guardó como un archivo separado.

Los archivos procesados se analizaron más a fondo utilizando AQUAnalysis™ o mediante un proceso totalmente automatizado utilizando AQUAserve™ como se describe en el ejemplo anterior.

Los valores representativos de PBP para todas las células positivas para CD19 y PD-L1 en muestras humanas primarias y secundarias de LDLBG se muestran en la **figura 64**. La expresión de CD19 y PDL1 varió en las muestras de LDLBG. La expresión de CD19 y PDL1 tendía a ser mutuamente excluyente, es decir, en general, una célula dada expresaba CD19 o PD-L1 pero no ambos. Si desear quedar ligados a la teoría, esto puede deberse a que CD19 se expresa en células tumorales LDLBG mientras que PD-L1 se expresa en células no tumorales, p. ej., células que sustentan el microambiente tumoral. Esta observación sugiere que una terapia combinada de un inhibidor de CD19 (p. ej., una célula que expresa CAR CD19) y un inhibidor de la señalización de PD-L1 puede ser útil para dirigirse a estas dos poblaciones de células.

Se realizó un experimento similar para, p. ej., demostrar la capacidad del análisis de AQUA para supervisar la eficacia de CART19. Este estudio supervisó CD19, CD3 y el ácido nucleico de CART19 en muestras que comprenden líneas de células mixtas con linfocitos CART19+ Jurkat y células CD19+ REH. Las proteínas CD19 y CD3 se detectaron mediante anticuerpos, y CART19 se detectó utilizando una sonda de ARN contra la UTR 3' del ácido nucleico de CAR. El experimento mostró que las muestras de líneas celulares comprenden células que expresan CD19, CD3 y CART19 (datos no mostrados). El experimento también mostró que las muestras de líneas celulares comprenden una subpoblación de células que es CD3+/CART19+ (datos no mostrados). Se realizó un análisis de proximidad, que mostró que los linfocitos CART19 estaban físicamente próximos a las células CD19+ (datos no mostrados). Estos experimentos respaldan el modelo de que los linfocitos CART19 CD3+ se infiltran en un microambiente tumoral que comprende células CD19+ y las ubicaciones físicas de las células CD19 y CART19 se traducen en la eficacia de la terapia con CART19.

Ejemplo 22: Expresión bicistrónica de CAR

En este ejemplo, se comparó la eficacia de dos tipos de poblaciones celulares. En la primera población de células, denominada "agrupada", cada célula expresa un CAR. Una primera pluralidad de células se transdujo con CAR CD19, una segunda pluralidad de células se transdujo con CAR CD22 o CAR CD123 y después se agruparon las dos pluralidades de células. En el segundo tipo de población celular, se transdujo una pluralidad de células con un vector bicistrónico que expresa CAR CD19 y un segundo CAR, de modo que la mayoría o todas las células expresaron ambas construcciones. El segundo CAR fue CAR CD22 en algunos experimentos y CAR CD123 en otros. Estas poblaciones de células se ilustran en la FIG. 65.

Dos construcciones novedosas, diagramadas en la FIG. 66, se generaron usando el sistema P2A para expresar dos CAR completos en el mismo linfocito T usando un solo vector lentivírico bicistrónico. Los linfocitos T se expandieron según un protocolo convencional y se transdujeron utilizando un solo lentivirus que porta tanto CAR19 como CAR123 (multiplicidad de infección, MOI = 3). Se realizó una transducción similar para CAR19 y CAR22 en la misma población de linfocitos T obtenida usando el vector lentivírico bicistrónico descrito. La FIG. 67 muestra la coexpresión de los CAR CD19 y CD22. Pueden reconocerse poblaciones distintas basadas en la expresión específica de CAR19 y/o CAR123, que incluyen una población doble CAR19+/CAR123+ y una población doblemente negativa (FIG. 68, panel superior).

Las células transducidas con CAR CD19 bicistrónico y CAR CD123 se compararon con células agrupadas que expresaban CAR CD19 o CD123 (FIG. 68, panel inferior). A los ratones NSG se les injertó una línea celular LLA-B (NALM-6, CBG+). El día 7, los ratones se aleatorizaron en función de la carga tumoral (BLI, bioluminiscencia) para recibir linfocitos T de control (UTD), CART19, CART123, la combinación agrupada 1:1 de CART123 y CART19 o doble CART19/123 (el mismo número total de células CAR+). Las células que expresan CAR CD19 solas (cuadrados) y las células que expresan CAR CD123 solas (triángulos) mostraron una eficacia inicial en comparación con el control (círculos), seguida de niveles crecientes de células leucémicas. Las células agrupadas que expresan CD19 o CD123 (rombo) también mostraron una eficacia inicial seguida de niveles crecientes de células leucémicas. Por el contrario, las células transfectadas con el vector bicistrónico (triángulos invertidos,

"CART doble") mantuvieron una respuesta prolongada al menos 60 días después del tratamiento. Este experimento indica que los CART dobles ejercen un potente efecto antileucémico que no solo es superior al tratamiento con un solo CART, sino que es superior a los linfocitos CART agrupados.

Ejemplo 23: CART22 es eficaz contra LLA-B CD19-neg en un modelo animal.

Se analizó la capacidad de respuesta de los linfocitos LLA-B negativos para CD19 a las células que expresan CAR CD19 y las células que expresan CAR CD22 en un modelo animal. Se infundieron un millón de linfocitos LLA-B negativos para CD19 en ratones el día 0 y se infundieron 2e6 linfocitos T CAR+ el día 7 (después de la aleatorización). La carga tumoral se midió mediante bioluminiscencia. Como se muestra en la FIG. 69, mientras que el cáncer progresó en los ratones de control negativo y en los ratones tratados con CART19, CART22 puede eliminar la LLA negativa para CD19 en xenoinjertos NSG.

El ensayo se realizó de la siguiente manera: Se inyectaron 1e6 células de LLA CD19-neg (CBG+) en ratones NSG. El día 5, los ratones se aleatorizaron para recibir 2e6 linfocitos T no transducidos (UTD) de control, CART19 o CART22 (scFv m971). A continuación, se siguió a los ratones para evaluar la carga tumoral (bioluminiscencia).

Ejemplo 24: Los niveles bajos de moléculas de punto de control inmunitario se asocian con mejores resultados

Se detectaron moléculas de punto de control inmunitario (PD-L1, PD1, LAG3 y TIM3) en muestras de pacientes con linfoma mediante inmunohistoquímica. También se realizaron tejidos y líneas celulares de control positivo y negativo. El análisis de la expresión del punto de control inmunitario se realizó utilizando un análisis de imagen cuantitativo en una región de interés que puede incluir células tumorales y células no tumorales, tales como células inmunitarias. Se tomaron muestras de tejido, ganglio linfático o médula ósea.

Se comparó la expresión de la proteína del punto de control inmunológico en pacientes con respuesta completa (CR) y pacientes con enfermedad progresiva (EP) después del tratamiento con terapia CAR dirigida a CD 19. Como se muestra en la FIG. 70, los pacientes con CR tendían a tener niveles bajos de PD-L1, PD1, LAG3 y TIM3 antes y después del tratamiento, mientras que los pacientes con EP tendían a tener niveles altos de estas moléculas antes y después del tratamiento. Este ejemplo respalda la terapia de combinación con una célula que expresa CAR y un inhibidor del punto de control inmunitario, y respalda las pruebas para determinar los niveles de moléculas del punto de control inmunitario en pacientes que reciben una terapia con CAR.

Ejemplo 25: Ensayos funcionales de células que expresan CAR CD22

Varias construcciones de CAR CD22 se validaron funcionalmente en un ensayo NFAT. En resumen, los experimentos se realizaron de la siguiente manera. Un vector lentivírico (pELPS) que porta un ácido nucleico, que codifica un CAR CD22 con un dominio scFv de unión a CD22 se introdujo por electroporación en una línea de linfocitos T Jurkat modificada para expresar luciferasa bajo el control de un elemento de respuesta NFAT (JNL). Las células se cultivaron y se les permitió expresar la construcción de CAR. Las células sometidas a electroporación se aplicaron a una placa recubierta con el antígeno diana (CD22). La detección de la señal de luciferasa en la placa recubierta fue indicativa de la actividad de unión de CAR CD22 a su antígeno, lo que condujo a la activación de los linfocitos T y la expresión de luciferasa.

La FIG. 71 es un gráfico que muestra la activación (en ULR) de varias construcciones de CAR CD22 en presencia y ausencia de un competidor scFv m971. Estos resultados indican que CD22-53 y CD22-12, y un subconjunto de los otros scFv, se unen al antígeno aproximadamente tan bien como el control positivo m971. Los resultados también indican que los diferentes scFv compiten con m971 en diferentes grados.

Se probaron dieciséis dominios de unión a CD22 humanos adicionales y se encontró que tenían una actividad de unión débil (datos no mostrados), por lo que no se prosiguió más.

La FIG. 72 es un gráfico que muestra la activación (en ULR) de varias células JNL que expresan CAR CD22, incluidas CD22-57, CD22-58, CD22-59, CD22-60, CD22-61, CD22-62 y CD22-63, cuyas secuencias de scFv se proporcionan en el presente documento. Se usaron tres proteínas diana diferentes (CD22-FL-Fc, CD22-D567-Fc y CD22-D67) para recubrir las placas de cultivo tisular; también se incluyó un control negativo (Fc). Se usó un CAR de unión a mesotelina (Meso-G07) como control negativo. Se usaron CD22-12 y CD22-53 como controles positivos. El experimento indicó que todos los CAR (CD22-57, CD22-58, CD22-59, CD22-60, CD22-61, CD22-62 y CD22-63) eran funcionales en este ensayo. Asimismo, estos resultados indicaron que los CAR analizados (incluidos CD22-12 y -53) se unen a los dominios 6 y 7 de CD22. El mapeo de dominios se realizó en dominios de unión a CD22. Se utilizaron tres formas diferentes de antígenos: CD22 de longitud completa con los 7 dominios externos, dominio 567 (en el que se suprimieron los dominios 1-4) y dominio 67 (en el que se suprimieron los dominios 1-5). Aunque sin desear quedar ligados a la teoría, parece que la unión de diversos clones de CD22 se mapea en los epítopos ilustrados en la FIG. 75.

Las construcciones de CAR CD22 también se ensayaron en cuanto a la capacidad para promover la secreción de IFN-gamma e IL-2. En resumen, los linfocitos T primarios transducidos de donantes sanos que expresan los diferentes CAR CD22 se cocultivaron con las células diana positivas para CD22 Raji-Luc y Daudi-Luc, así como con el control negativo K562-Luc. Los linfocitos T y las células diana se cultivaron en una relación de células efectoras con respecto a diana (E:T) de 10 a 1. Los sobrenadantes se recogieron después de 20 h de cocultivo. La FIG. 73 muestra tres gráficos de barras que indican la producción de IFN-gamma en pg/ml. El cocultivo con líneas celulares Raji-Luc (panel superior) y Daudi-luc (panel central) indujo la secreción de IFN-gamma por linfocitos T CAR hCD22-12, hCD22-53, así como los dos controles positivos CAR19 y m971-HL. En particular, se observaron cantidades más altas cuando se analizaron las células hCD22-53 y, en menor medida, cuando se analizaron las células hCD22-12. Se observaron resultados similares cuando se analizaron las células Nalm6-Luc, Pfeiffer-Luc y K562-CD22-Luc y SEM-Luc (datos no mostrados). Se observó una secreción mínima de IFN-gamma cuando se analizó la línea celular de control negativo K562-Luc (panel inferior).

CD22-12 mostró actividad comparable a m971 en ensayos de destrucción de células y secreción de citocinas (ejemplo 9). Se produjeron dos scFv, denominados CD22-64 y CD22-65, por maduración de afinidad de hCD22-12. Se analizó la actividad de las construcciones CAR que contenían estos scFv en un ensayo NFAT como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la FIG. 74, tanto CD22-64 como CD22-65 se unen a CD22 tan bien como CD22-12 y CD22-53, o mejor, lo que conduce a la activación de JNL. Las barras de la figura representan, de izquierda a derecha, CD22 de longitud completa-Fc; CD22 D567-Fc; y un control negativo solo con Fc utilizado para el recubrimiento de las placas. El análisis de cuatro variantes de CD22-12 sugirió que LCDR3 y HCDR3 contribuyeron a la unión en cierta medida (datos no mostrados) y que HCDR3 puede tolerar más mutaciones que LCDR3.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR), en la que la molécula de CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD22, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular, y en la que el dominio de unión a CD22 comprende:
(i) una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1) TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 648), una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) DVSNRPS (SEQ ID NO: 659), y una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 670); y
(ii) una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1) GDSMLSNSDTWN (SEQ ID NO: 498) o SNSDTWN (SEQ ID NO: 1345), una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 509) o RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 1354), y una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 520) o VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 1363).

2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el dominio de unión a CD22 comprende una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 690 o una secuencia con una identidad de secuencia del 95-99% con la misma, y una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 680 o una secuencia con una identidad de secuencia del 95-99% con la misma.

3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o 2, en la que
(i) la molécula de CAR comprende además una secuencia líder de SEQ ID NO: 13;
(ii) el dominio de unión de CD22 es un dominio de unión de CD22 humano que comprende un enlazador de SEQ ID NO: 53;
(iii) la molécula de CAR comprende además una bisagra CD8 como se expone en SEQ ID NO: 14; o
(iv) el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana CD8 como se expone en SEQ ID NO: 15.

4. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, opcionalmente en la que el dominio de señalización funcional de 4-1BB es como se expone en SEQ ID NO: 16 y/o el dominio de señalización funcional de CD3 zeta es como se expone en SEQ ID NO: 43.

5. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula de ácido nucleico codifica dos o más CAR separados por un sitio de escisión de la proteasa P2A o un sitio de escisión de la proteasa T2A, opcionalmente en la que el sitio de escisión de la proteasa P2A es como se expone en SEQ ID NO: 1329 y el sitio de escisión de la proteasa T2A de SEQ ID NO: 1328.

6. Una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR), que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión a CD22, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, y en la que el dominio de unión a CD22 comprende:
(i) una LC CDR1 TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 648), una LC CDR2 DVSNRPS (SEQ ID NO: 659), y una LC CDR3 SSYTSSSTLYV (SEQ ID NO: 670); y
(ii) una HC CDR1 GDSMLSNSDTWN (SEQ ID NO: 498) o SNSDTWN (SEQ ID NO: 1345), una HC CDR2 RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 509) o RTYHRSTWYDDYASSVRG (SEQ ID NO: 1354), y una HC CDR3 VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 520) o VRLQDGNSWSDAFDV (SEQ ID NO: 1363).

7. La molécula de CAR según la reivindicación 6, en la que el dominio de unión a CD22 comprende una región VL de SEQ ID NO: 690 o una secuencia con una identidad de secuencia del 95-99% con la misma, y una región VH de SEQ ID NO: 680 o una secuencia con una identidad de secuencia del 95-99% con la misma.

8. La molécula de CAR de la reivindicación 6 o 7, en la que
(i) la molécula de CAR comprende además una secuencia líder de SEQ ID NO: 13;
(ii) el dominio de unión de CD22 es un dominio de unión de CD22 humano que comprende un enlazador de SEQ ID NO: 53;
(iii) la molécula de CAR comprende además una bisagra CD8 como se expone en SEQ ID NO: 14; o
(iv) el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana CD8 como se expone en SEQ ID NO: 15.

9. La molécula de CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, opcionalmente en la que el dominio de señalización funcional de 4-1BB es como se expone en SEQ ID NO: 16 y/o el dominio de señalización funcional de CD3 zeta es como se expone en SEQ ID NO: 43.

10. La molécula de CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que la molécula de CAR comprende, desde el extremo N hasta el extremo C:

(i) una secuencia líder opcional de SEQ ID NO: 13,
(ii) el dominio de unión a CD22 que es un scFv;
(iii) una bisagra opcional de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, o SEQ ID NO: 49;
(iv) un dominio transmembrana CD8 de SEQ ID NO: 15;
(v) un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51; y
(vi) una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43.

11. Una célula o población de células que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la molécula de CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, opcionalmente en la que la célula es una célula T.

12. La célula o población de células de la reivindicación 11 para uso en un método de tratamiento de un cáncer hematológico en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la célula o población de células que expresan una molécula de CAR.

13. La célula o población de células para uso según la reivindicación 12, en la que el cáncer hematológico se selecciona del grupo que consiste en leucemia aguda, leucemia linfoide aguda de células B/leucemia linfoblástica aguda de células B/leucemia linfocítica aguda de células B (BALL), leucemia linfoide aguda de células T/leucemia linfoblástica aguda de células T/leucemia linfocítica aguda de células T (TALL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia linfoide aguda/leucemia linfoblástica aguda/leucemia linfocítica aguda (ALL); leucemia crónica, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma no de Hodgkin, mieloma múltiple, y mieloma.

14. La célula o población de células para uso de la reivindicación 12 o 13, en la que el sujeto es un niño o un adulto.

15. La célula o población de células para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la que el cáncer hematológico es BALL.

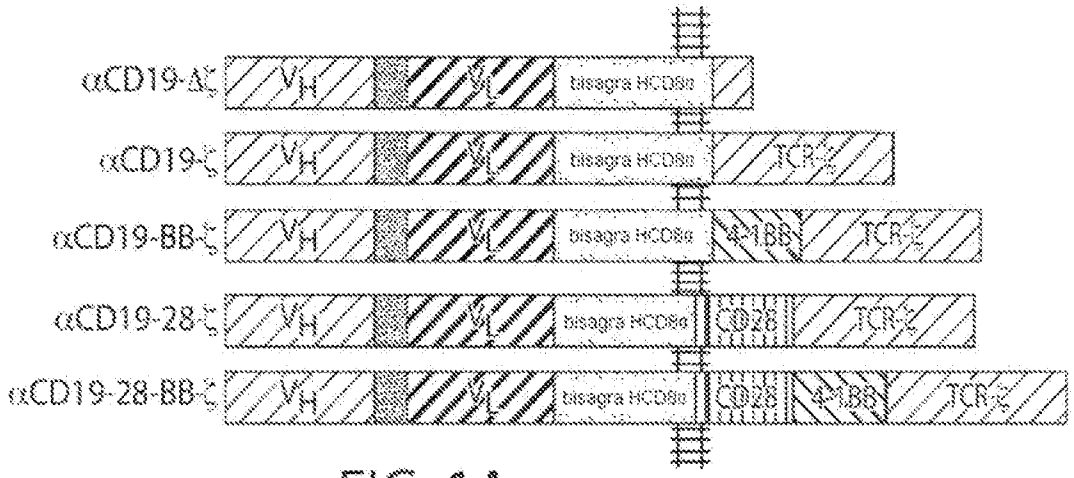

αCD19-Δζ
αCD19-ζ
αCD19-BB-ζ
αCD19-28-ζ
αCD19-28-BB-ζ
VH
VL
bisagra HCD8α
TCRζ
4-1BB
CD28

FIG. 1A

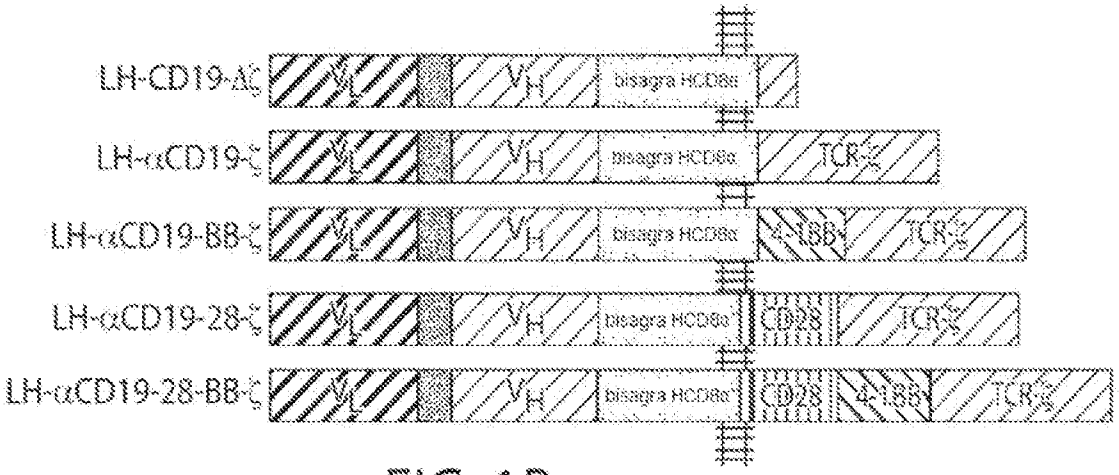

LH-CD19-Δζ
LH-αCD19-ζ
LH-αCD19-BB-ζ
LH-αCD19-28-ζ
LH-αCD19-28-BB-ζ
VH
VL
bisagra HCD8α
TCRζ
4-1BB
CD28

FIG. 1B

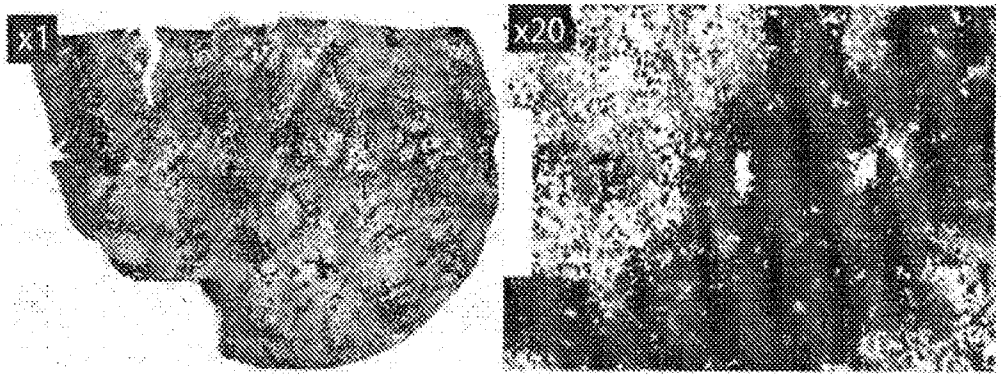


FIG. 2

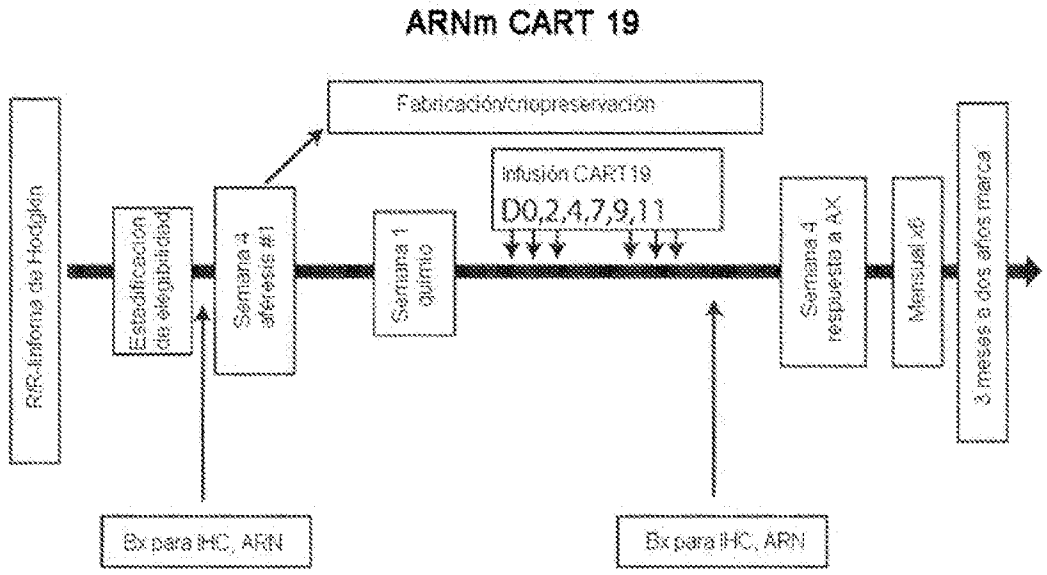

ARNm CART 19
Fabricación/criopreservación
Infusión CART19
D0,2,4,7,9,11
R/R-Informe de Hodgkin
Estadificación de elegibilidad
Semana 4 aféresis #1
Semana 1 quimio
Semana 4 respuesta a AX
Mensual x6
3 meses a dos años marca
Bx para IHC, ARN
Bx para IHC, ARN

FIG. 3

Seleccionado en CD4+

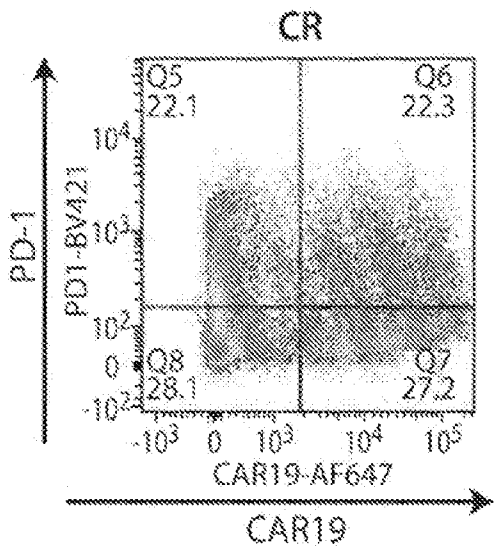


FIG. 4A

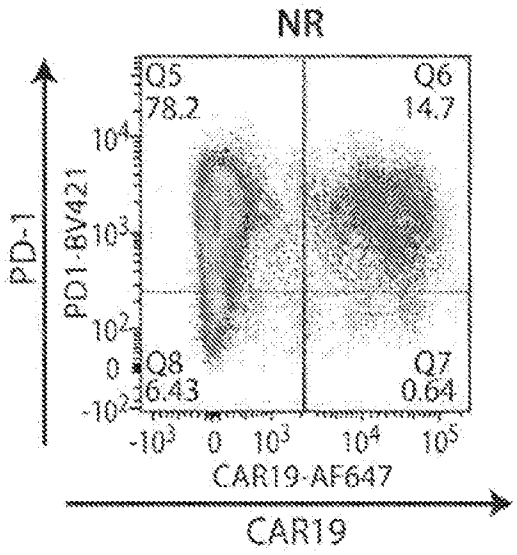


FIG. 4B

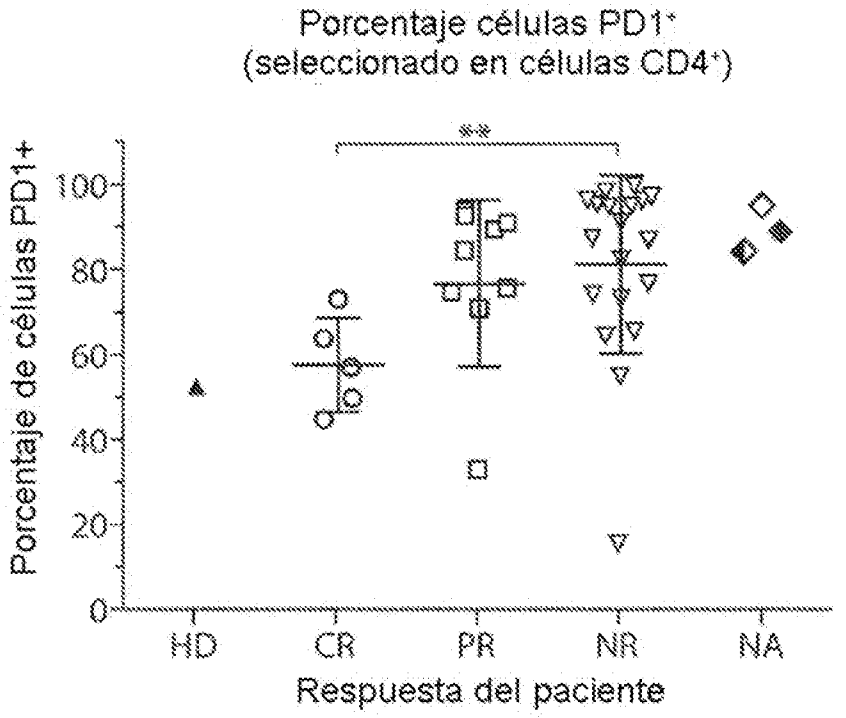

Porcentaje células PD1+
(seleccionado en células CD4+)
**
Porcentaje de células PD1+
100
80
60
40
20
0
HD
CR
PR
NR
NA
Respuesta del paciente

FIG. 4C

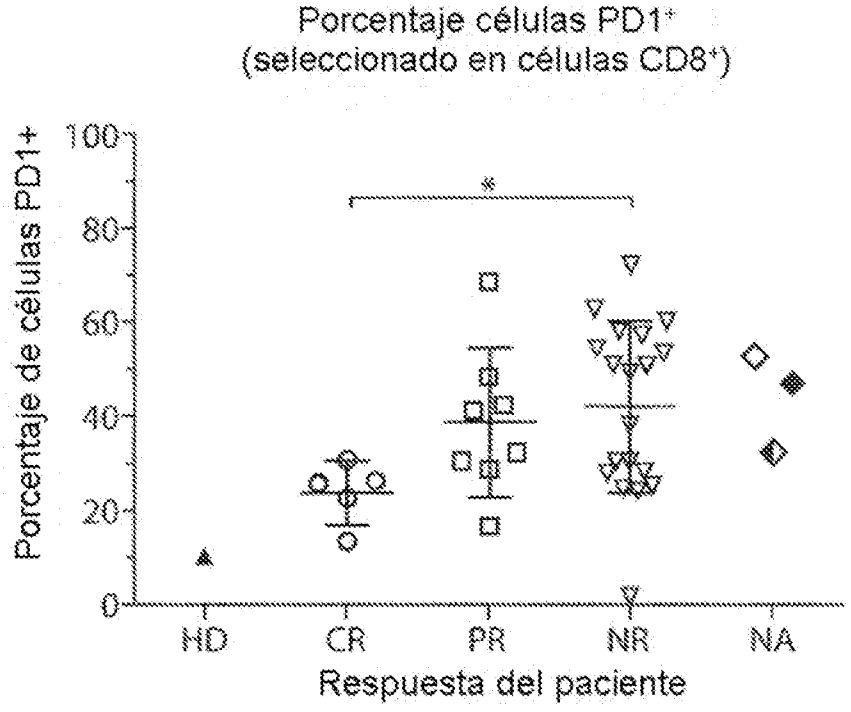

Porcentaje células PD1+
(seleccionado en células CD8+)
*
Porcentaje de células PD1+
100
80
60
40
20
0
HD
CR
PR
NR
NA
Respuesta del paciente

FIG. 4D

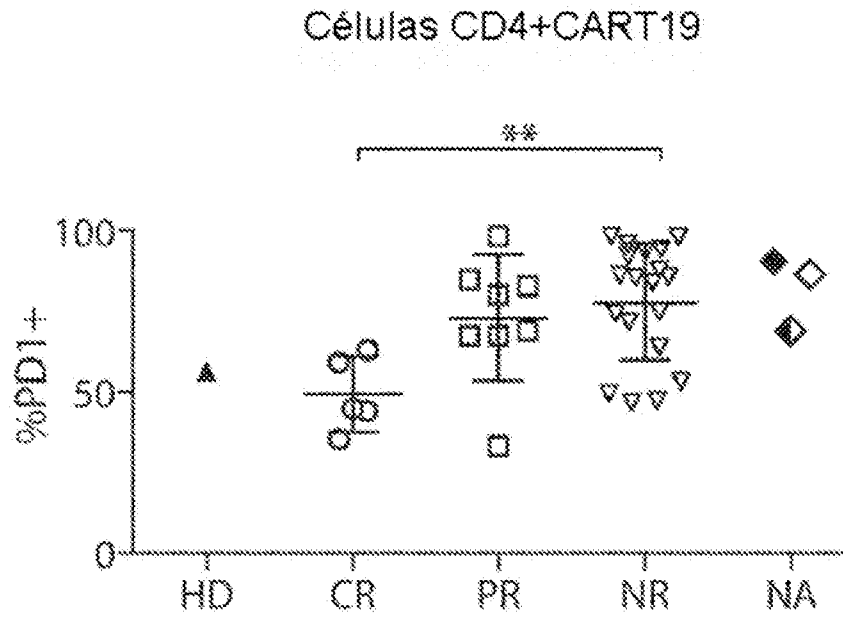

Células CD4+CART19
**
%PD1+
100
50
0
HD
CR
PR
NR
NA

FIG. 5A

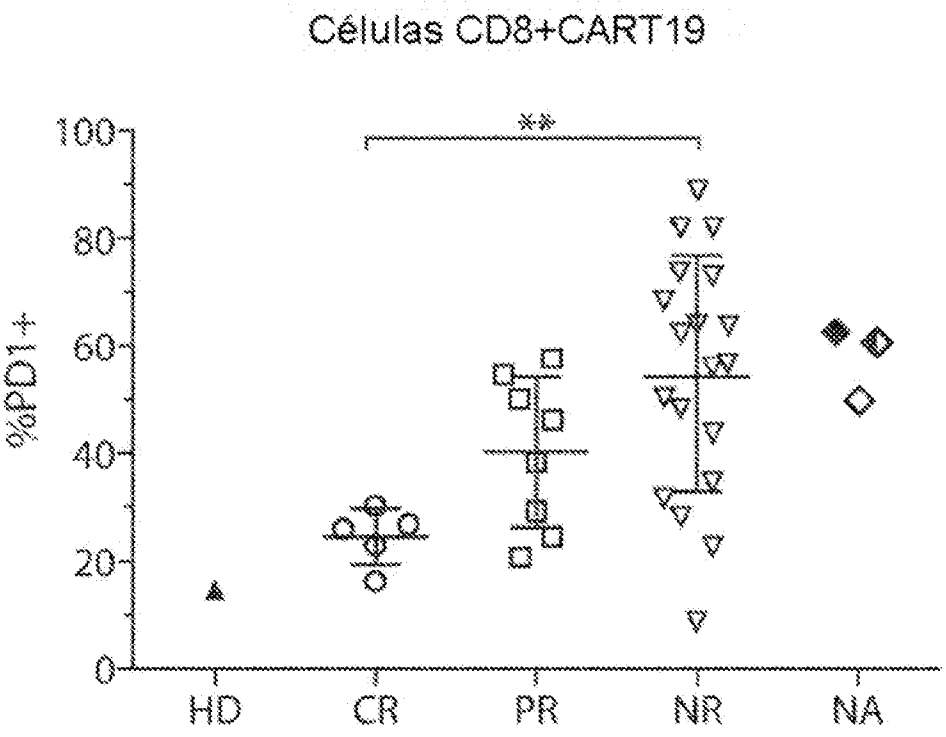

Células CD8+CART19
**
%PD1+
100
80
60
40
20
0
HD
CR
PR
NR
NA

FIG. 5B

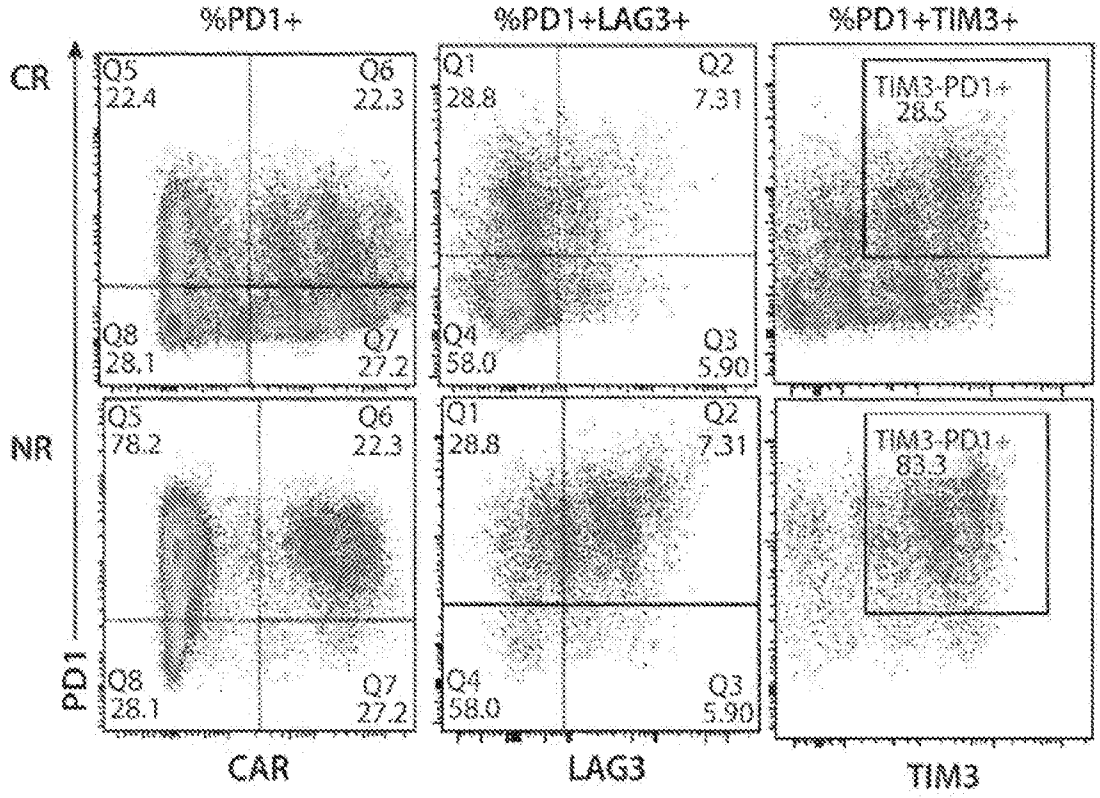

%PD1+
%PD1+LAG3+
%PD1+TIM3+
CR
NR
PD1
Q5
22.4
Q6
22.3
Q8
28.1
Q7
27.2
Q1
28.8
Q2
7.31
Q4
58.0
Q3
5.90
TIM3-PD1+
28.5
Q5
78.2
Q6
22.3
Q8
28.1
Q7
27.2
Q1
28.8
Q2
7.31
Q4
58.0
Q3
5.90
TIM3-PD1+
83.3
CAR
LAG3
TIM3

FIG. 6

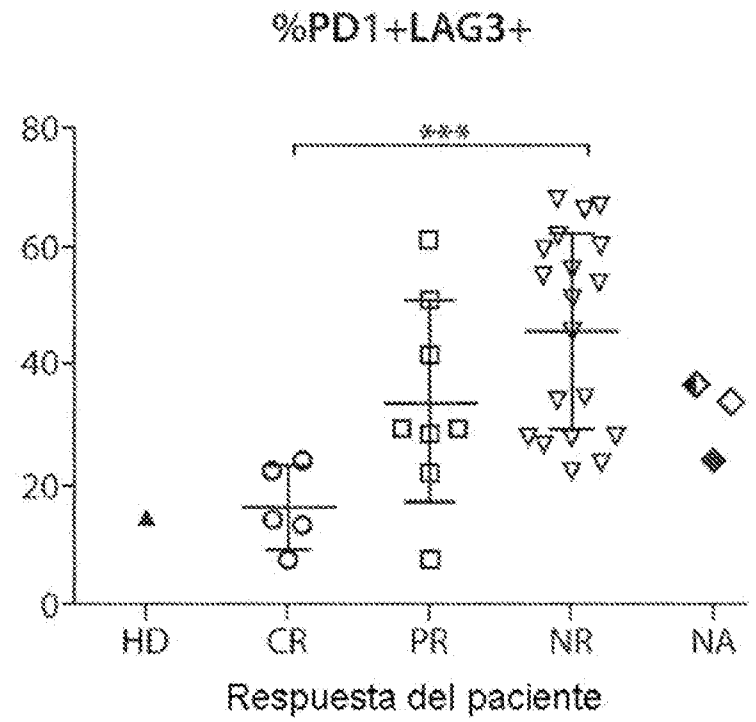

%PD1+LAG3+
***
80
60
40
20
0
HD
CR
PR
NR
NA
Respuesta del paciente

FIG. 7A

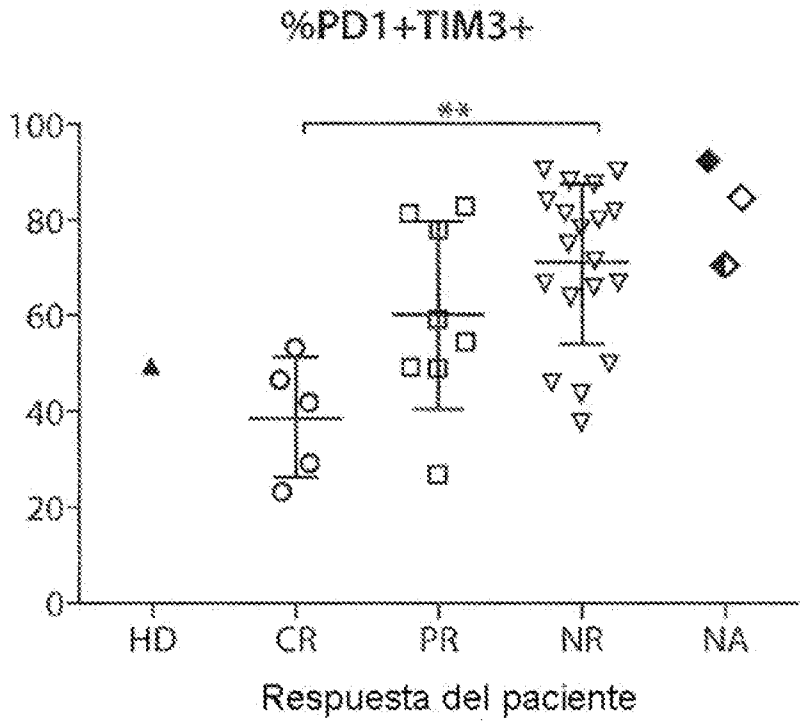

%PD1+TIM3+
**
100
80
60
40
20
0
HD
CR
PR
NR
NA
Respuesta del paciente

FIG. 7B

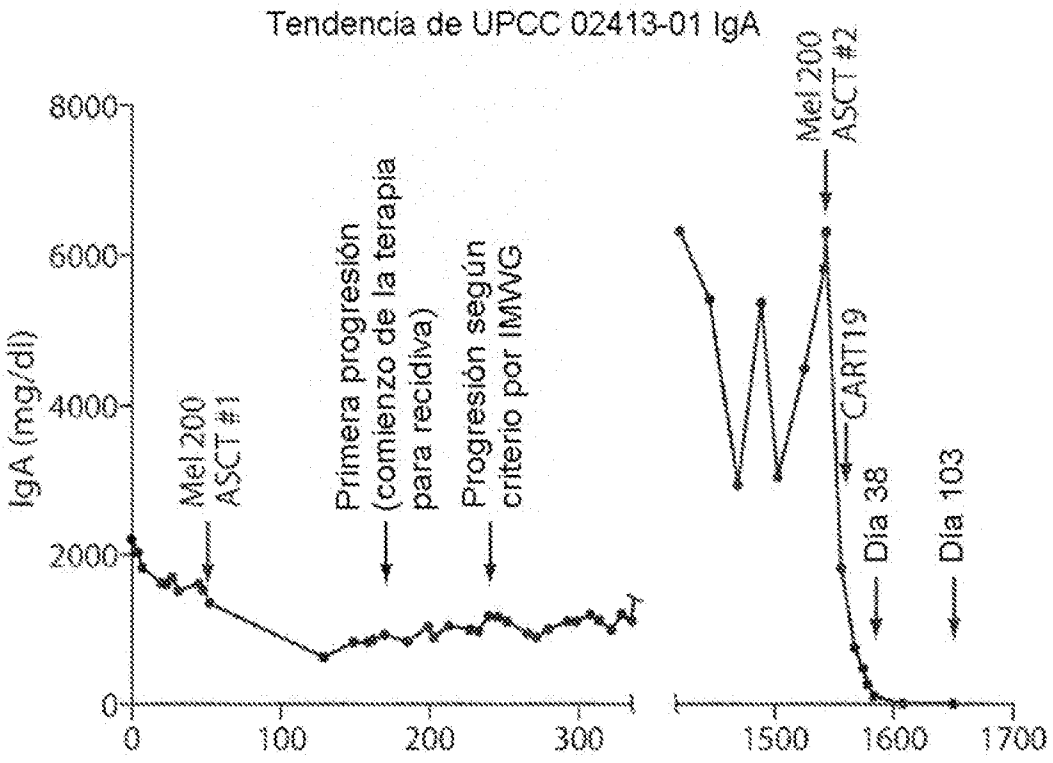

Tendencia de UPCC 02413-01 IgA
IgA (mg/dl)
8000
6000
4000
2000
0
0
100
200
300
1500
1600
1700
Mel 200
ASCT #1
Primera progresión
(comienzo de la terapia
para recidiva)
Progresión según
criterio por IMWG
Mel 200
ASCT #2
CART19
Día 38
Día 103

FIG. 8

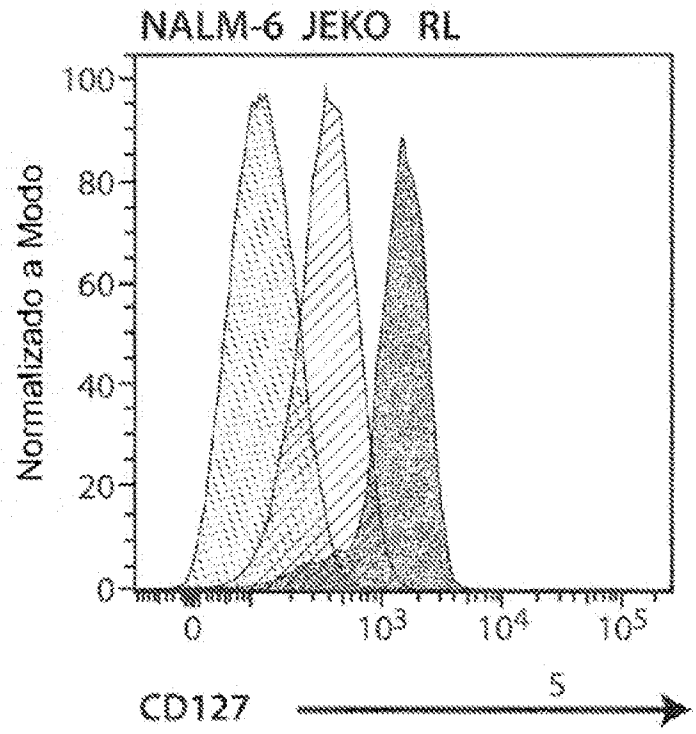

NALM-6 JEKO RL
Normalizado a Modo
100
80
60
40
20
0
0
10^3
10^4
10^5
CD127
5

FIG. 9A

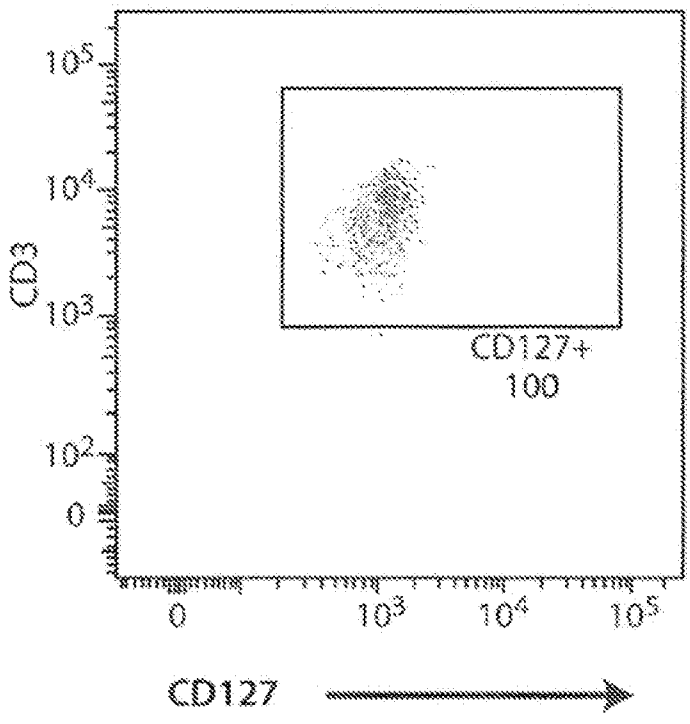

CD3
10^5
10^4
10^3
10^2
0
CD127+
100
0
10^3
10^4
10^5
CD127

FIG. 9B

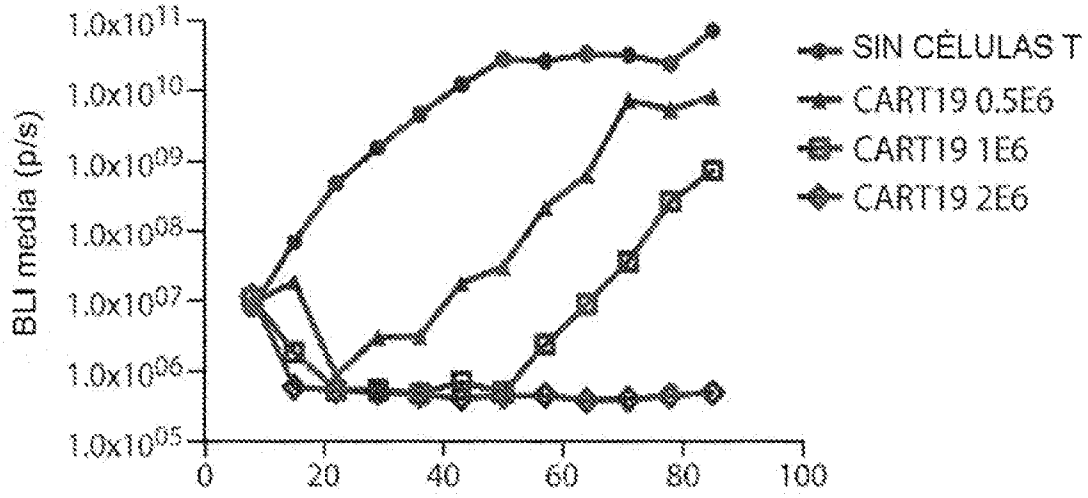

BLI media (p/s)
1.0x10^11
1.0x10^10
1.0x10^09
1.0x10^08
1.0x10^07
1.0x10^06
1.0x10^05
0
20
40
60
80
100
SIN CÉLULAS T
CART19 0.5E6
CART19 1E6
CART19 2E6

FIG. 10A

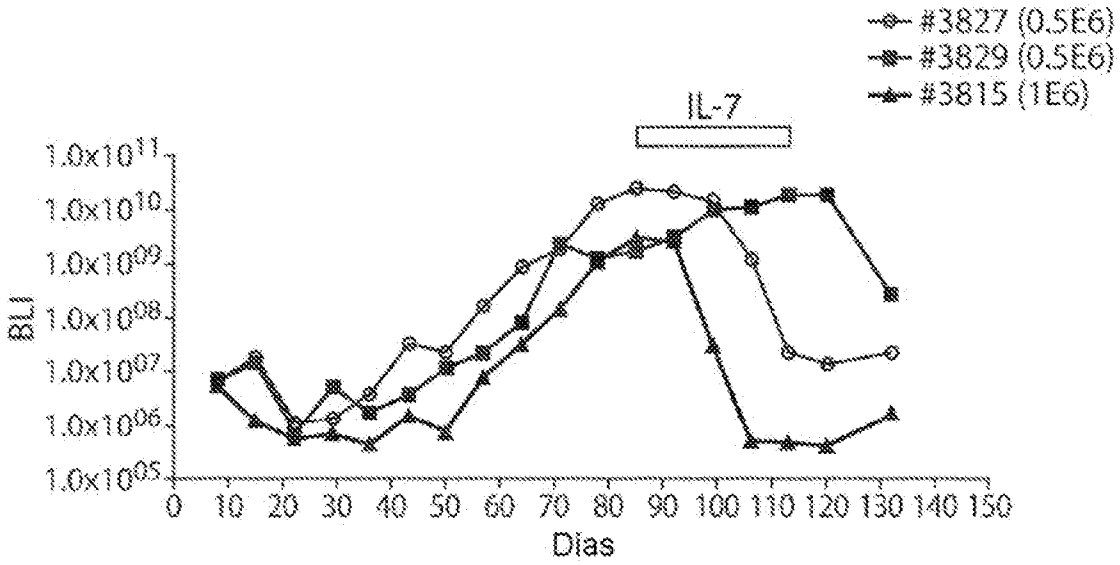


FIG. 10B

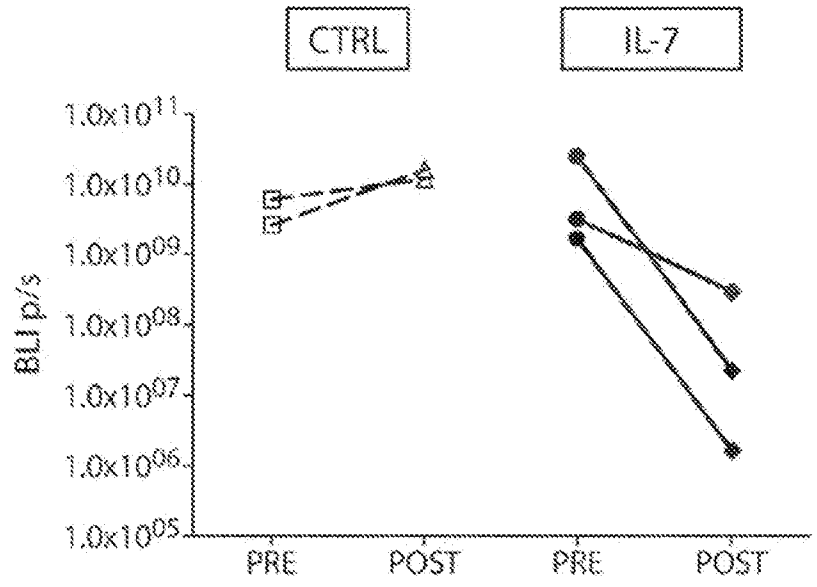


FIG. 10C

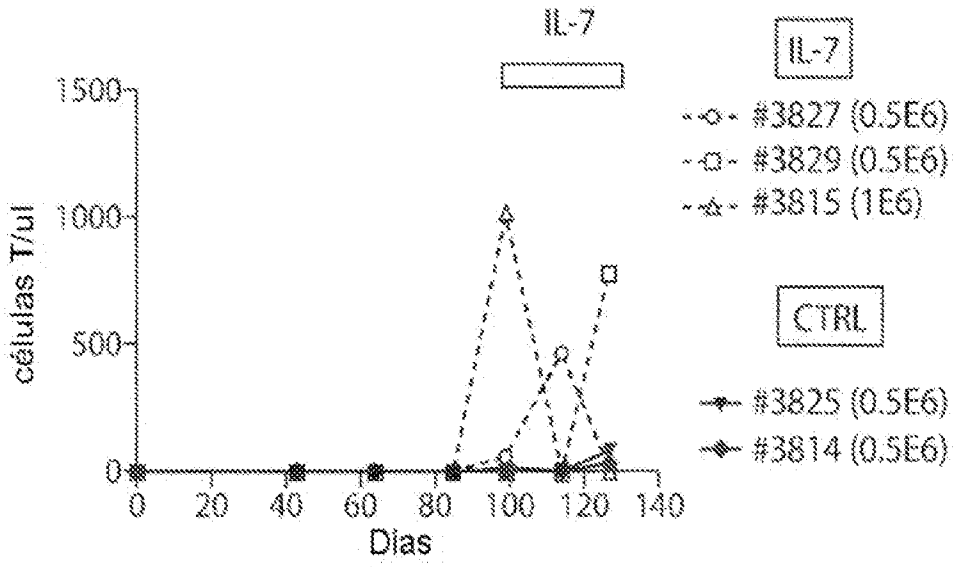


FIG. 11A

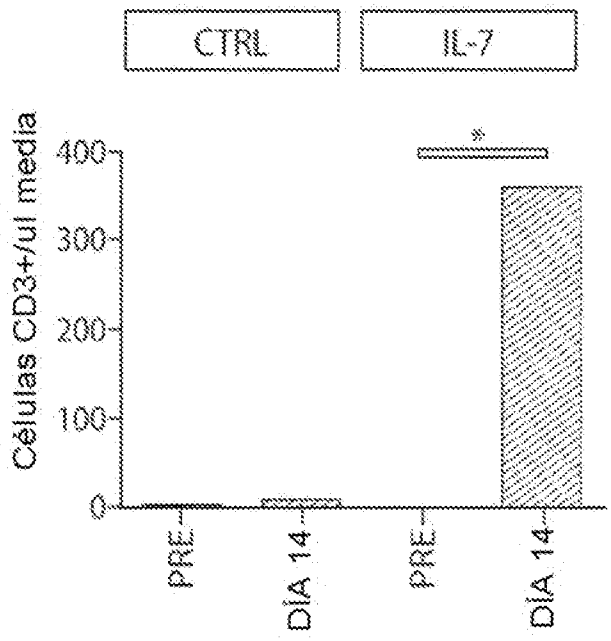


FIG. 11B

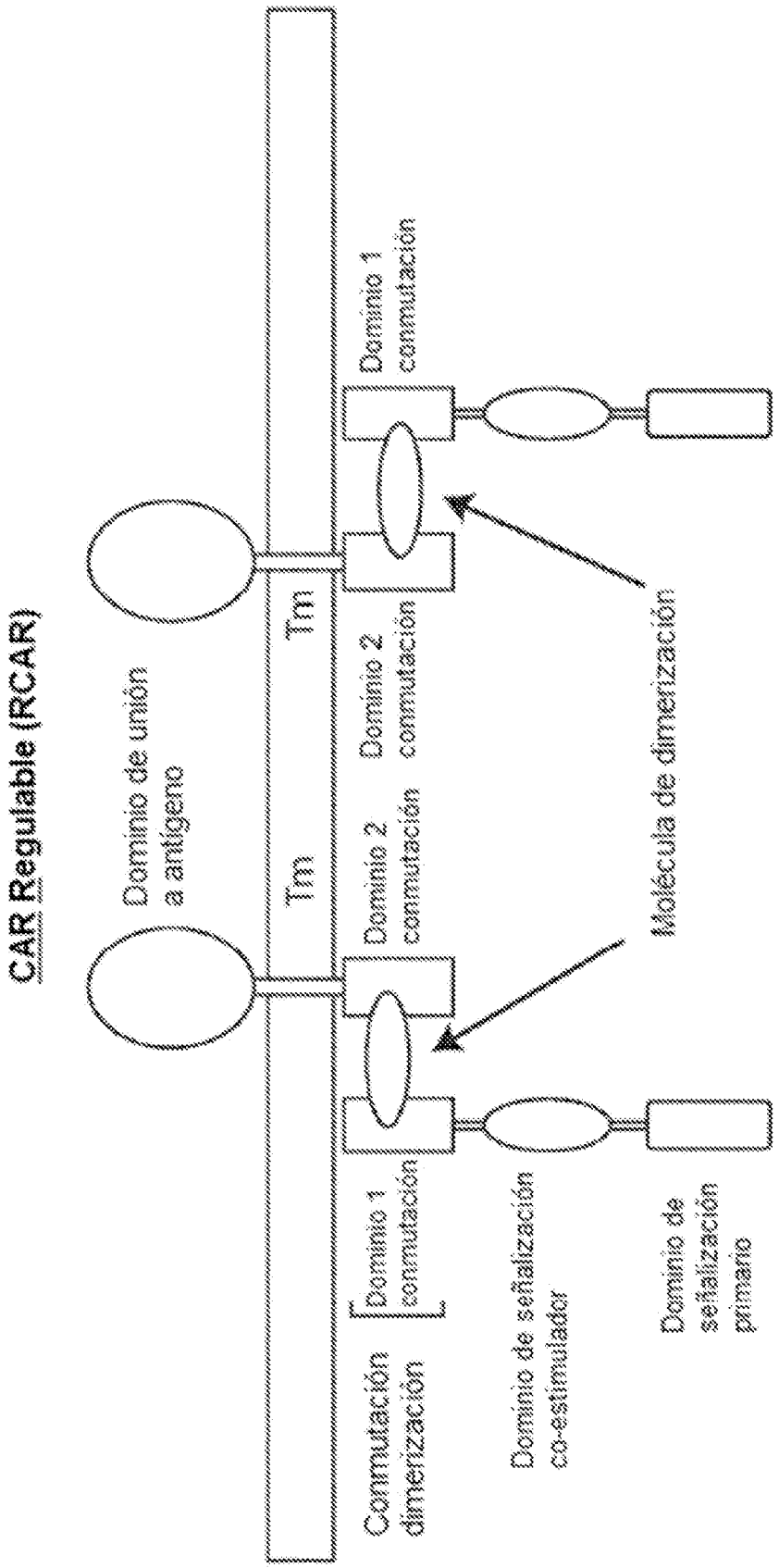

CAR Regulable (RCAR)
Dominio de unión a antígeno
Tm
Tm
Dominio 2 conmutación
Dominio 2 conmutación
Dominio 1 conmutación
Molécula de dimerización
Dominio 1 conmutación
Conmutación dimerización
Dominio de señalización co-estimulador
Dominio de señalización primario

Fig. 12

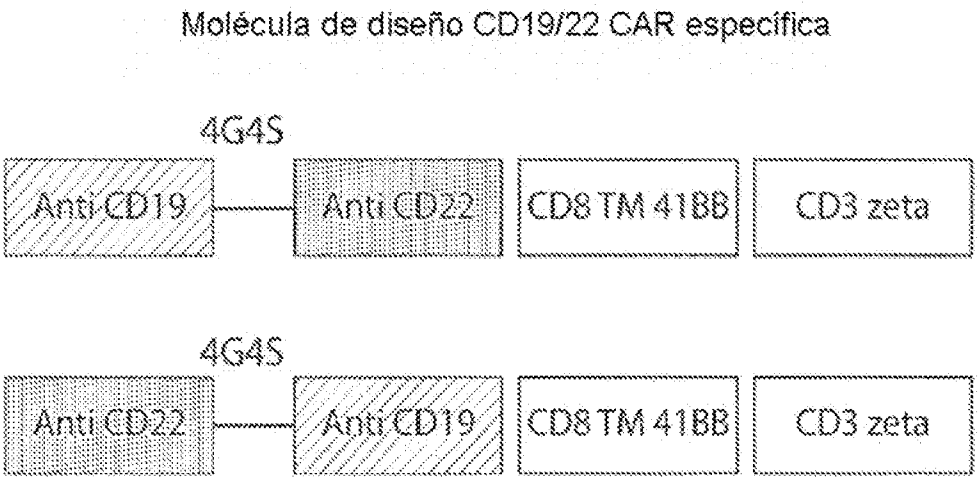

Molécula de diseño CD19/22 CAR específica
4G4S
Anti CD19
Anti CD22
CD8 TM 41BB
CD3 zeta
4G4S
Anti CD22
Anti CD19
CD8 TM 41BB
CD3 zeta

FIG. 13

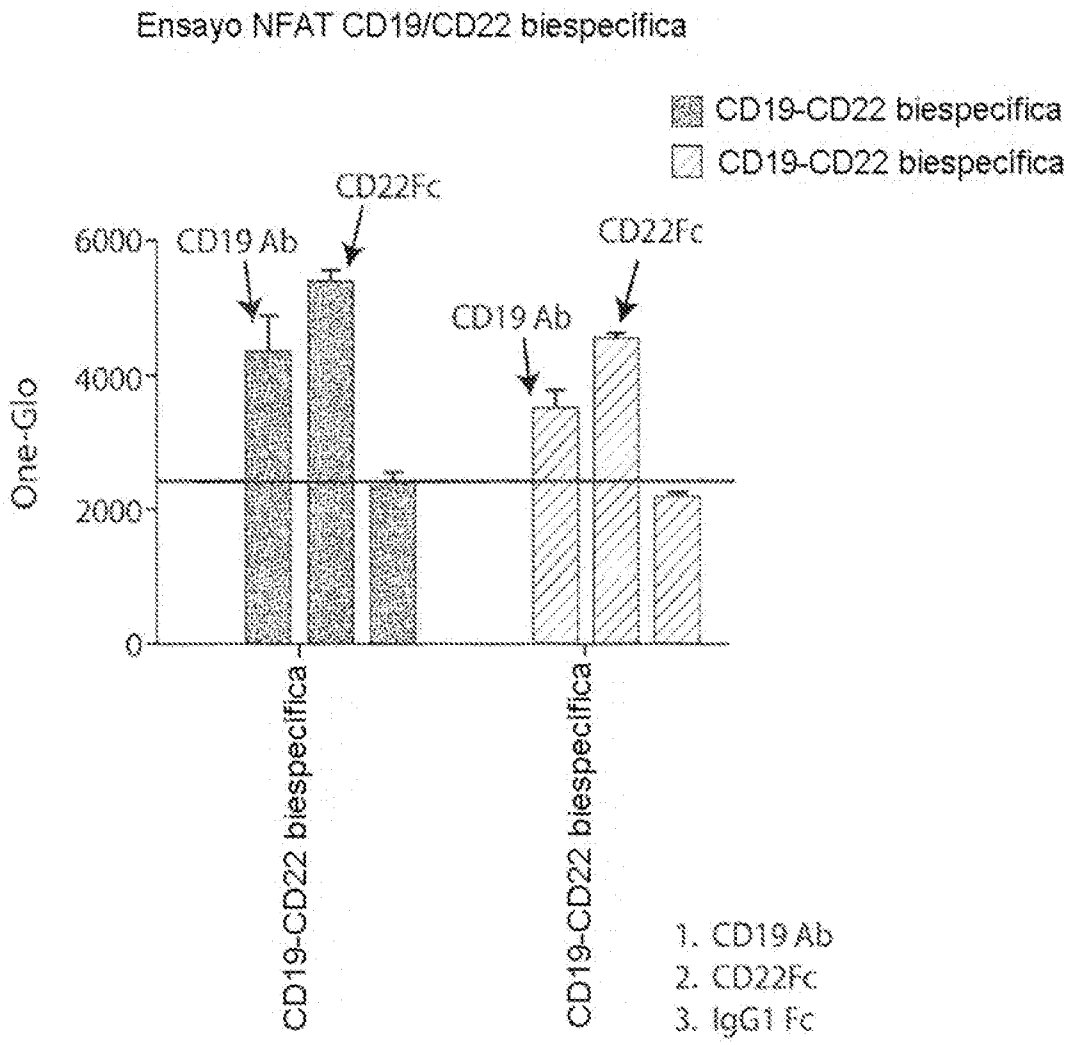

Ensayo NFAT CD19/CD22 biespecífica
CD19-CD22 biespecífica
CD19-CD22 biespecífica
CD22Fc
CD22Fc
6000
CD19 Ab
CD19 Ab
4000
One-Glo
2000
0
CD19-CD22 biespecífica
CD19-CD22 biespecífica
1. CD19 Ab
2. CD22Fc
3. IgG1 Fc

FIG. 14

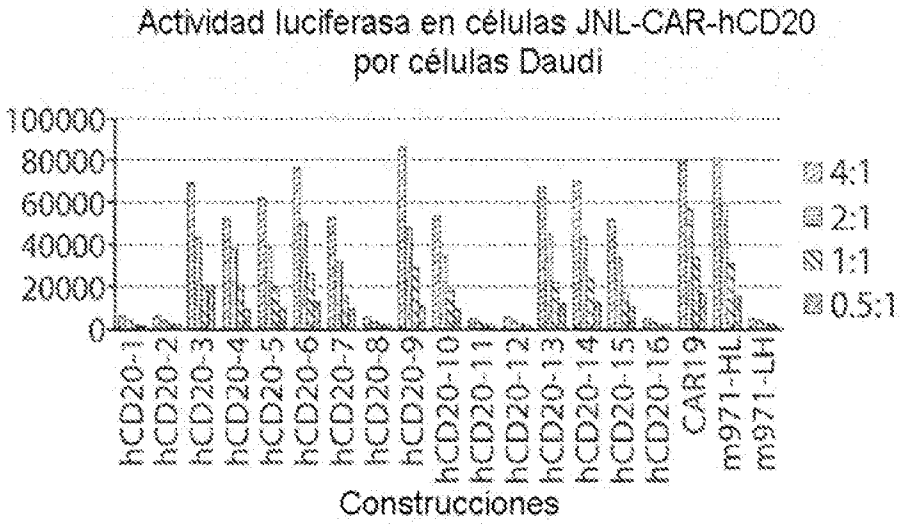


FIG. 15A

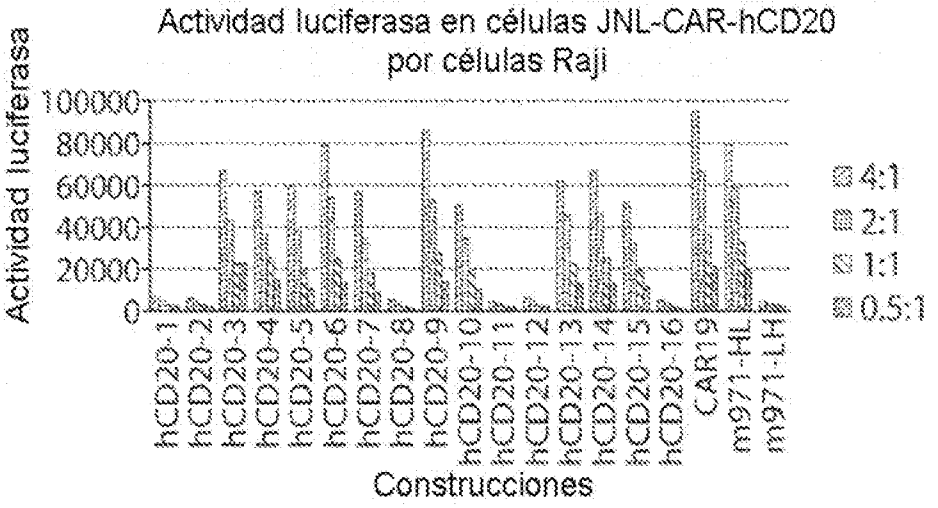


FIG. 15B

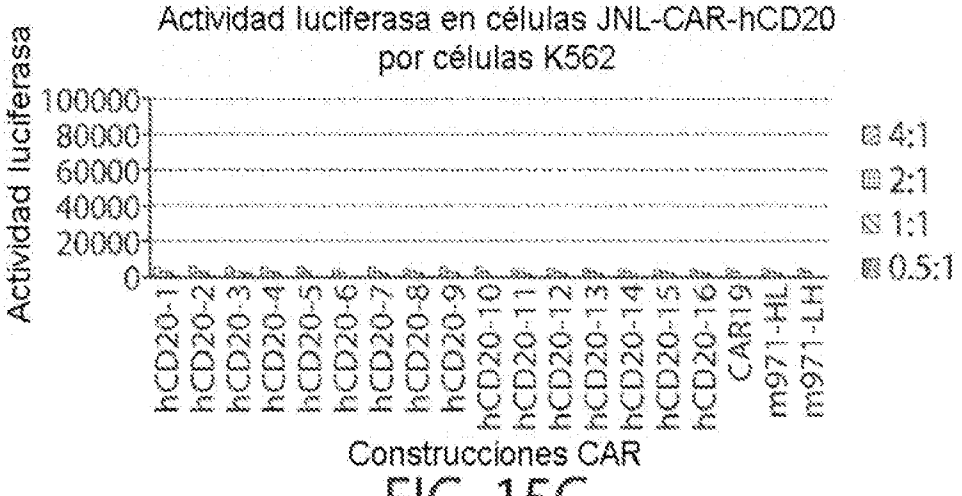


FIG. 15C

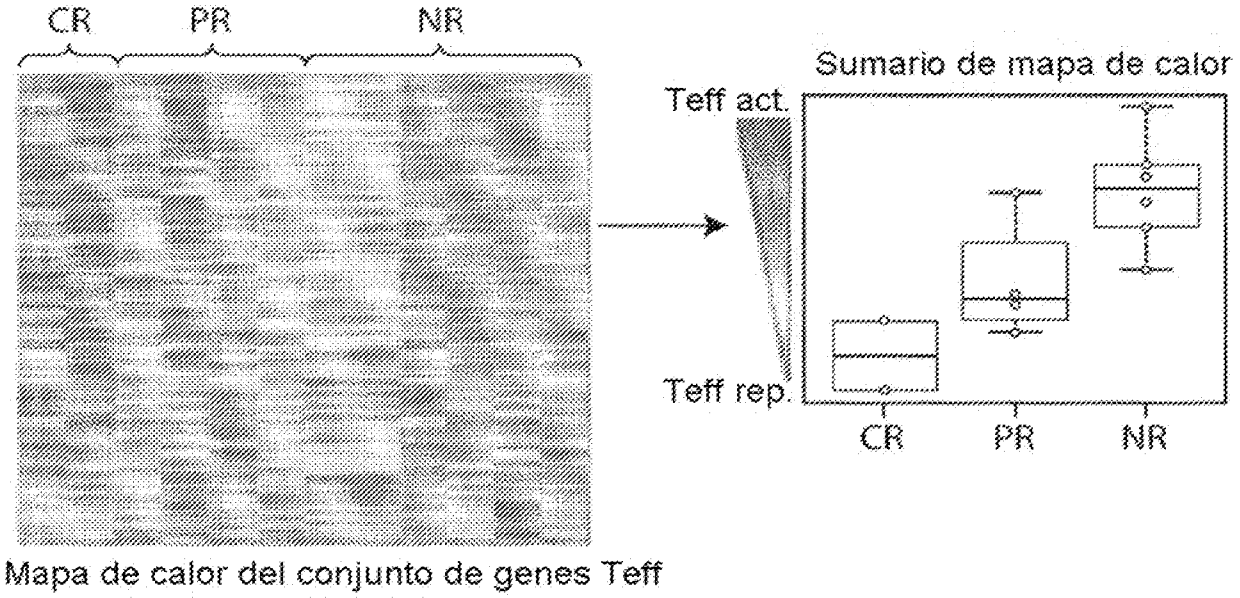
Teff activadas enriquecidas en NRs frente a CRs

Genes regulados al alza en Teff activadas frente a Teff en reposo también regulados al alza en NRs

[Szabo]

Genes regulados al alza en Teff activadas frente a células Teff en reposo

AARS
ABCF2
ACOT7
ACTL6A
AHSA1
AIM2
AIMP2
ALAS1
ALDH1B1
ANKRD13B
APOL1
ARMCX3
ASPHD2
B3GNT5



Mapa de calor del conjunto de genes Teff

FIG. 16

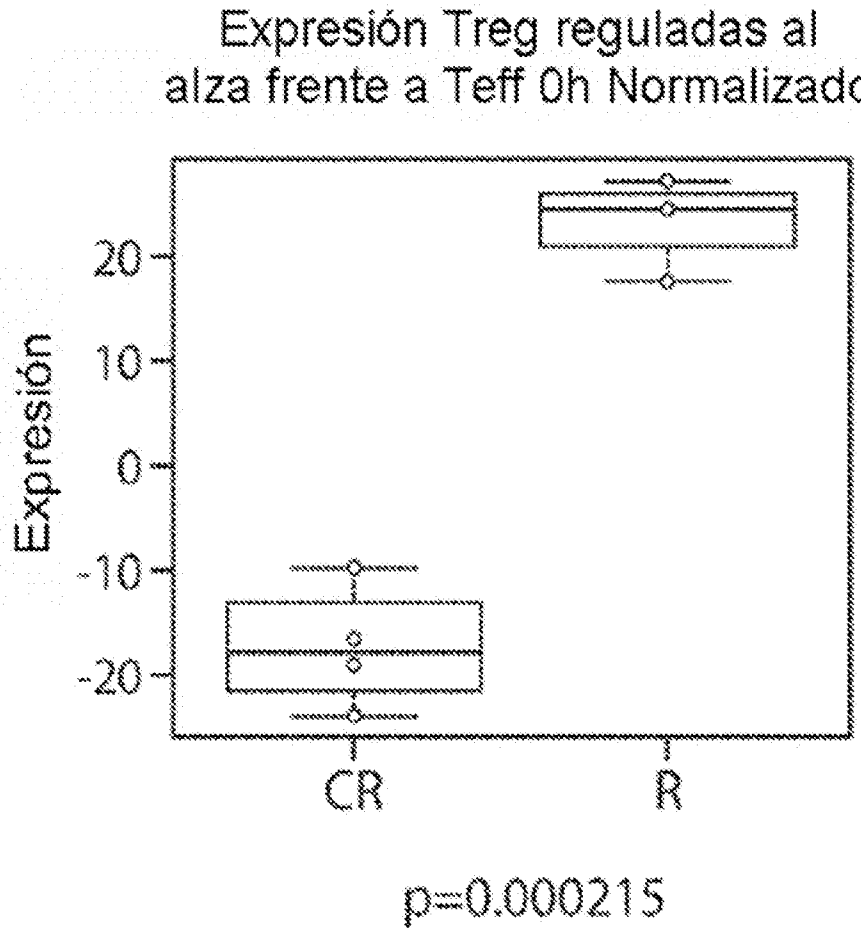

Expresión Treg reguladas al alza frente a Teff 0h Normalizado
Expresión
20
10
0
-10
-20
CR
R
p=0.000215

FIG. 17

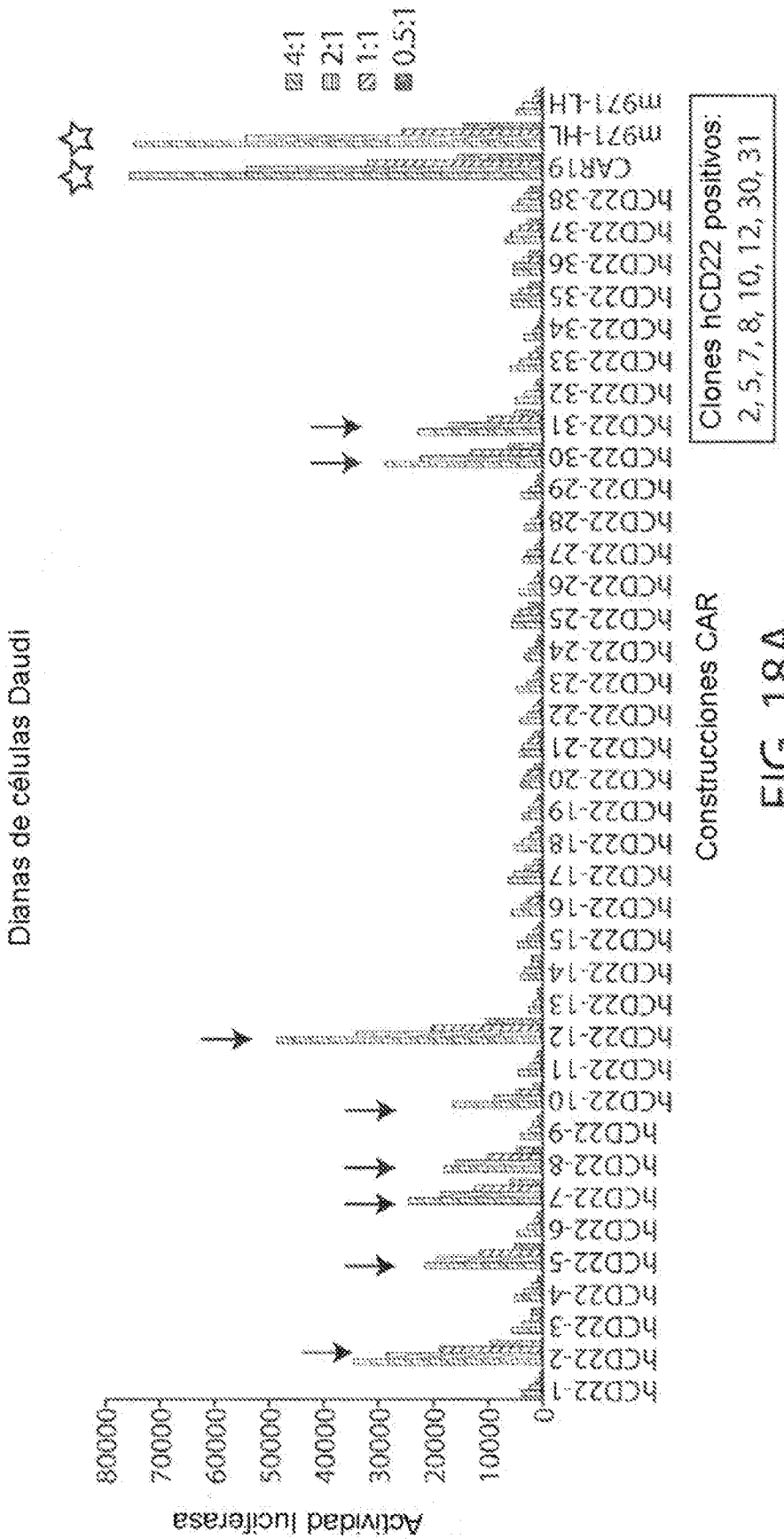

Dianas de células Daudi
Actividad luciferasa
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
70000
80000
4:1
2:1
1:1
0.5:1
hCD22-1
hCD22-2
hCD22-3
hCD22-4
hCD22-5
hCD22-6
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-9
hCD22-10
hCD22-11
hCD22-12
hCD22-13
hCD22-14
hCD22-15
hCD22-16
hCD22-17
hCD22-18
hCD22-19
hCD22-20
hCD22-21
hCD22-22
hCD22-23
hCD22-24
hCD22-25
hCD22-26
hCD22-27
hCD22-28
hCD22-29
hCD22-30
hCD22-31
hCD22-32
hCD22-33
hCD22-34
hCD22-35
hCD22-36
hCD22-37
hCD22-38
CAR19
m971-HL
m971-LH
Construcciones CAR
Clones hCD22 positivos:
2, 5, 7, 8, 10, 12, 30, 31

FIG. 18A

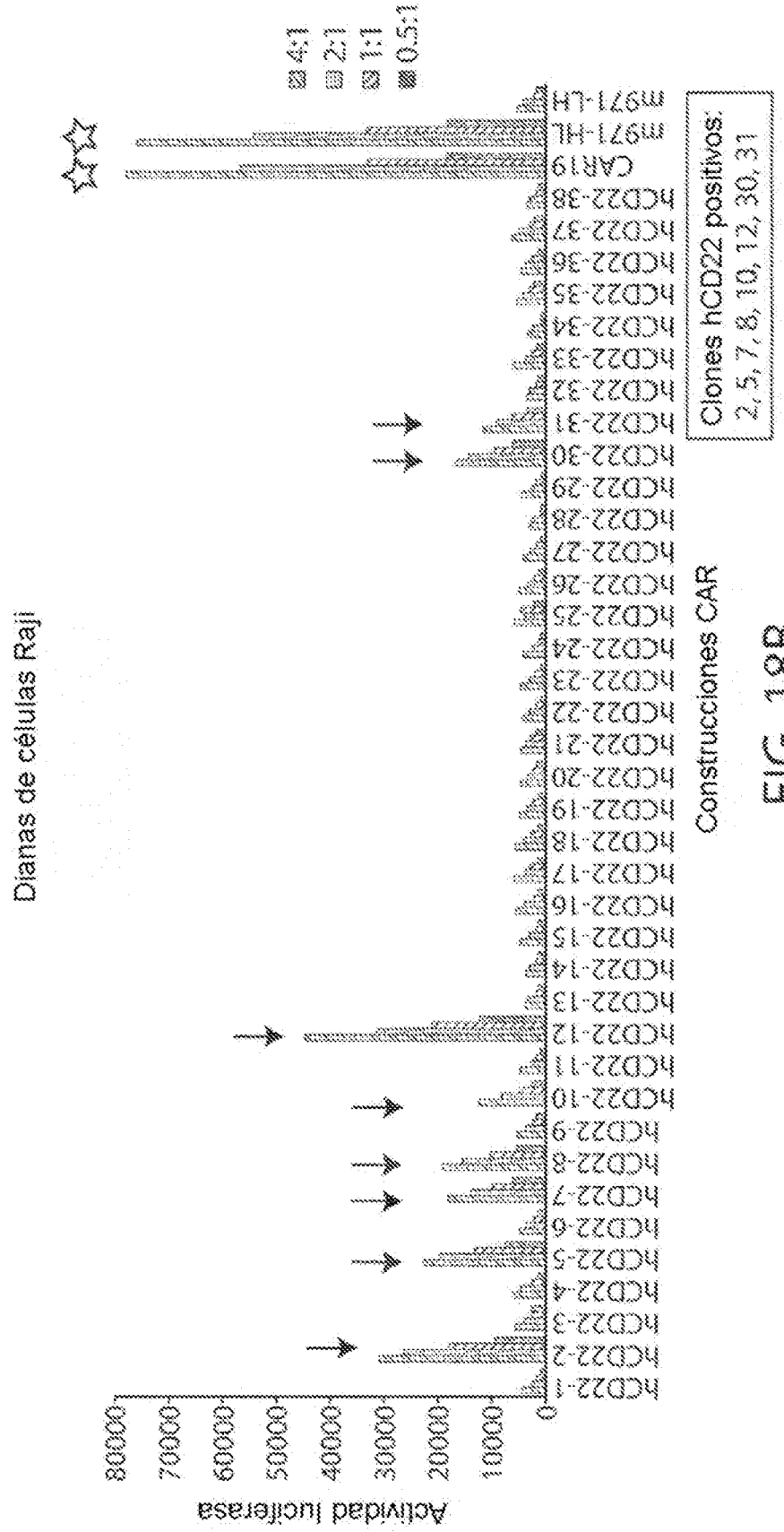

Dianas de células Raji
Actividad luciferasa
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
4:1
2:1
1:1
0.5:1
hCD22-1
hCD22-2
hCD22-3
hCD22-4
hCD22-5
hCD22-6
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-9
hCD22-10
hCD22-11
hCD22-12
hCD22-13
hCD22-14
hCD22-15
hCD22-16
hCD22-17
hCD22-18
hCD22-19
hCD22-20
hCD22-21
hCD22-22
hCD22-23
hCD22-24
hCD22-25
hCD22-26
hCD22-27
hCD22-28
hCD22-29
hCD22-30
hCD22-31
hCD22-32
hCD22-33
hCD22-34
hCD22-35
hCD22-36
hCD22-37
hCD22-38
CAR19
m971-HL
m971-LH
Construcciones CAR
Clones hCD22 positivos:
2, 5, 7, 8, 10, 12, 30, 31

FIG. 18B

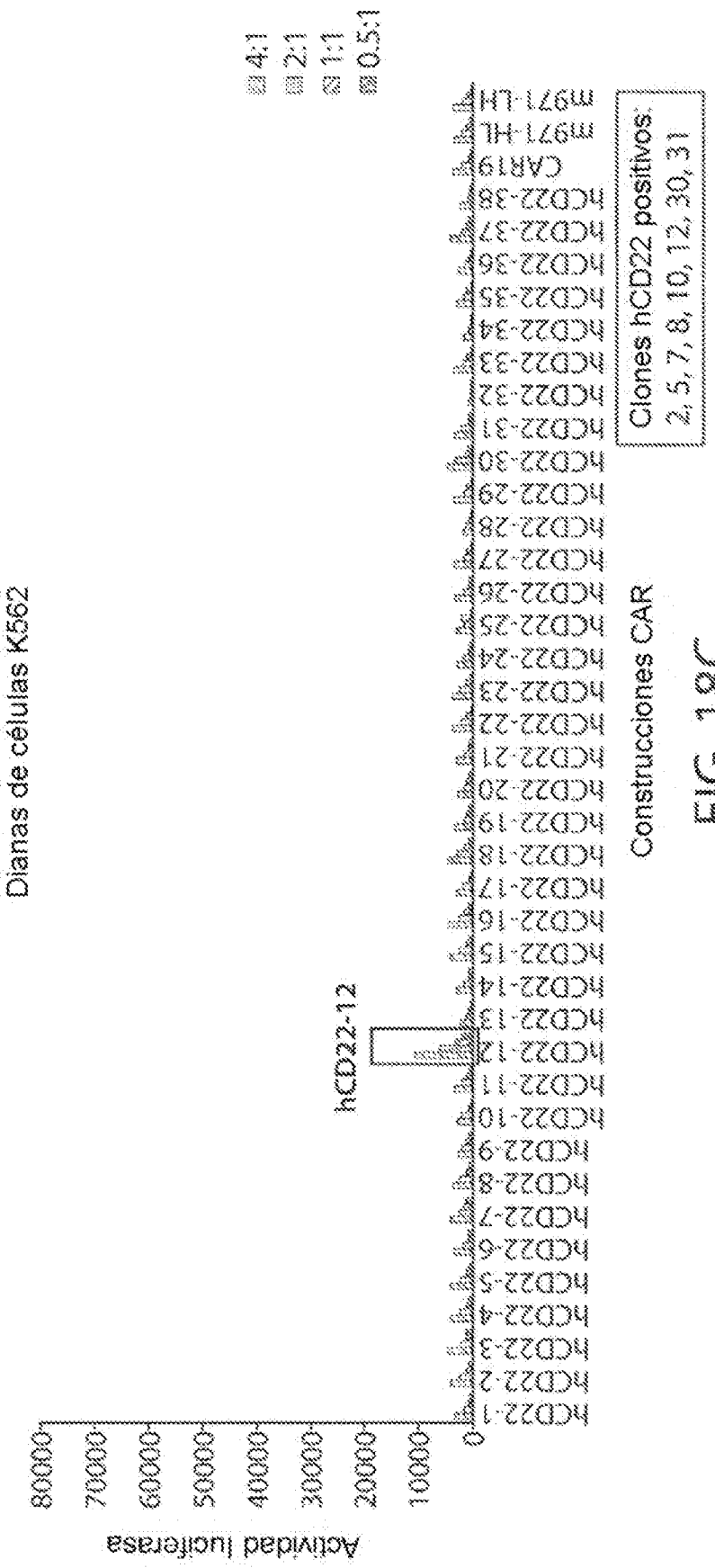

Dianas de células K562
Actividad luciferasa
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
4:1
2:1
1:1
0.5:1
hCD22-12
hCD22-1
hCD22-2
hCD22-3
hCD22-4
hCD22-5
hCD22-6
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-9
hCD22-10
hCD22-11
hCD22-12
hCD22-13
hCD22-14
hCD22-15
hCD22-16
hCD22-17
hCD22-18
hCD22-19
hCD22-20
hCD22-21
hCD22-22
hCD22-23
hCD22-24
hCD22-25
hCD22-26
hCD22-27
hCD22-28
hCD22-29
hCD22-30
hCD22-31
hCD22-32
hCD22-33
hCD22-34
hCD22-35
hCD22-36
hCD22-37
hCD22-38
CAR19
m971-HL
m971-LH
Construcciones CAR
Clones hCD22 positivos:
2, 5, 7, 8, 10, 12, 30, 31

FIG. 18C

Proteína L

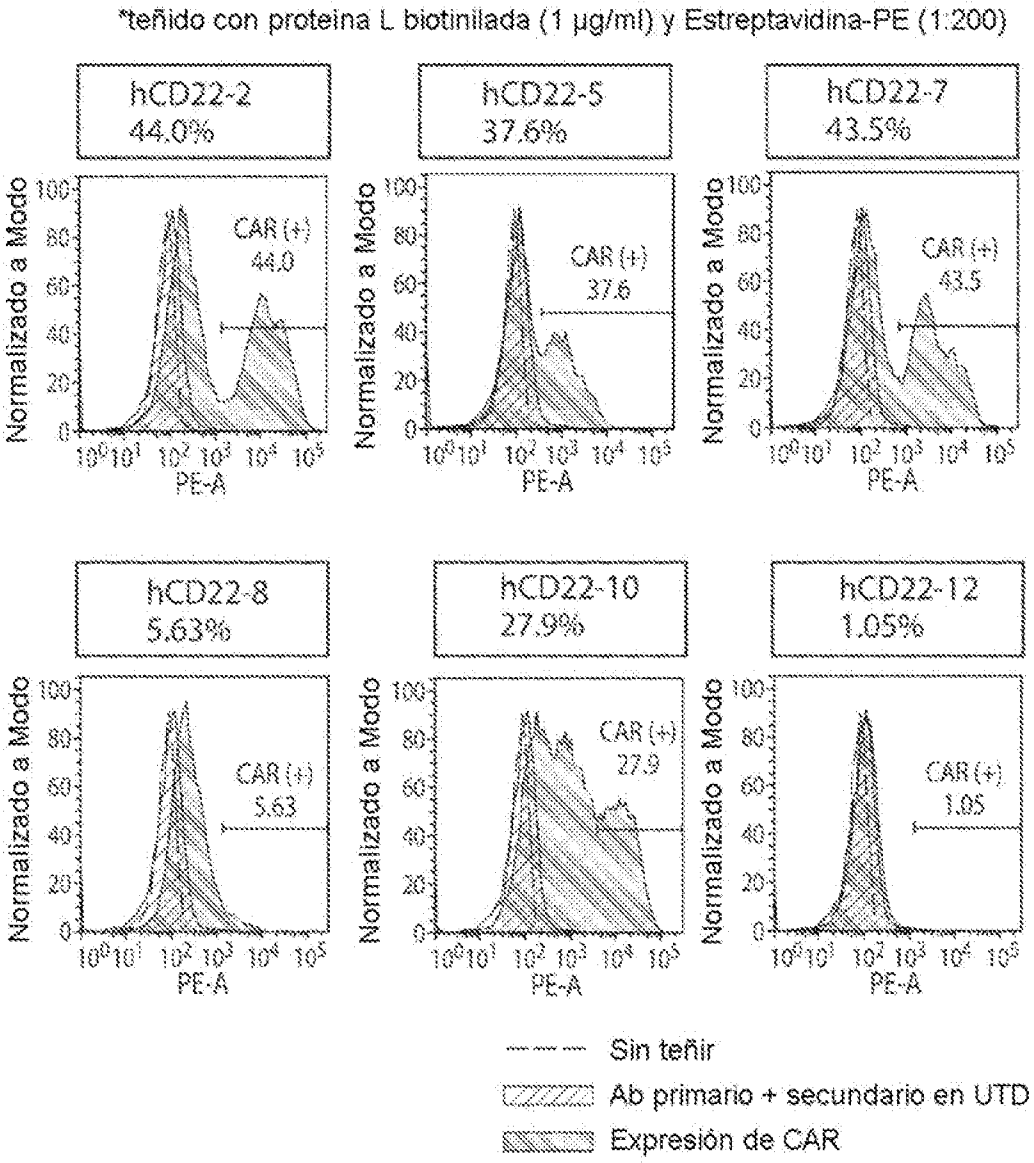


FIG. 19-1

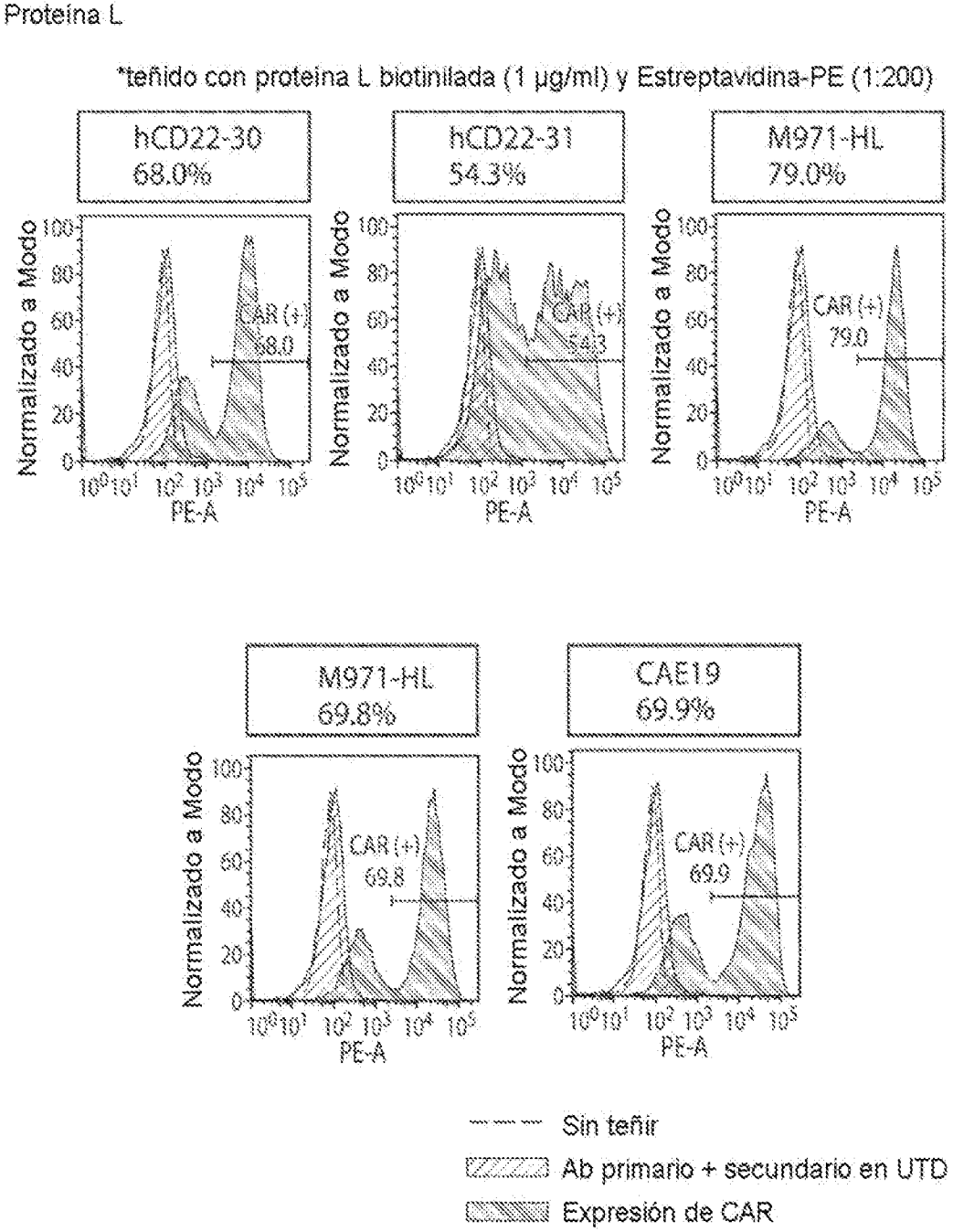

Proteína L
*teñido con proteína L biotinilada (1 µg/ml) y Estreptavidina-PE (1:200)
hCD22-30
68.0%
hCD22-31
54.3%
M971-HL
79.0%
M971-HL
69.8%
CAE19
69.9%
Normalizado a Modo
PE-A
CAR (+)
68.0
CAR (+)
54.3
CAR (+)
79.0
CAR (+)
69.8
CAR (+)
69.9
Sin teñir
Ab primario + secundario en UTD
Expresión de CAR

FIG. 19-2

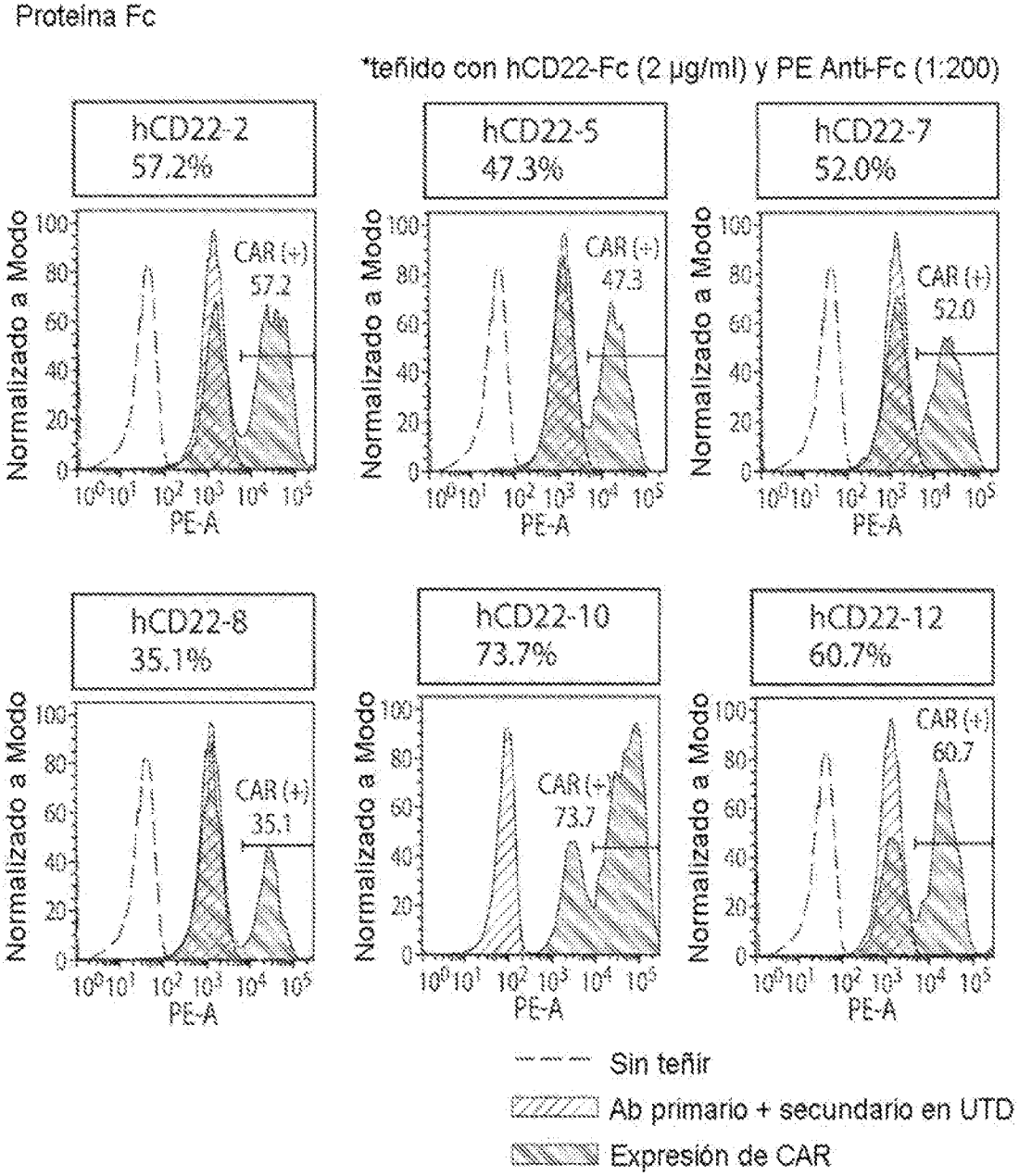

Proteína Fc
*teñido con hCD22-Fc (2 µg/ml) y PE Anti-Fc (1:200)
hCD22-2
57.2%
hCD22-5
47.3%
hCD22-7
52.0%
hCD22-8
35.1%
hCD22-10
73.7%
hCD22-12
60.7%
Normalizado a Modo
PE-A
CAR (+)
57.2
47.3
52.0
35.1
73.7
60.7
Sin teñir
Ab primario + secundario en UTD
Expresión de CAR

FIG. 19-3

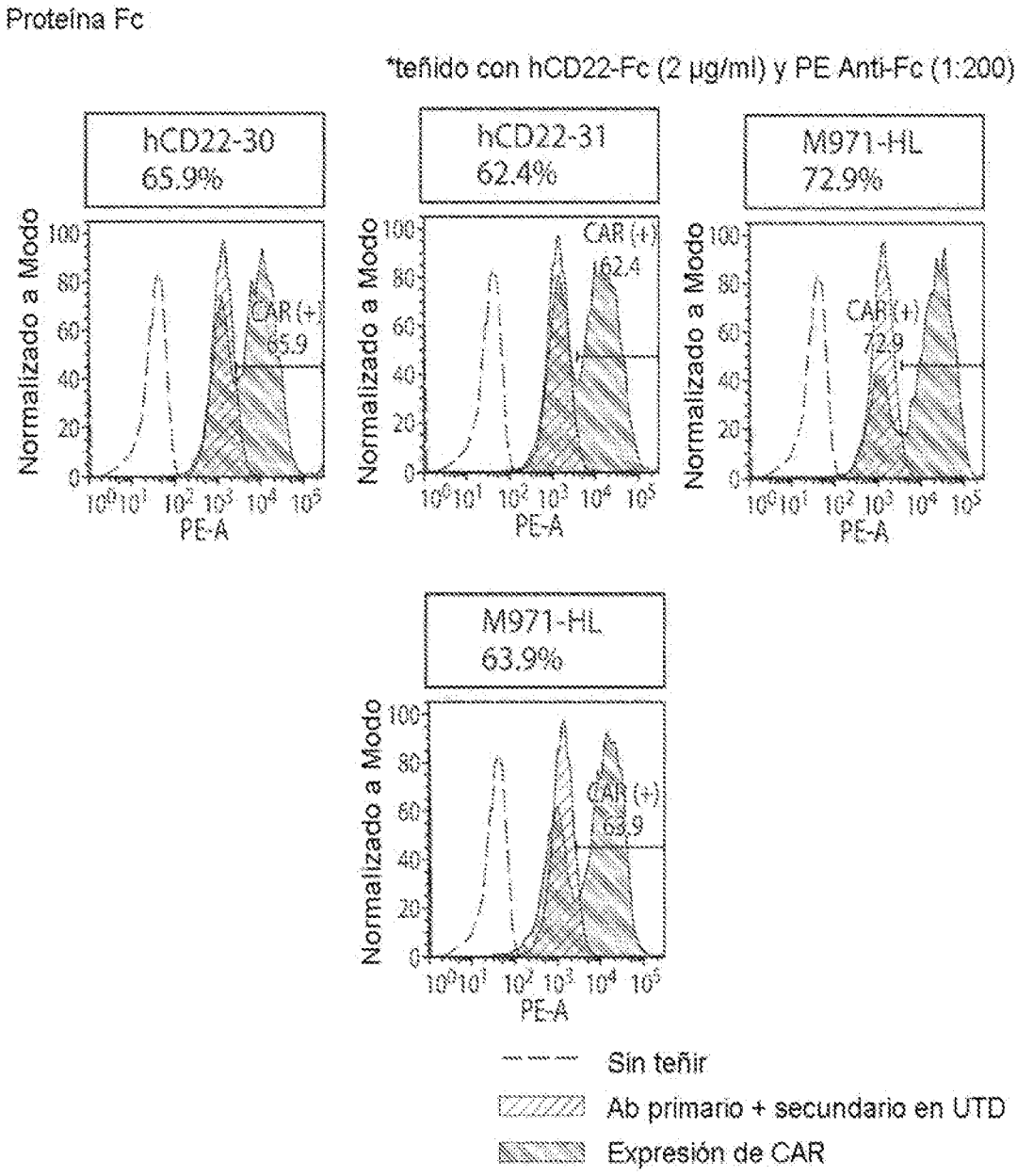

Proteína Fc
*teñido con hCD22-Fc (2 µg/ml) y PE Anti-Fc (1:200)
hCD22-30
65.9%
hCD22-31
62.4%
M971-HL
72.9%
M971-HL
63.9%
Normalizado a Modo
PE-A
CAR (+)
65.9
CAR (+)
62.4
CAR (+)
72.9
CAR (+)
63.9
Sin teñir
Ab primario + secundario en UTD
Expresión de CAR

FIG. 19-4

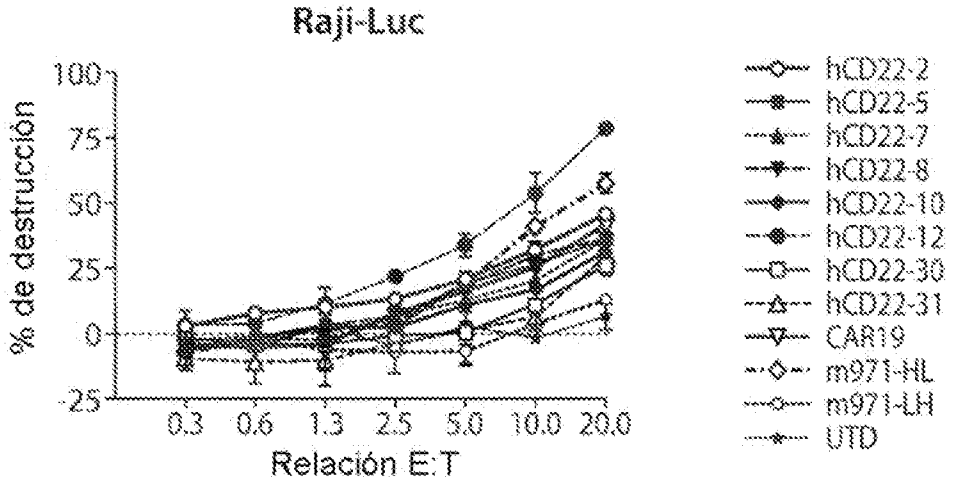


FIG. 20A

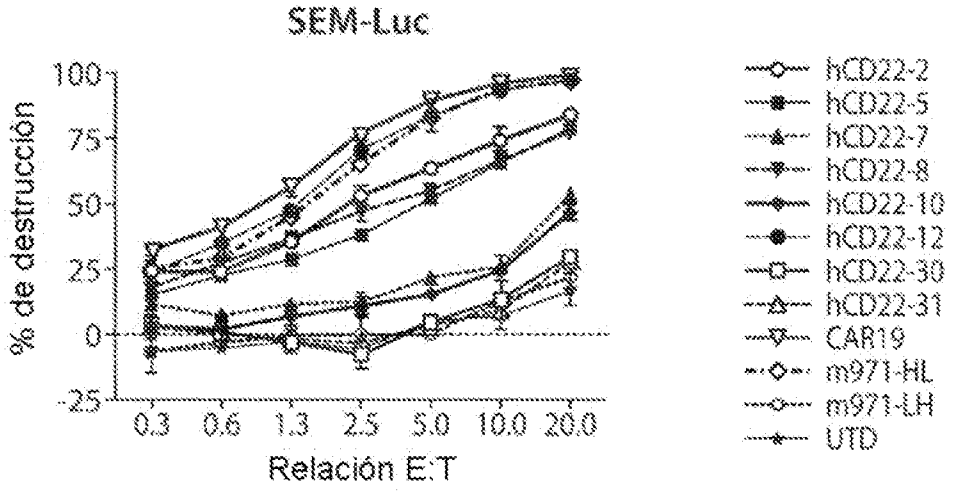


FIG. 20B

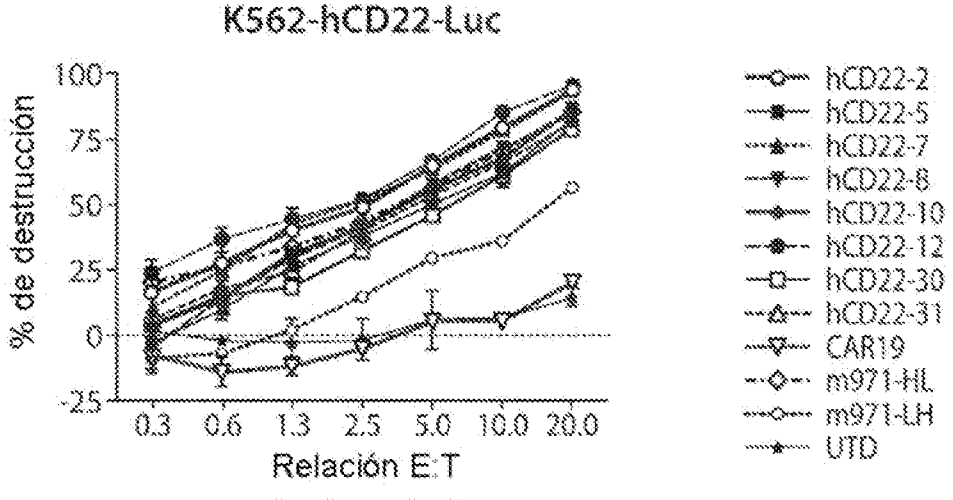


FIG. 20C

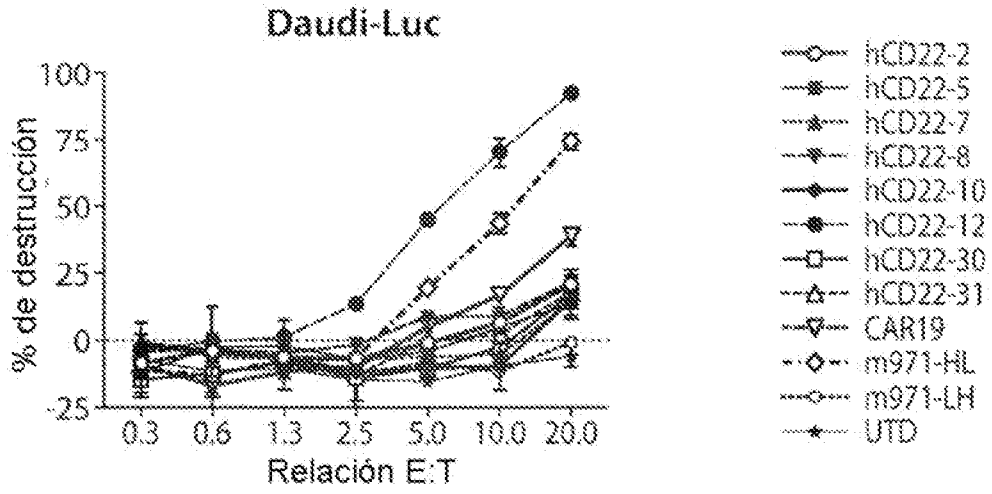


FIG. 20D

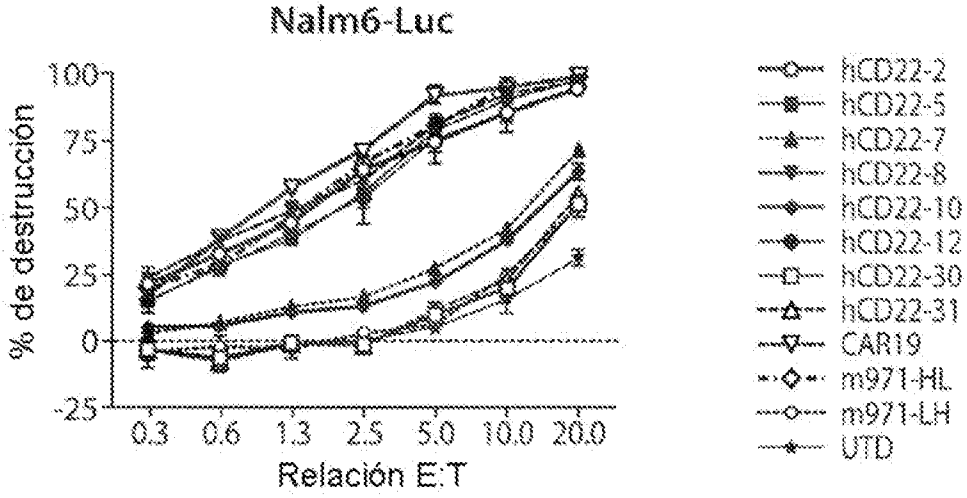


FIG. 20E

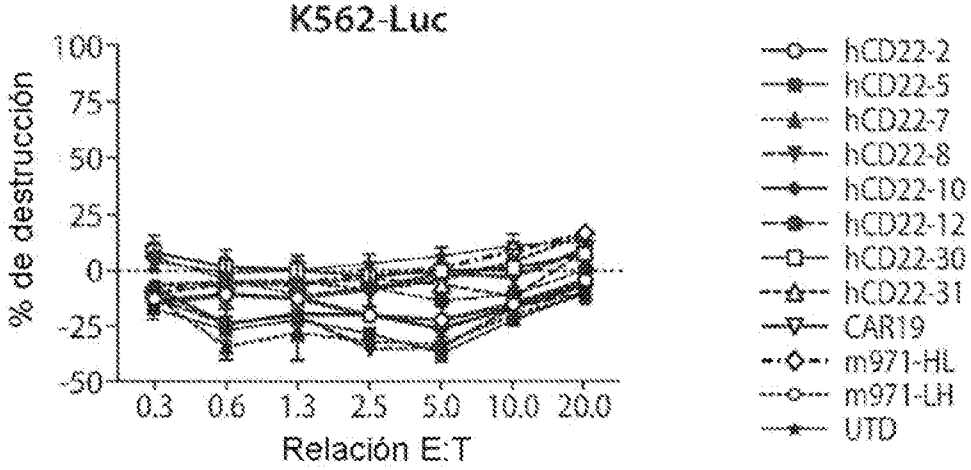


FIG. 20F

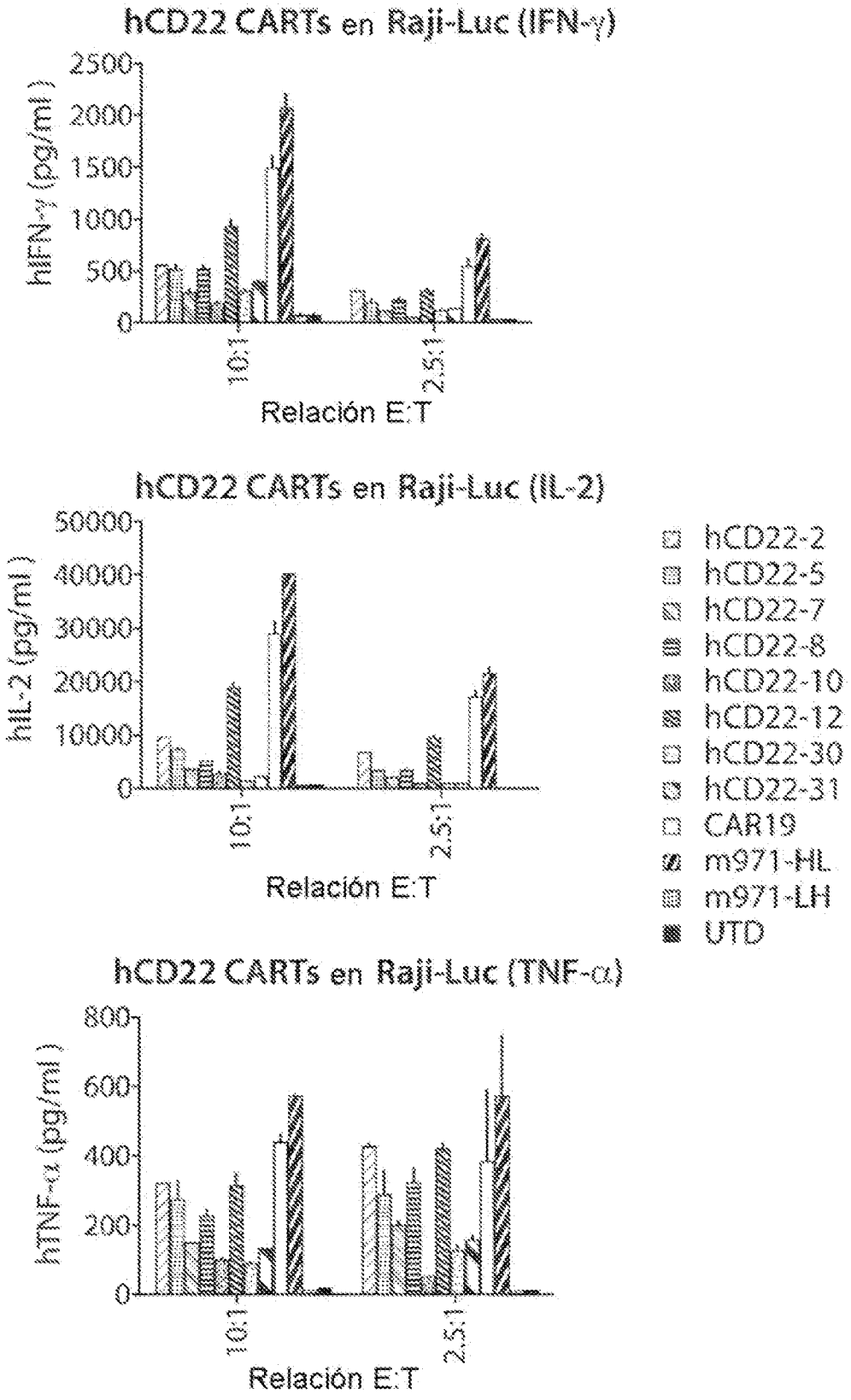

hCD22 CARTs en Raji-Luc (IFN-γ)
hIFN-γ (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22 CARTs en Raji-Luc (IL-2)
hIL-2 (pg/ml)
50000
40000
30000
20000
10000
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22 CARTs en Raji-Luc (TNF-α)
hTNF-α (pg/ml)
800
600
400
200
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD

FIG. 21A

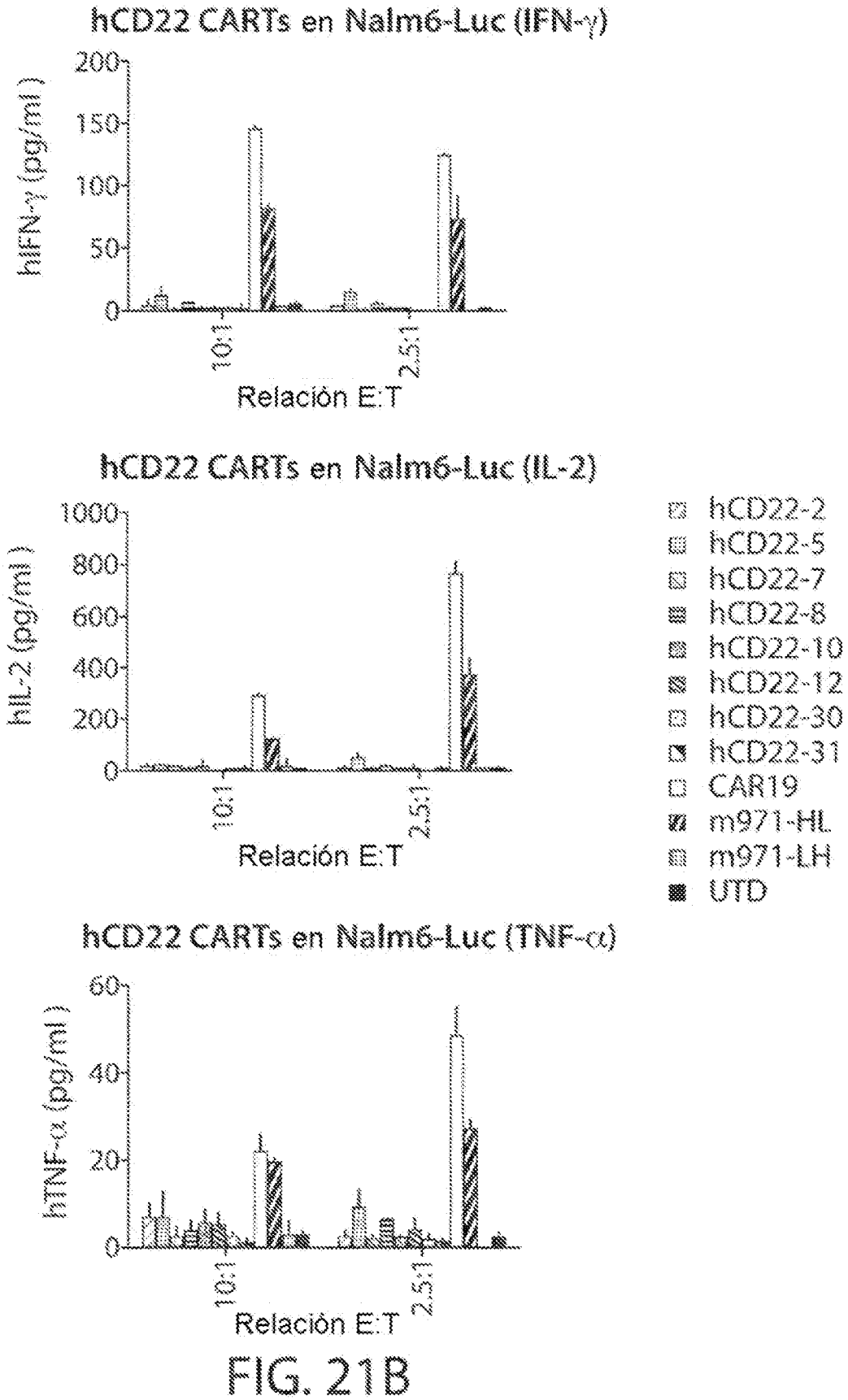

hCD22 CARTs en Nalm6-Luc (IFN-γ)
hIFN-γ (pg/ml)
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22 CARTs en Nalm6-Luc (IL-2)
hIL-2 (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
hCD22 CARTs en Nalm6-Luc (TNF-α)
hTNF-α (pg/ml)
60
40
20
0
10:1
2.5:1
Relación E:T

FIG. 21B

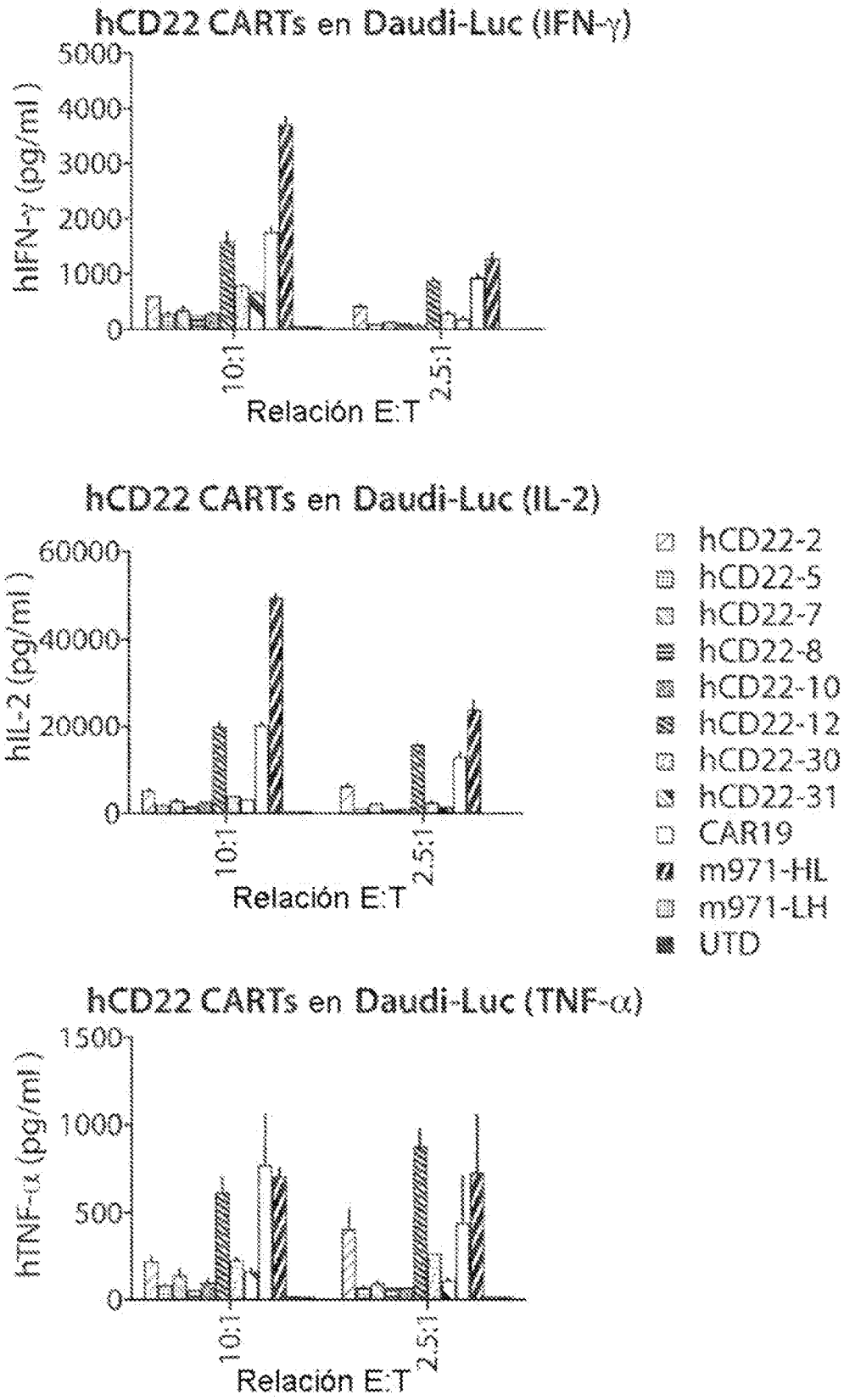

hCD22 CARTs en Daudi-Luc (IFN-γ)
hIFN-γ (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22 CARTs en Daudi-Luc (IL-2)
hIL-2 (pg/ml)
60000
40000
20000
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
hCD22 CARTs en Daudi-Luc (TNF-α)
hTNF-α (pg/ml)
1500
1000
500
0
10:1
2.5:1
Relación E:T

FIG. 21C

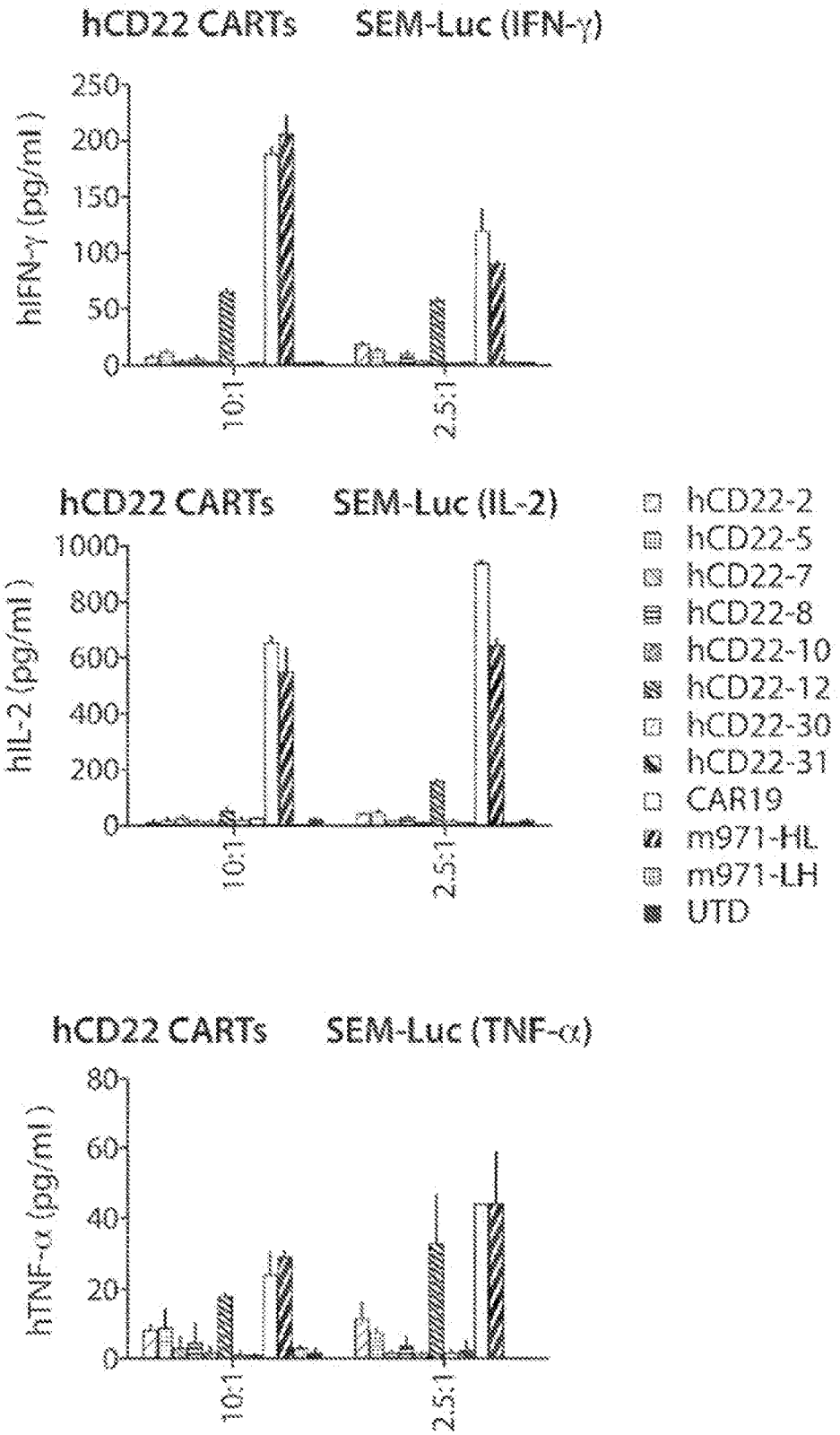

hCD22 CARTs SEM-Luc (IFN-γ)
hIFN-γ (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
hCD22 CARTs SEM-Luc (IL-2)
hIL-2 (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
10:1
2.5:1
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
hCD22 CARTs SEM-Luc (TNF-α)
hTNF-α (pg/ml)
80
60
40
20
0
10:1
2.5:1

FIG. 21D

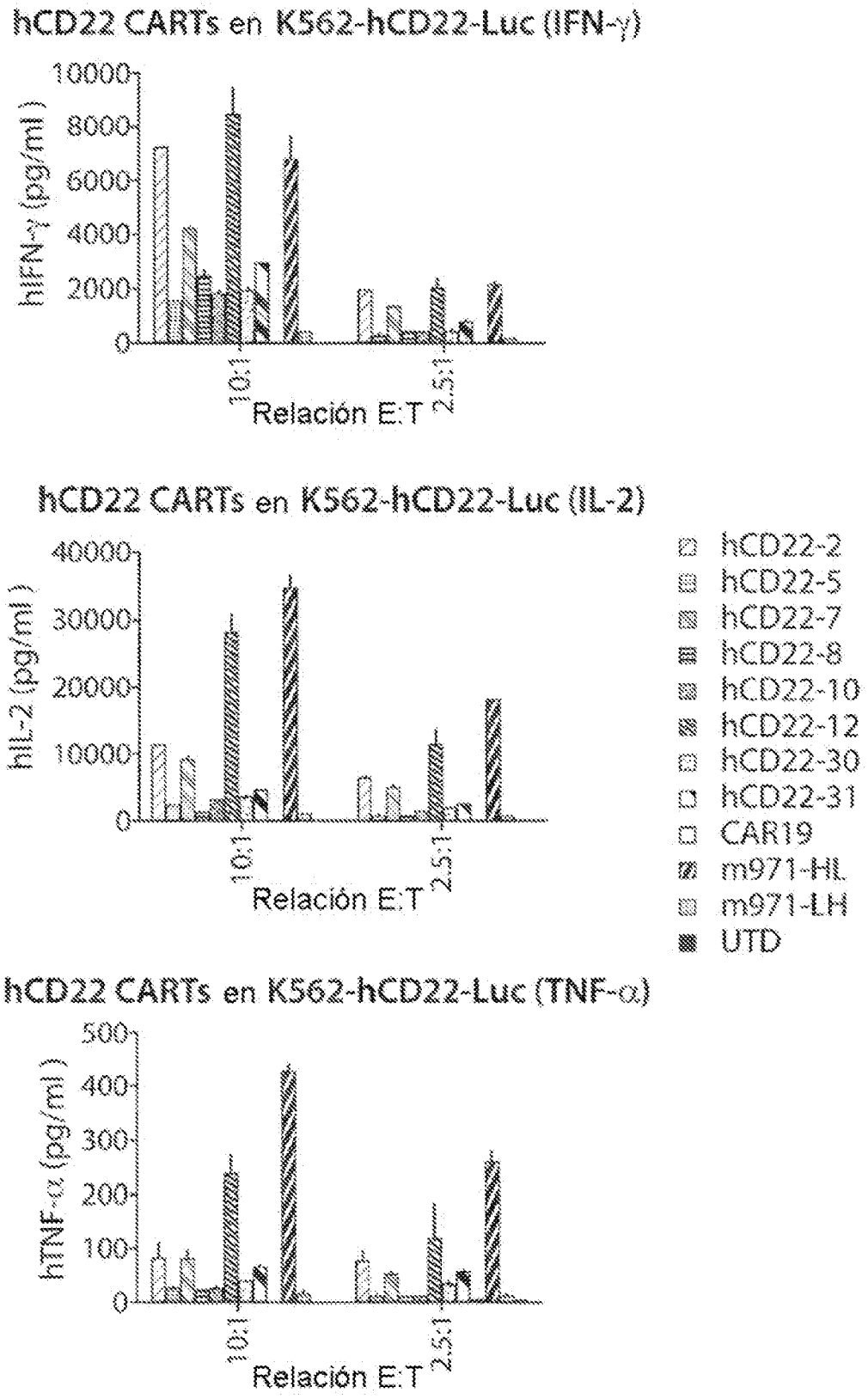

hCD22 CARTs en K562-hCD22-Luc (IFN-γ)
hIFN-γ (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22 CARTs en K562-hCD22-Luc (IL-2)
hIL-2 (pg/ml)
40000
30000
20000
10000
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD
hCD22 CARTs en K562-hCD22-Luc (TNF-α)
hTNF-α (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
10:1
2.5:1
Relación E:T

FIG. 21E

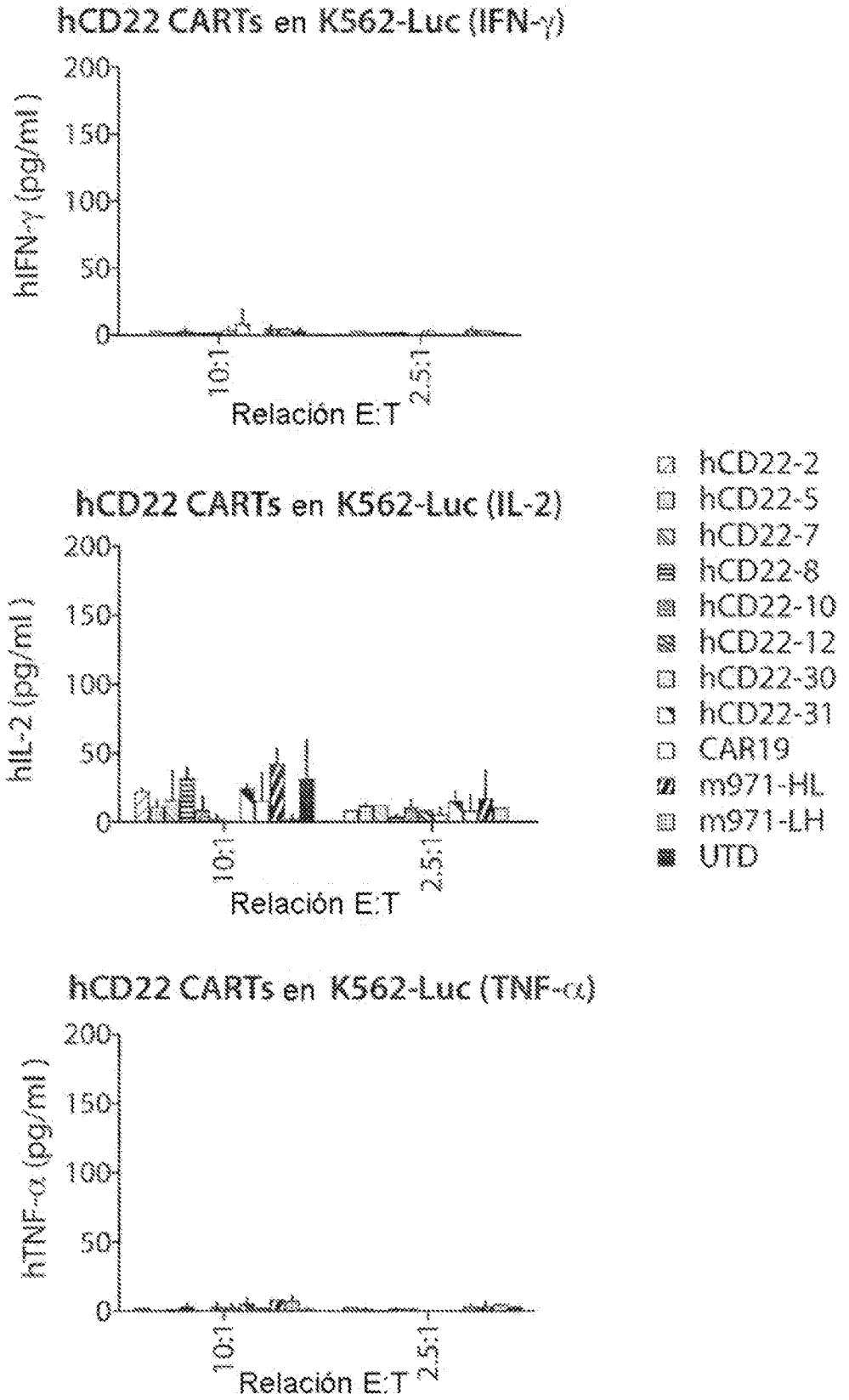

hCD22 CARTs en K562-Luc (IFN-γ)
hIFN-γ (pg/ml)
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22 CARTs en K562-Luc (IL-2)
hIL-2 (pg/ml)
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22 CARTs en K562-Luc (TNF-α)
hTNF-α (pg/ml)
200
150
100
50
0
10:1
2.5:1
Relación E:T
hCD22-2
hCD22-5
hCD22-7
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
CAR19
m971-HL
m971-LH
UTD

FIG. 21F

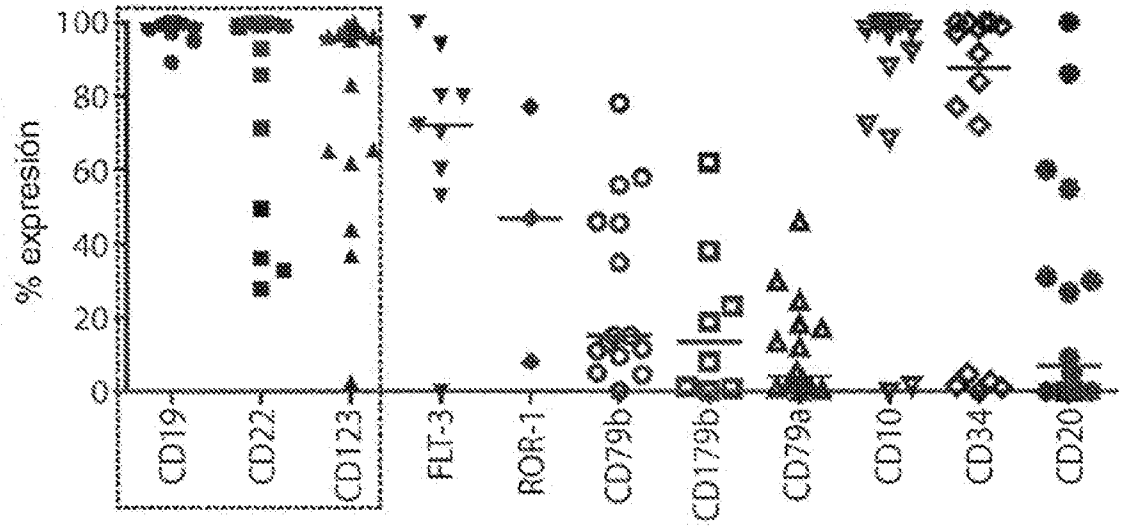

% expresión
100
80
60
40
20
0
CD19
CD22
CD123
FLT-3
ROR-1
CD79b
CD179b
CD79a
CD10
CD34
CD20

FIG. 22

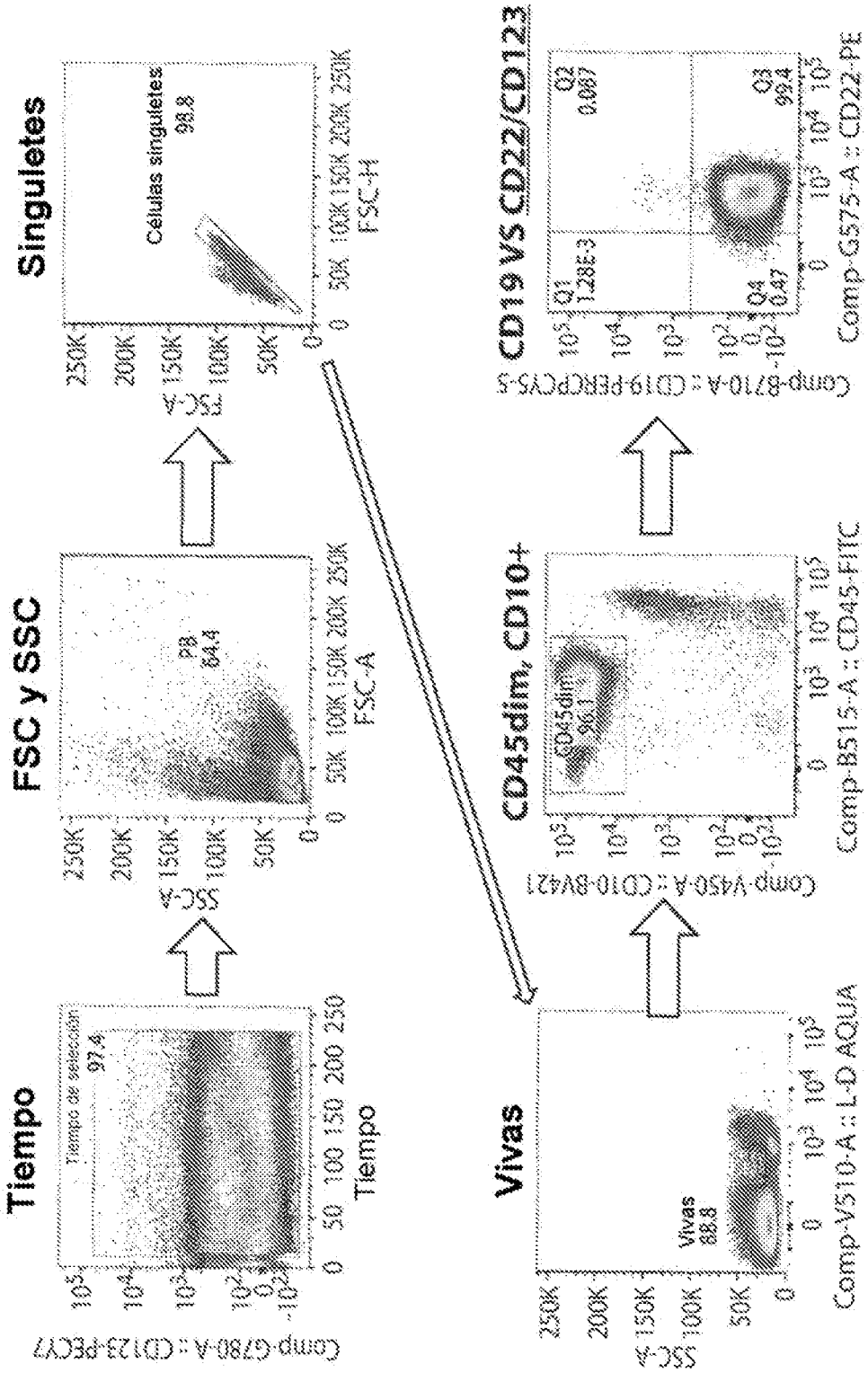

Tiempo
Tiempo de selección
97.4
Comp-G780-A :: CD123-PECY7
Tiempo
FSC y SSC
PB
64.4
SSC-A
FSC-A
Singuletes
Células singuletes
98.8
FSC-A
FSC-H
Vivas
Vivas
88.8
Comp-V510-A :: L-D AQUA
SSC-A
CD45dim, CD10+
CD45dim
96.1
Comp-V450-A :: CD10-BV421
Comp-B515-A :: CD45-FITC
CD19 VS CD22/CD123
Q1
1.28E-3
Q2
0.087
Q4
0.47
Q3
99.4
Comp-B710-A :: CD19-PERCPCY5-5
Comp-G575-A :: CD22-PE

FIG. 23

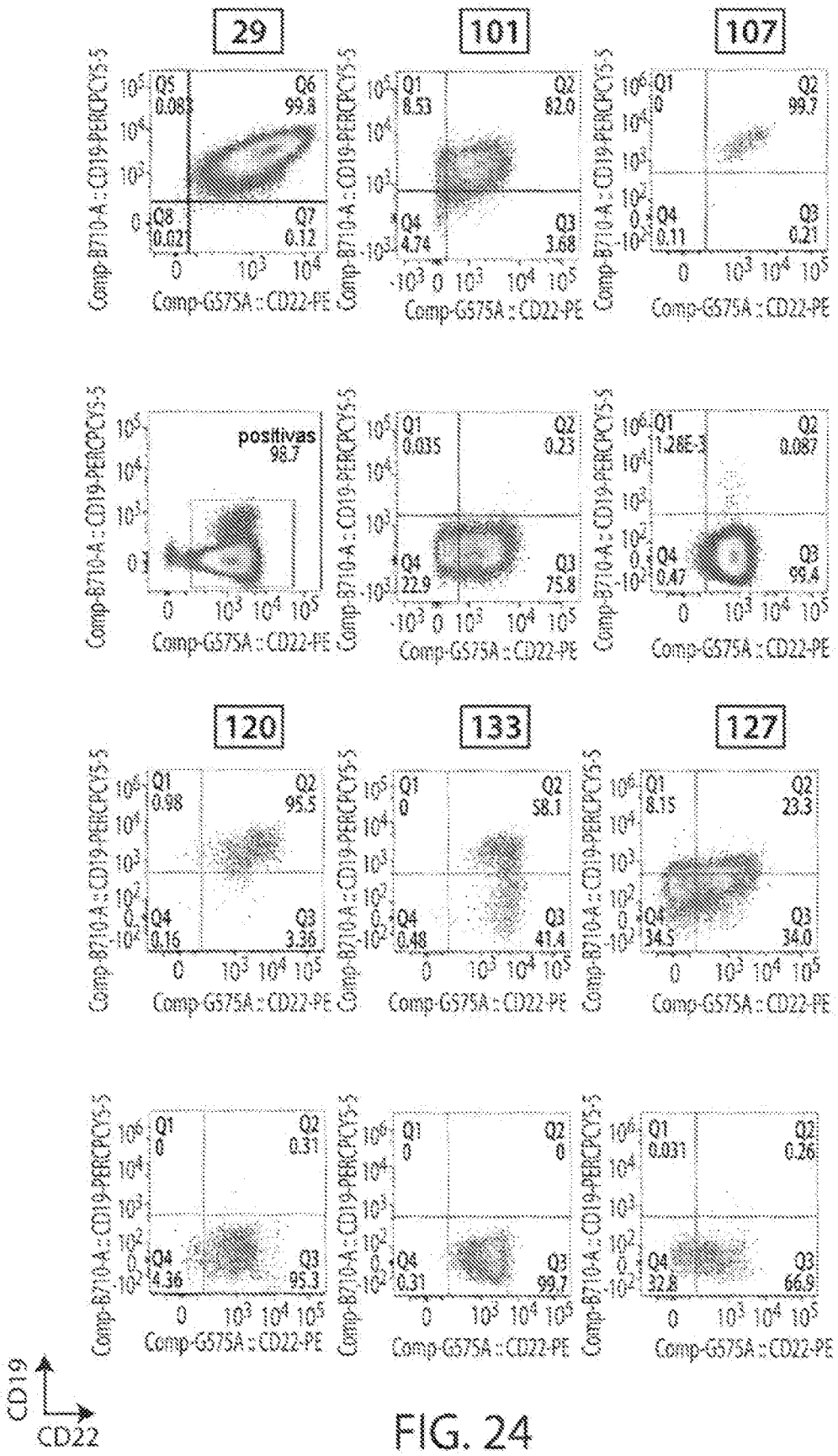

29
101
107
positivas
98.7
120
133
127
Comp-B710-A :: CD19-PERCPCY5-5
Comp-G575A :: CD22-PE
CD19
CD22

FIG. 24

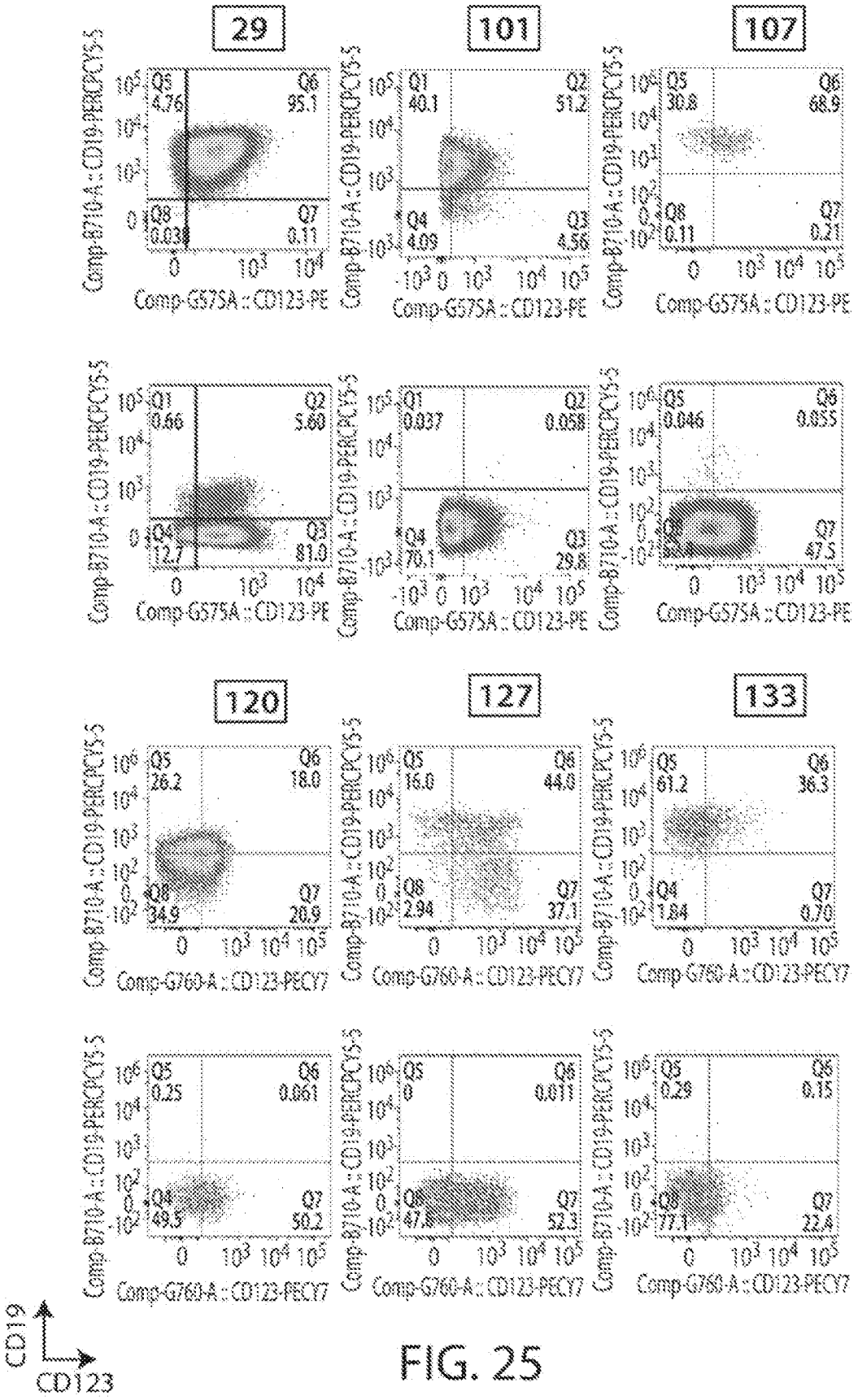

29
101
107
120
127
133
Comp-B710-A :: CD19-PERCPCY5-5
Comp-G575A :: CD123-PE
Comp-G760-A :: CD123-PECY7
Q5 4.76
Q6 95.1
Q8 0.034
Q7 0.11
Q1 40.1
Q2 51.2
Q4 4.09
Q3 4.56
Q5 30.8
Q6 68.9
Q8 0.11
Q7 0.21
Q1 0.66
Q2 5.60
Q4 12.7
Q3 81.0
Q1 0.037
Q2 0.058
Q4 70.1
Q3 29.8
Q5 0.046
Q6 0.055
Q7 47.5
Q5 26.2
Q6 18.0
Q8 34.9
Q7 20.9
Q5 16.0
Q6 44.0
Q8 2.94
Q7 37.1
Q5 61.2
Q6 36.3
Q4 1.84
Q7 0.70
Q5 0.25
Q6 0.061
Q4 49.5
Q7 50.2
Q5 0
Q6 0.011
Q8 47.8
Q7 52.3
Q5 0.29
Q6 0.15
Q8 77.1
Q7 22.4
CD19
CD123

FIG. 25

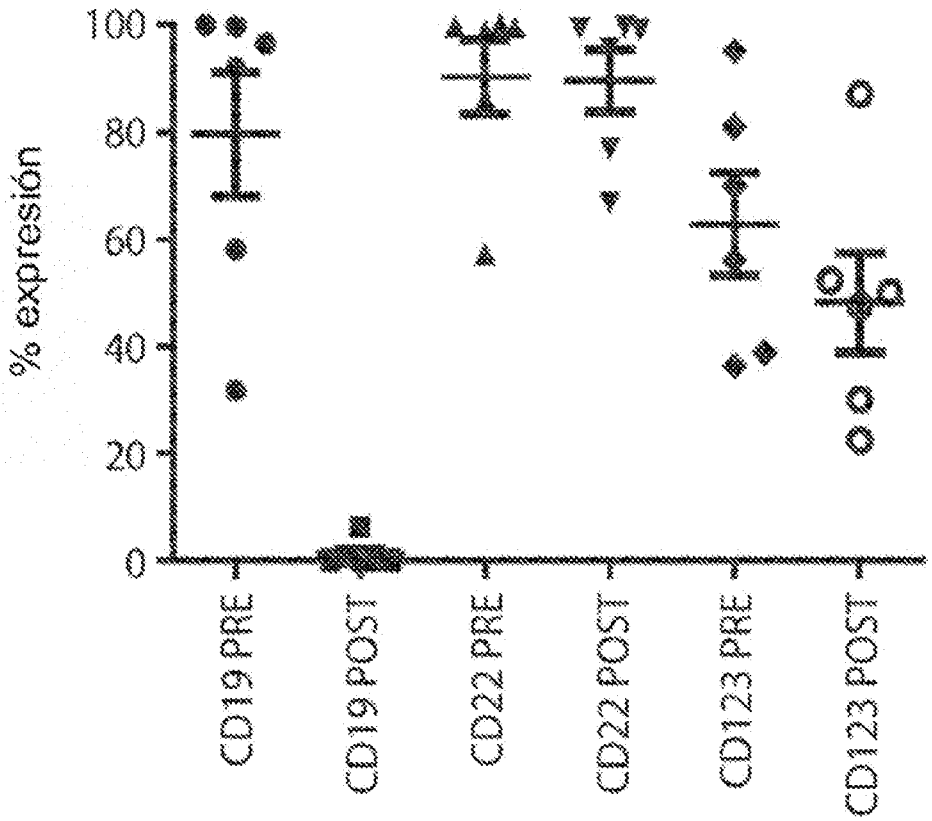

% expresión
100
80
60
40
20
0
CD19 PRE
CD19 POST
CD22 PRE
CD22 POST
CD123 PRE
CD123 POST

FIG. 26

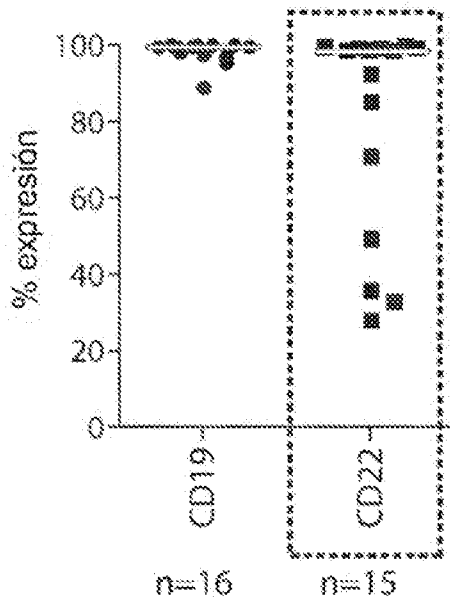


FIG. 27A

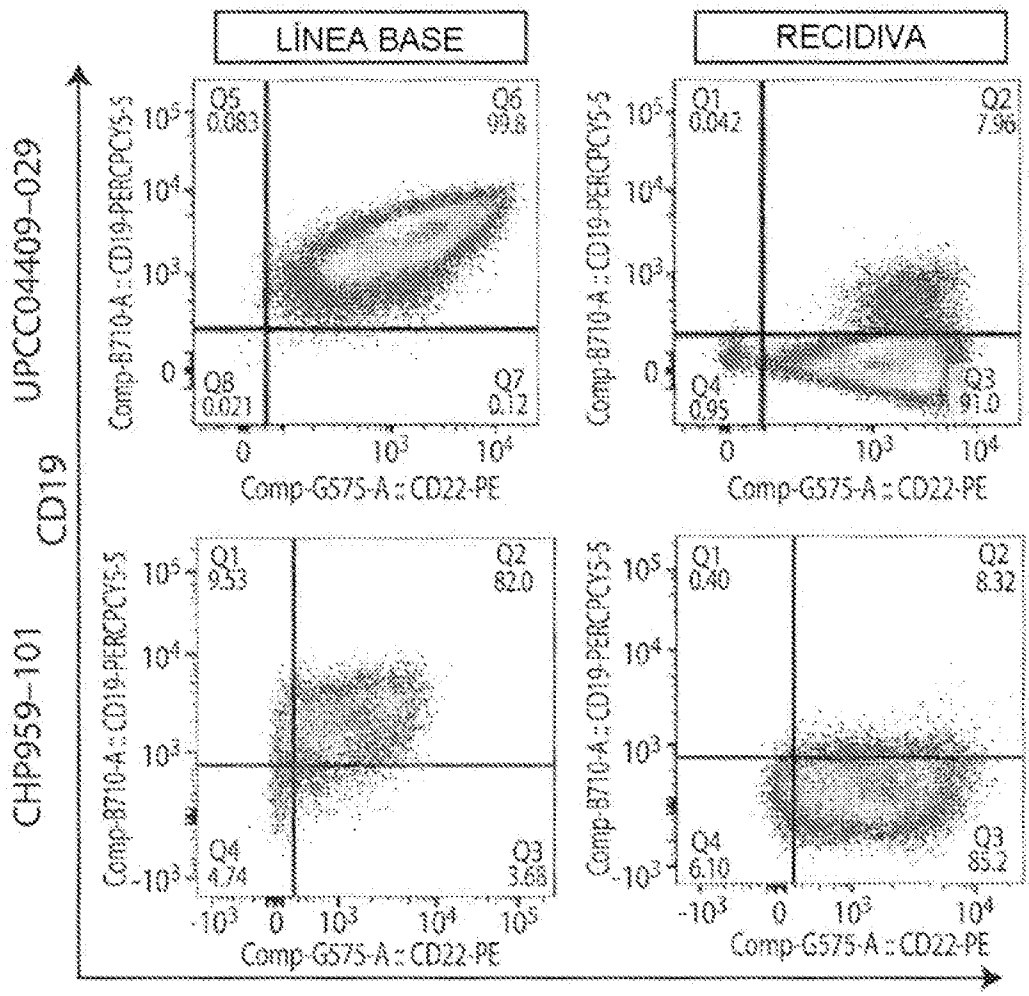


FIG. 27B

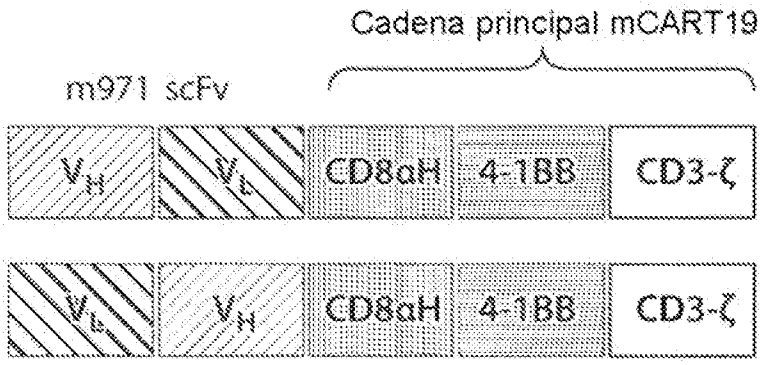


FIG. 28A

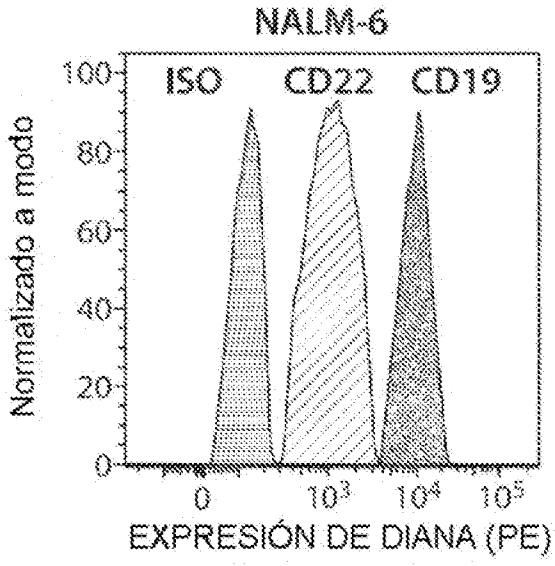


FIG. 28B

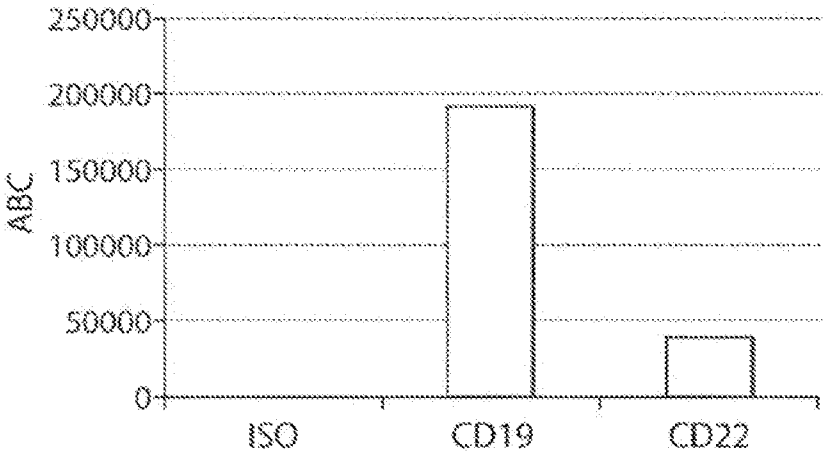


FIG. 28C

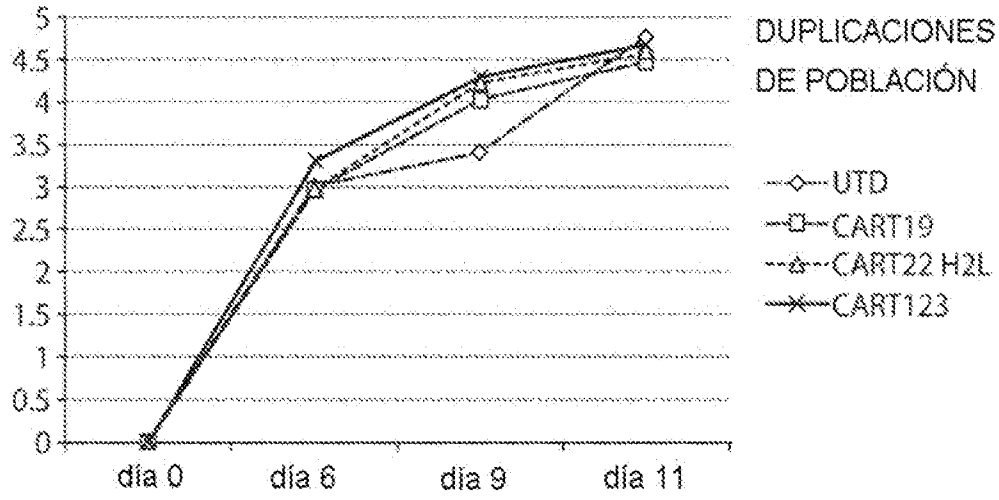


FIG. 29A

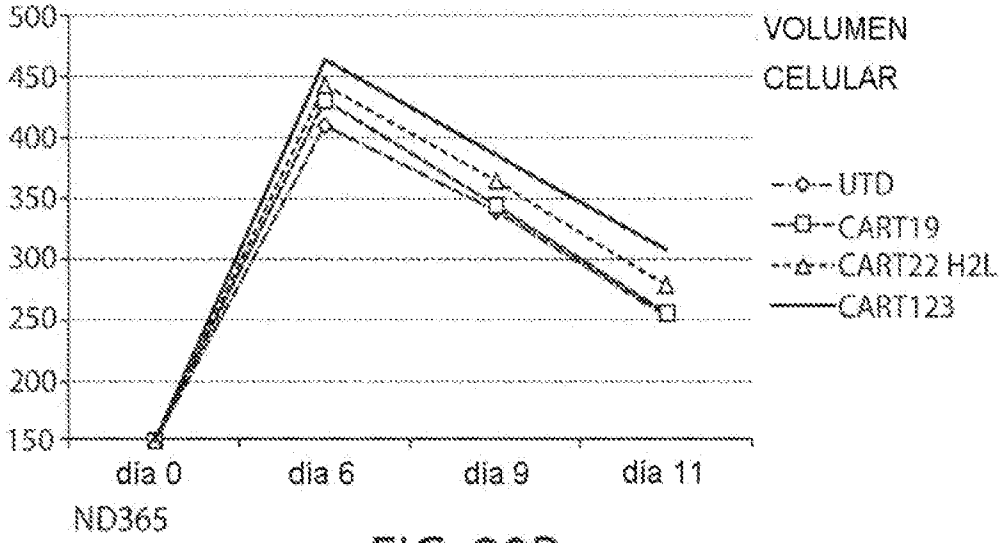


FIG. 29B

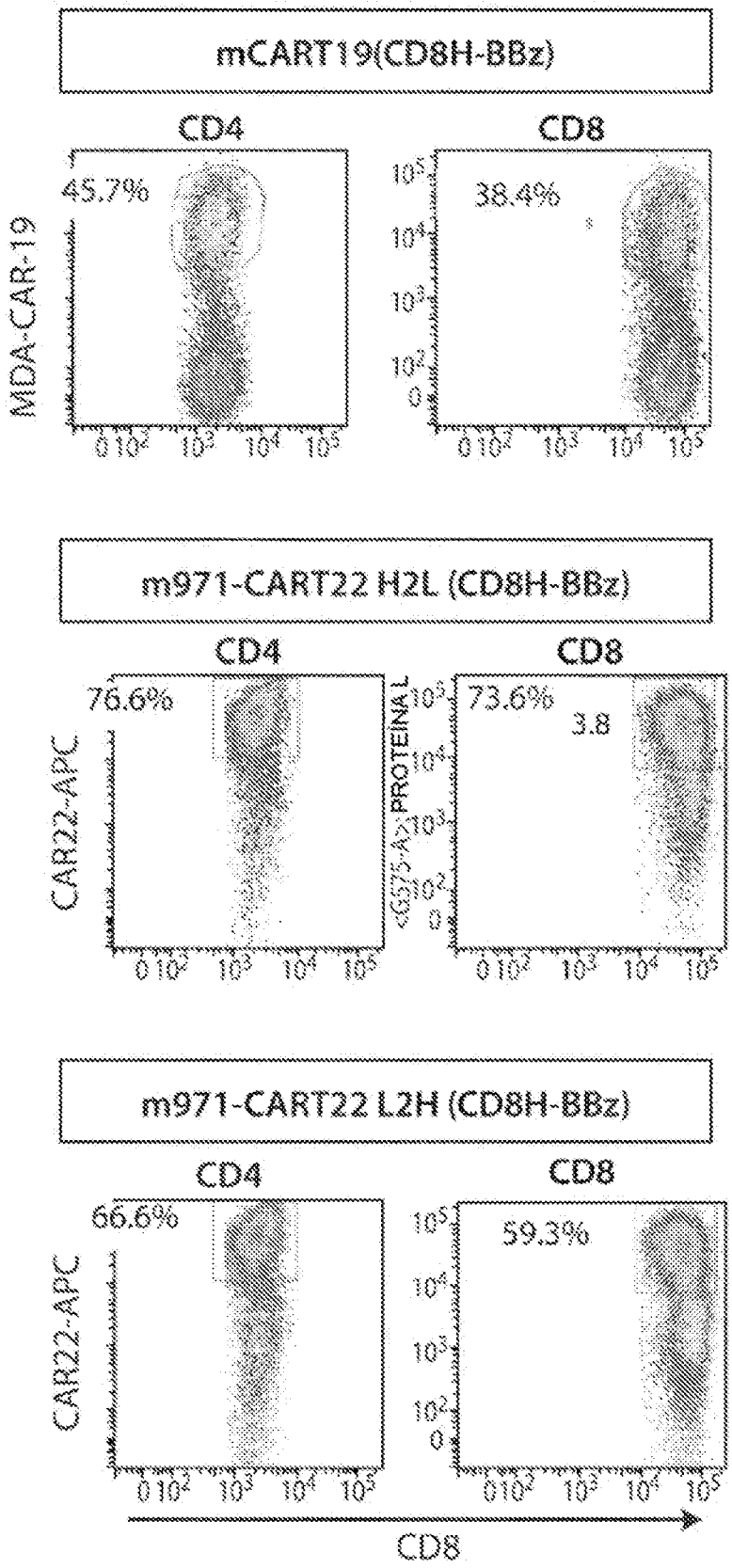
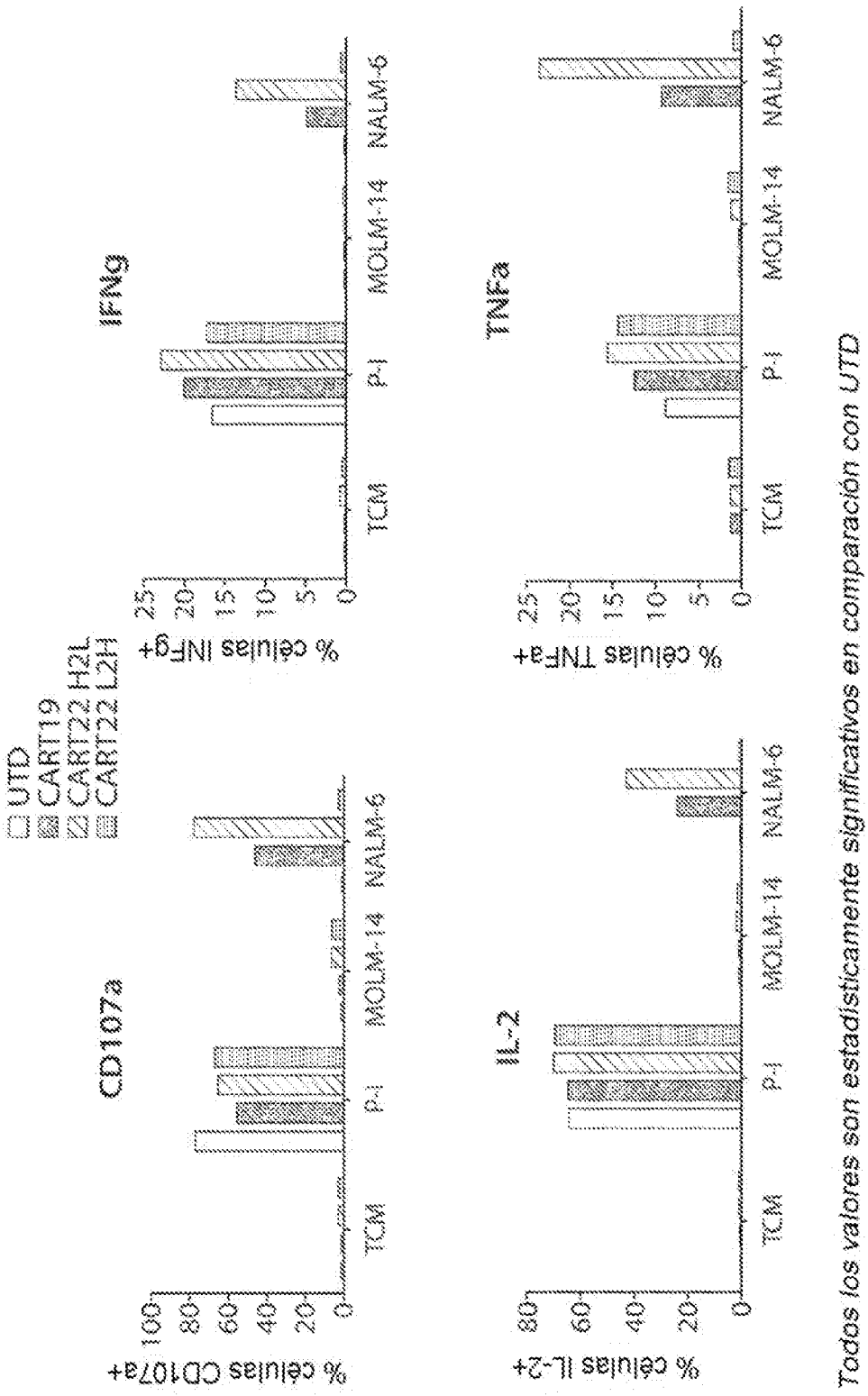

mCART19(CD8H-BBz)
CD4
CD8
45.7%
38.4%
MDA-CAR-19
m971-CART22 H2L (CD8H-BBz)
CD4
CD8
76.6%
73.6%
3.8
CAR22-APC
<G575-A> PROTEINAL
m971-CART22 L2H (CD8H-BBz)
CD4
CD8
66.6%
59.3%
CAR22-APC
CD8

FIG. 29C



Todos los valores son estadísticamente significativos en comparación con UTD

FIG. 30

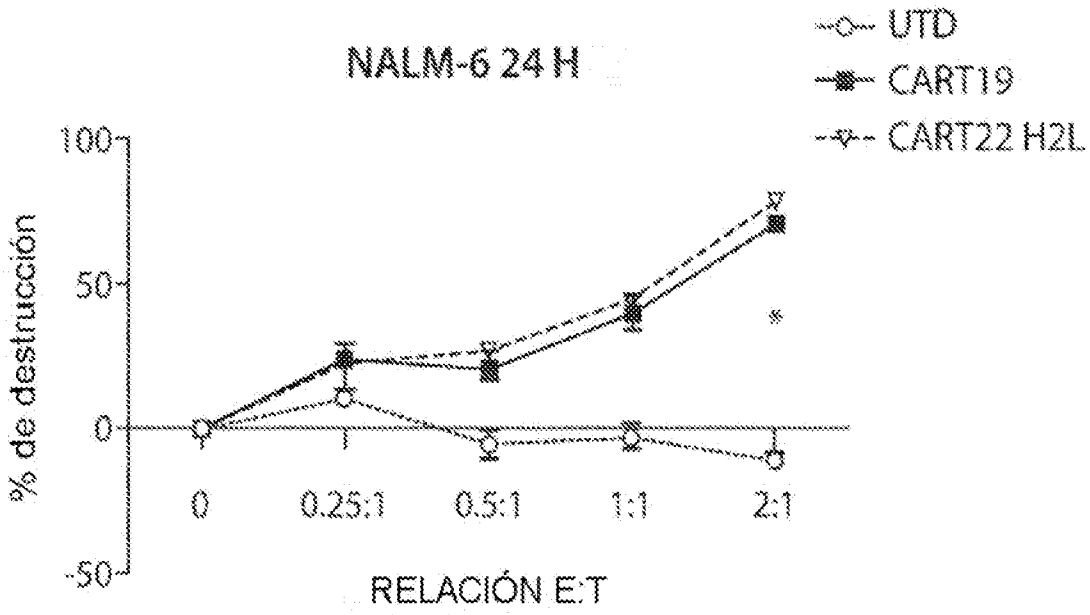

NALM-6 24 H
UTD
CART19
CART22 H2L
100
50
0
-50
% de destrucción
0
0.25:1
0.5:1
1:1
2:1
RELACIÓN E:T
*

FIG. 31

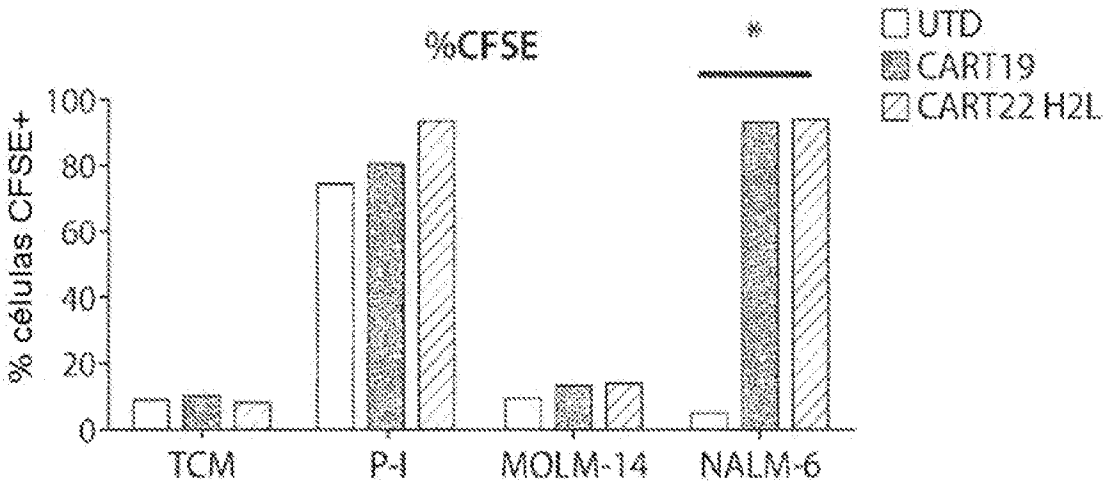


FIG. 32A

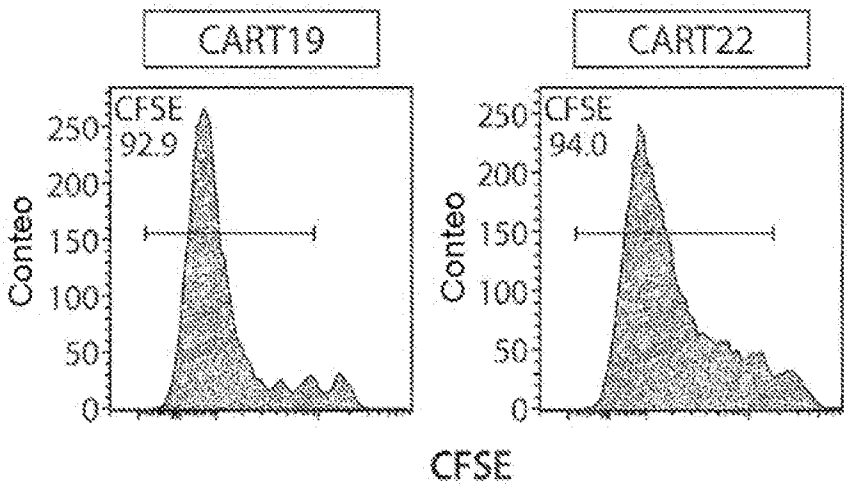


FIG. 32B

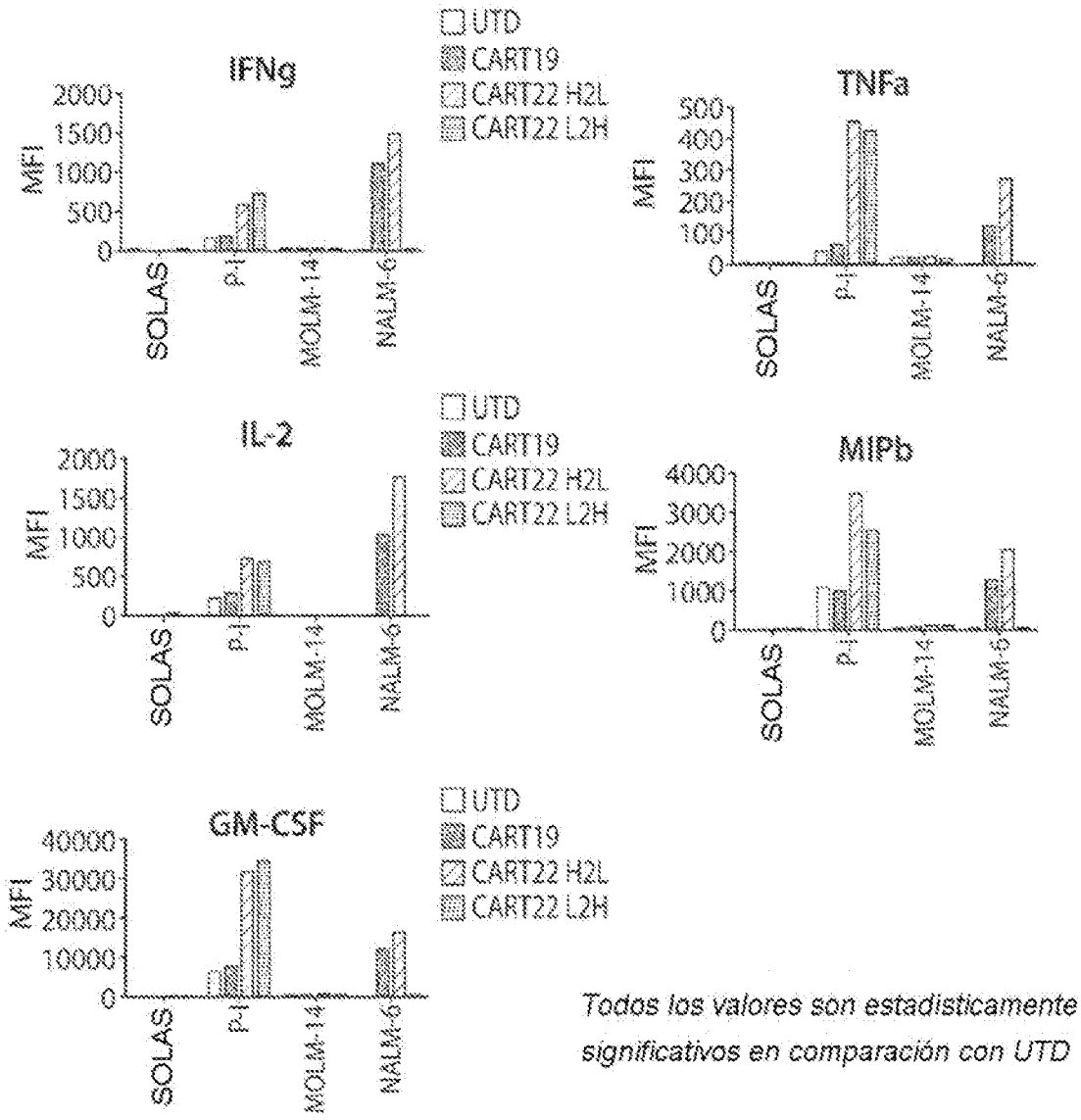
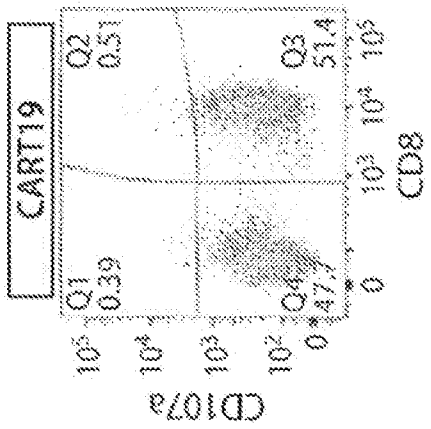

IFNg
TNFa
IL-2
MIPb
GM-CSF
UTD
CART19
CART22 H2L
CART22 L2H
MFI
SOLAS
P-1
MOLM-14
NALM-6
Todos los valores son estadisticamente significativos en comparación con UTD

FIG. 33



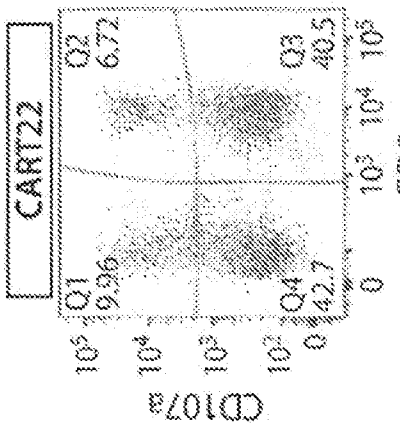


FIG. 34B

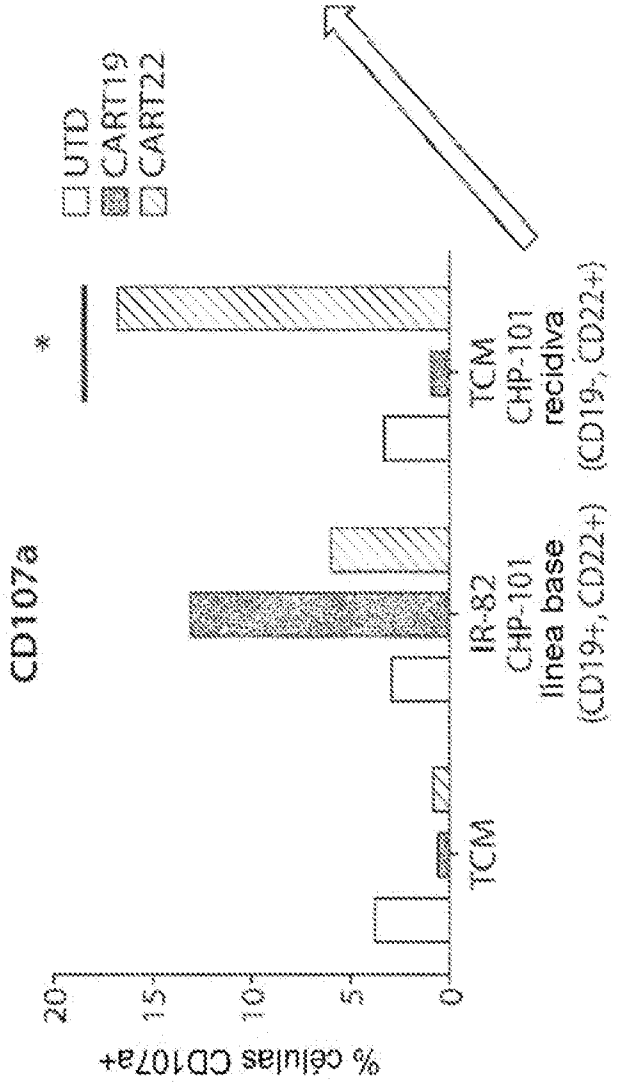


FIG. 34A

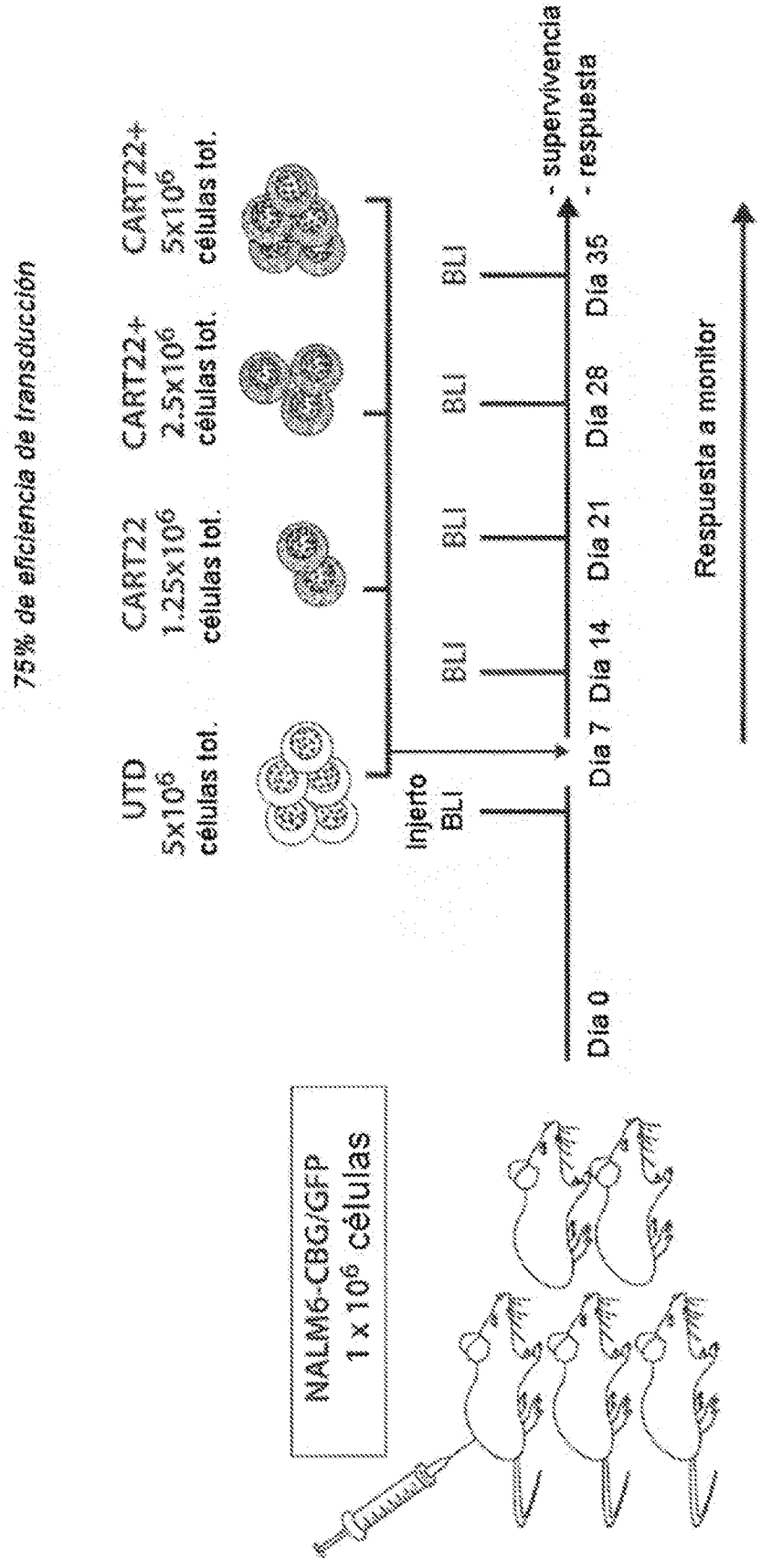

75% de eficiencia de transducción
UTD
5x10^6
células tot.
CART22
1.25x10^6
células tot.
CART22+
2.5x10^6
células tot.
CART22+
5x10^6
células tot.
Injerto
BLI
BLI
BLI
BLI
BLI
- supervivencia
- respuesta
Día 0
Día 7
Día 14
Día 21
Día 28
Día 35
Respuesta a monitor
NALM6-CBG/GFP
1 x 10^6 células

FIG. 35A

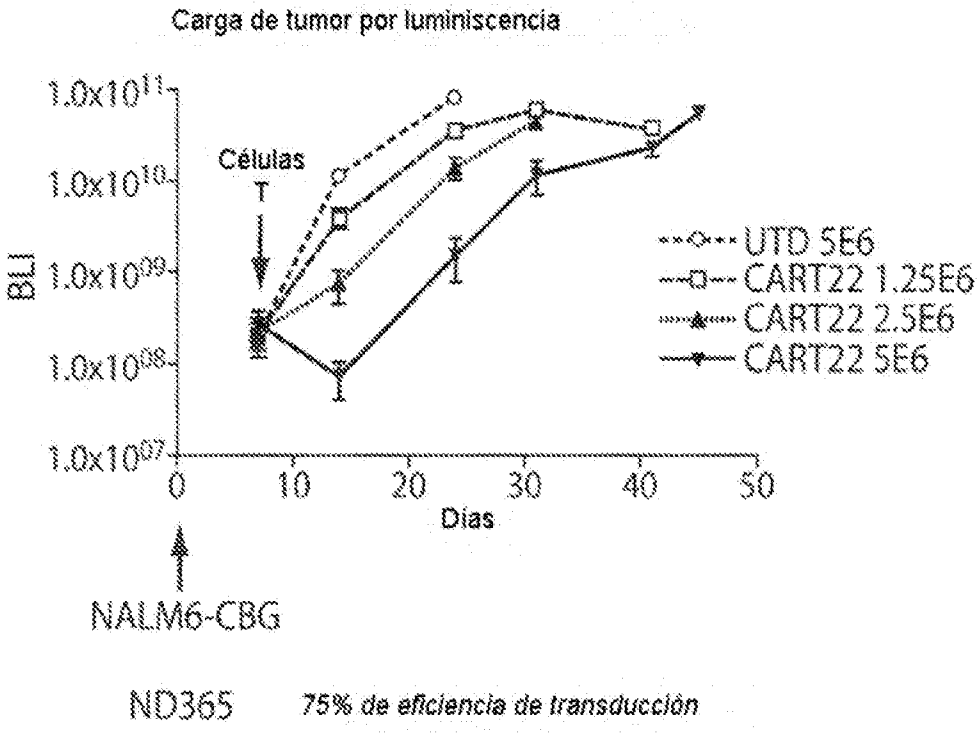


FIG. 35B

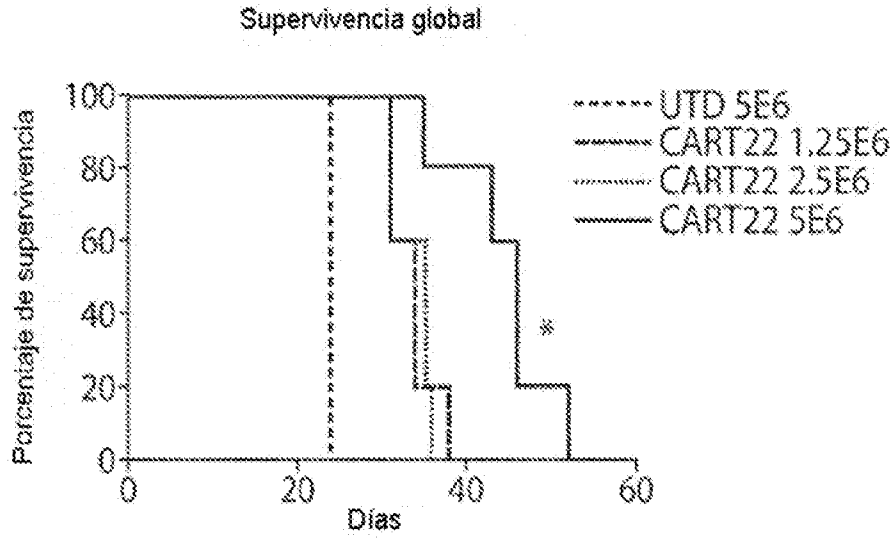


FIG. 35C

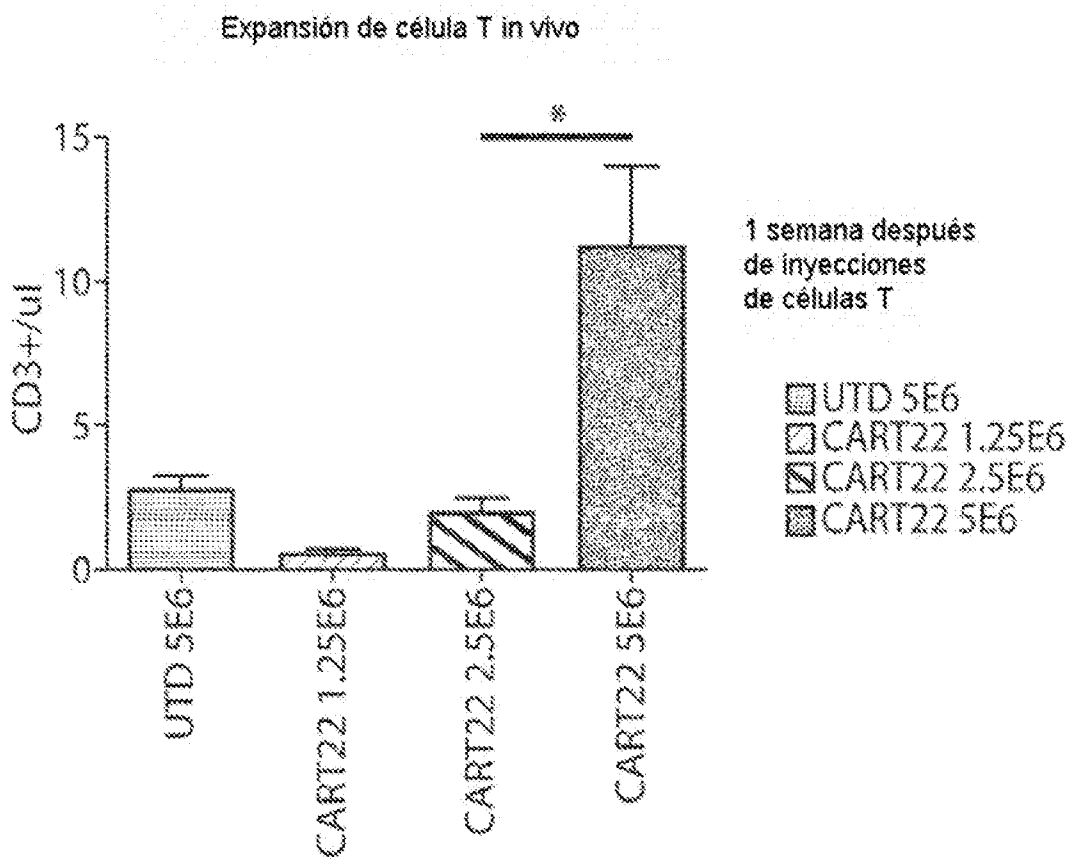

Expansión de célula T in vivo
*
15
10
5
0
CD3+/ul
1 semana después
de inyecciones
de células T
UTD 5E6
CART22 1.25E6
CART22 2.5E6
CART22 5E6
UTD 5E6
CART22 1.25E6
CART22 2.5E6
CART22 5E6

FIG. 35D

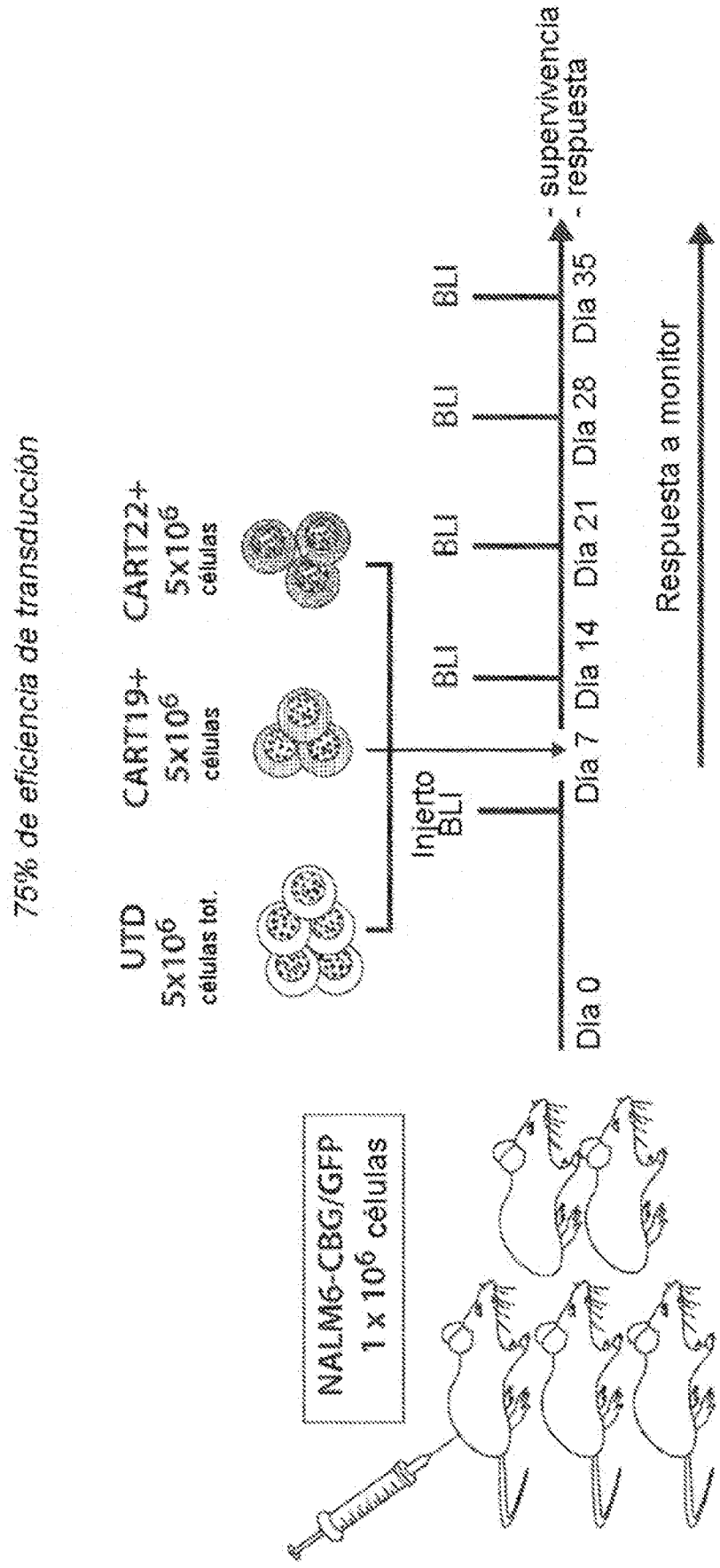

75% de eficiencia de transducción
UTD
5x10^6
células tot.
CART19+
5x10^6
células
CART22+
5x10^6
células
Injerto
BLI
BLI
BLI
BLI
BLI
Día 0
Día 7
Día 14
Día 21
Día 28
Día 35
- supervivencia
- respuesta
Respuesta a monitor
NALM6-CBG/GFP
1 x 10^6 células

FIG. 36A

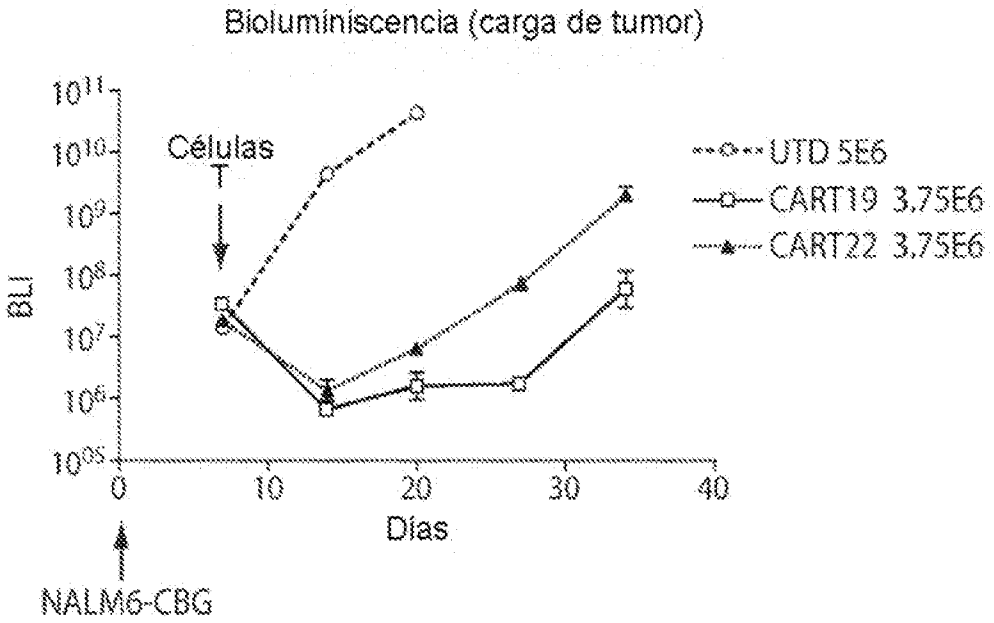
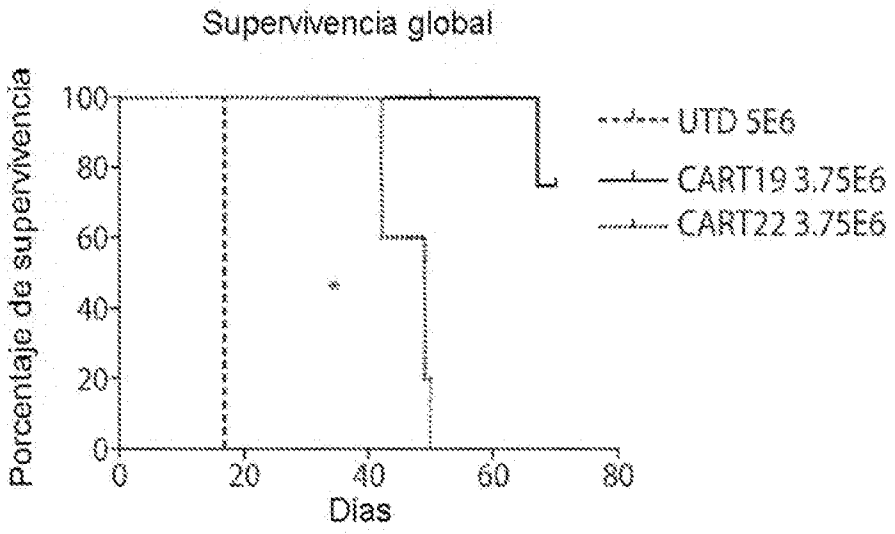


FIG. 36B



** CARTs se normalizaron al mismo número de CAR-pos (3.75e6/ratón)*

FIG. 36C

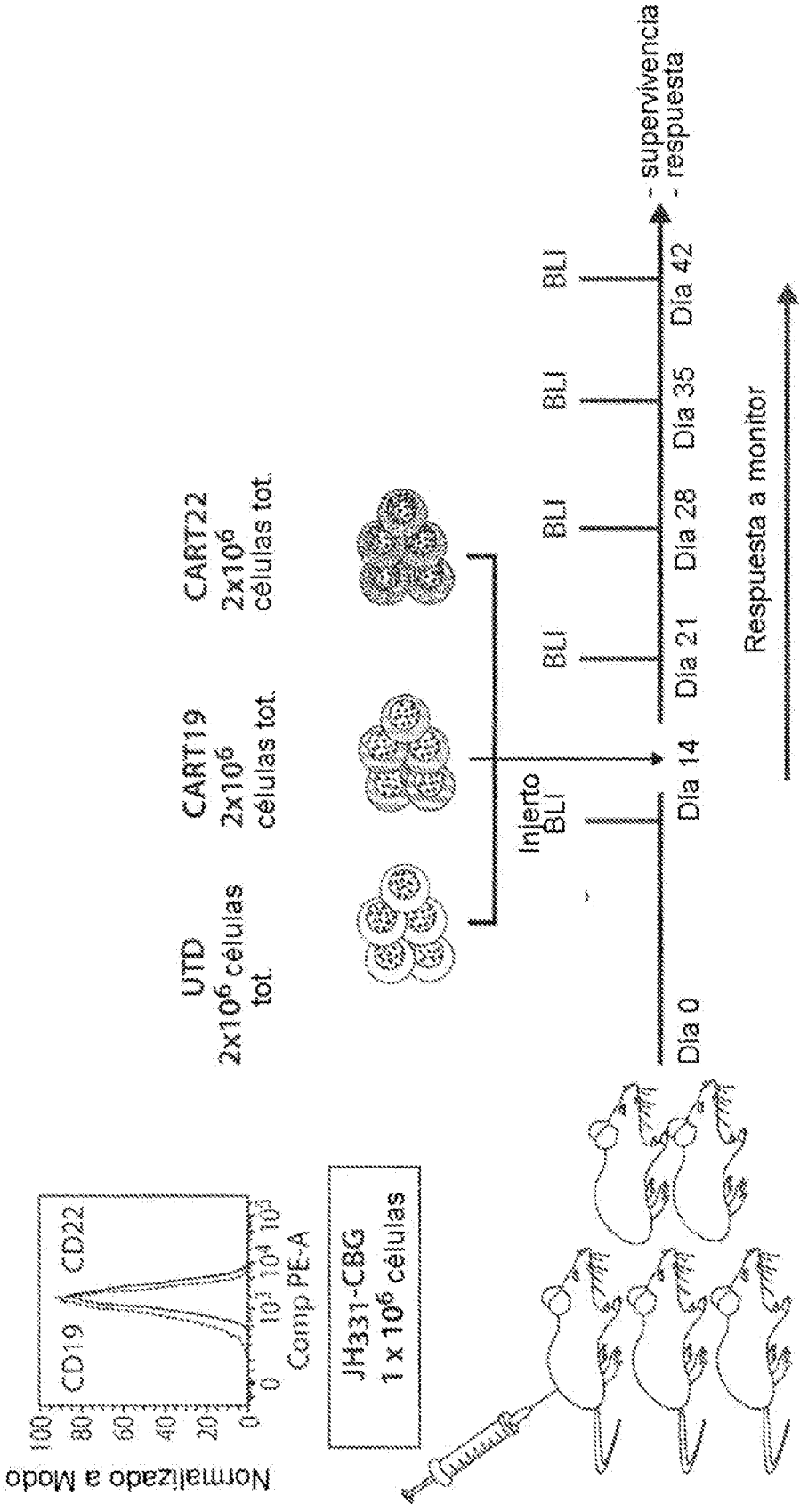

Normalizado a Modo
100
80
60
40
20
0
CD19
CD22
0
10^3 10^4 10^5
Comp PE-A
JH331-CBG
1 x 10^6 células
UTD
2x10^6 células tot.
CART19
2x10^6 células tot.
CART22
2x10^6 células tot.
Injerto
BLI
Día 0
Día 14
Día 21
Día 28
Día 35
Día 42
BLI
BLI
BLI
BLI
Respuesta a monitor
- supervivencia
- respuesta

FIG. 37A

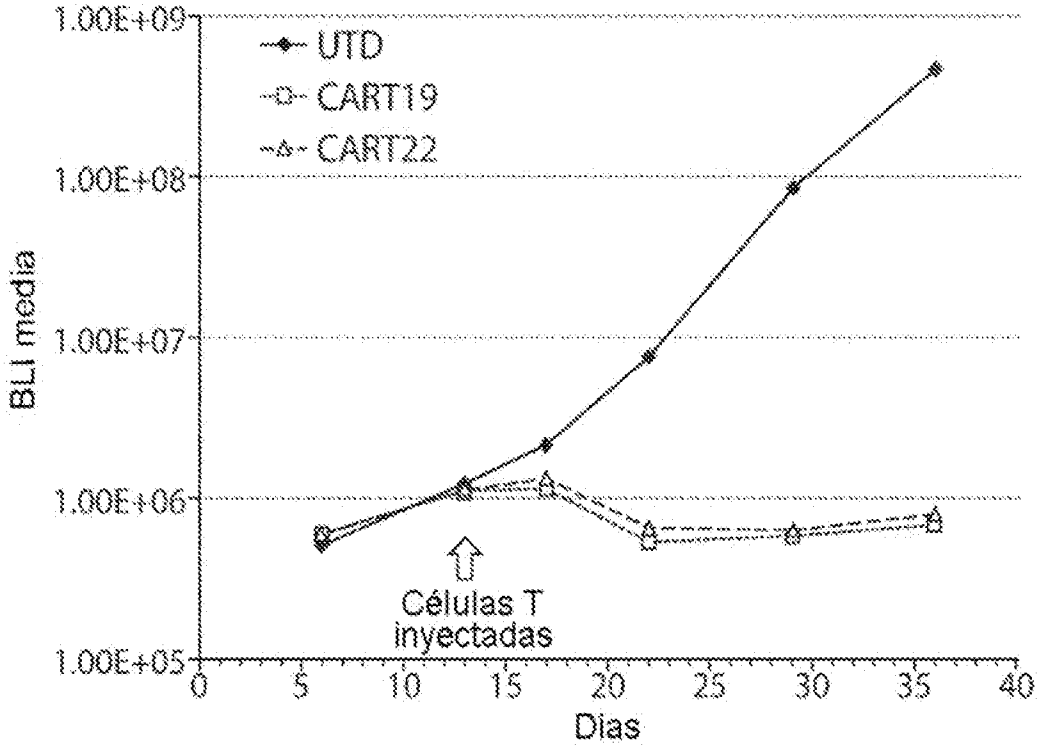

1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
BLI media
UTD
CART19
CART22
Células T inyectadas
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Dias

FIG. 37B

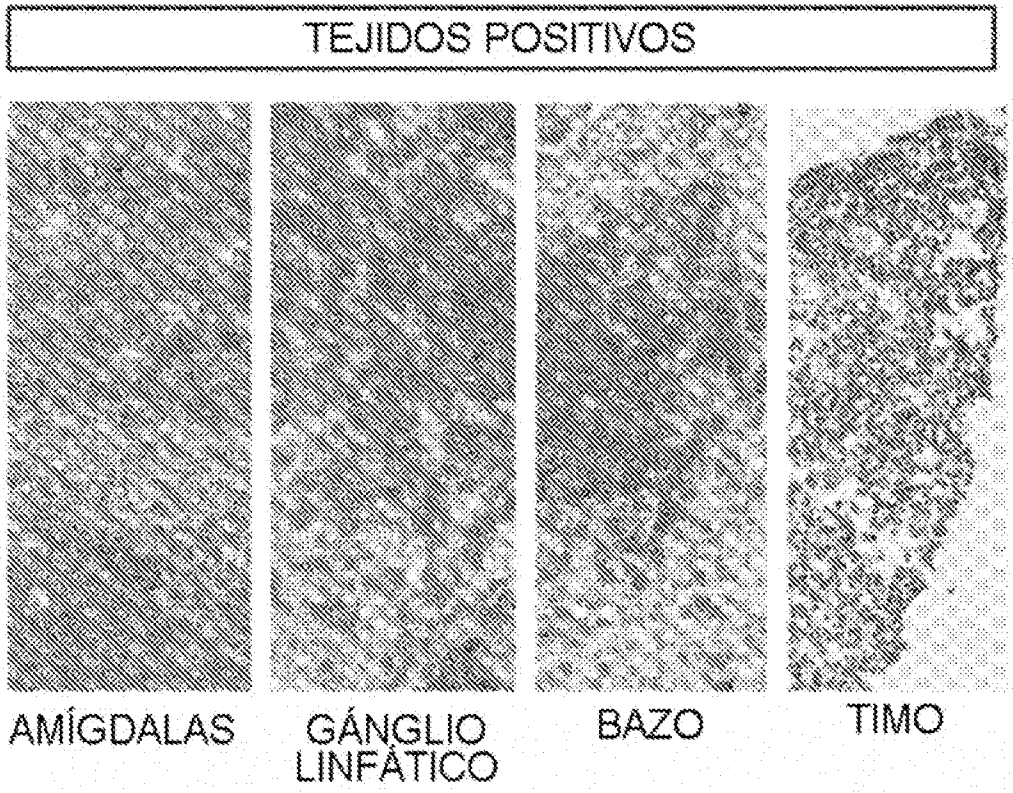

TEJIDOS POSITIVOS
AMÍGDALAS
GÁNGLIO LINFÁTICO
BAZO
TIMO
20X

FIG. 38A

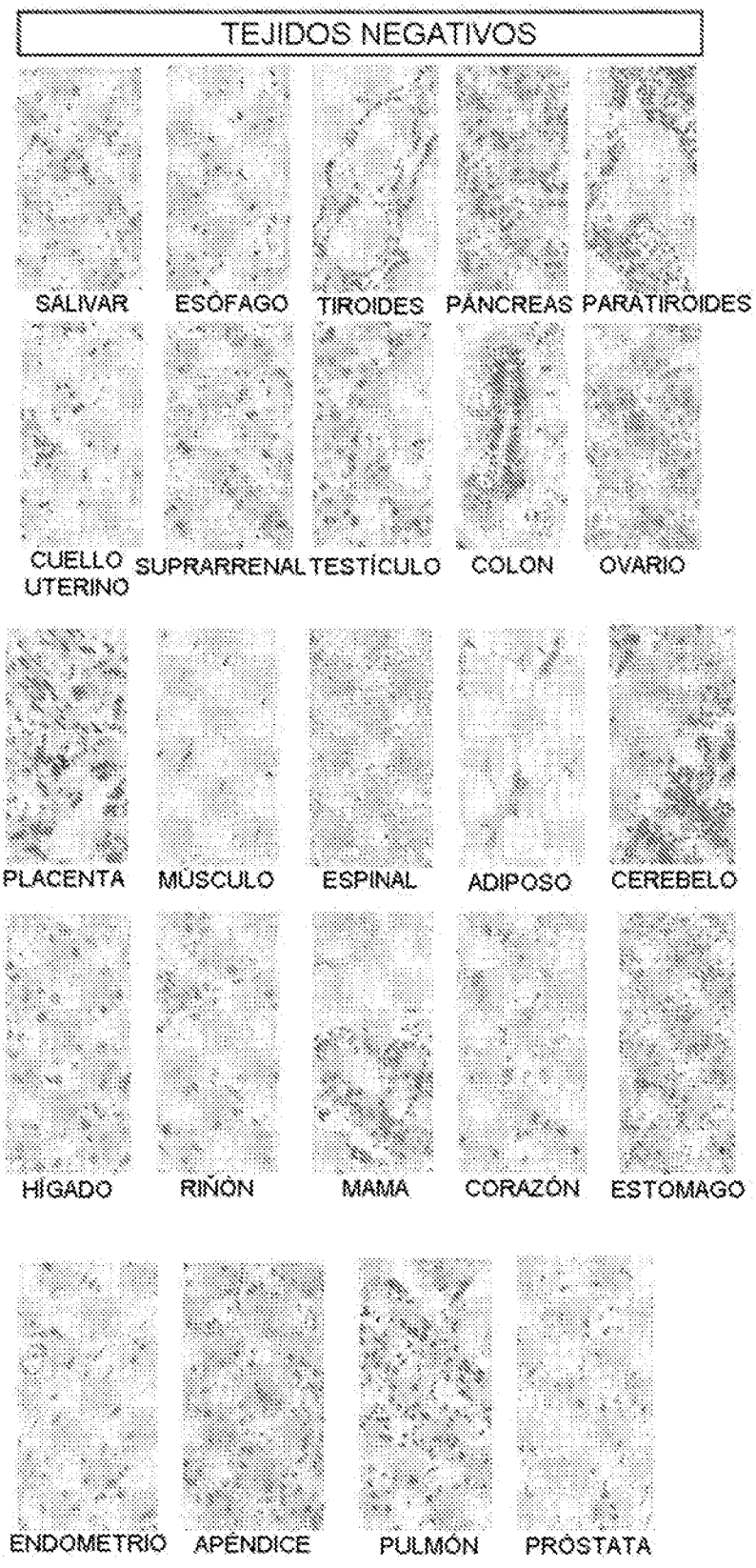

TEJIDOS NEGATIVOS
SALIVAR
ESÓFAGO
TIROIDES
PÁNCREAS
PARATIROIDES
CUELLO UTERINO
SUPRARRENAL
TESTÍCULO
COLON
OVARIO
PLACENTA
MÚSCULO
ESPINAL
ADIPOSO
CEREBELO
HÍGADO
RIÑÓN
MAMA
CORAZÓN
ESTOMAGO
ENDOMETRIO
APÉNDICE
PULMÓN
PRÓSTATA
20X

FIG. 38B

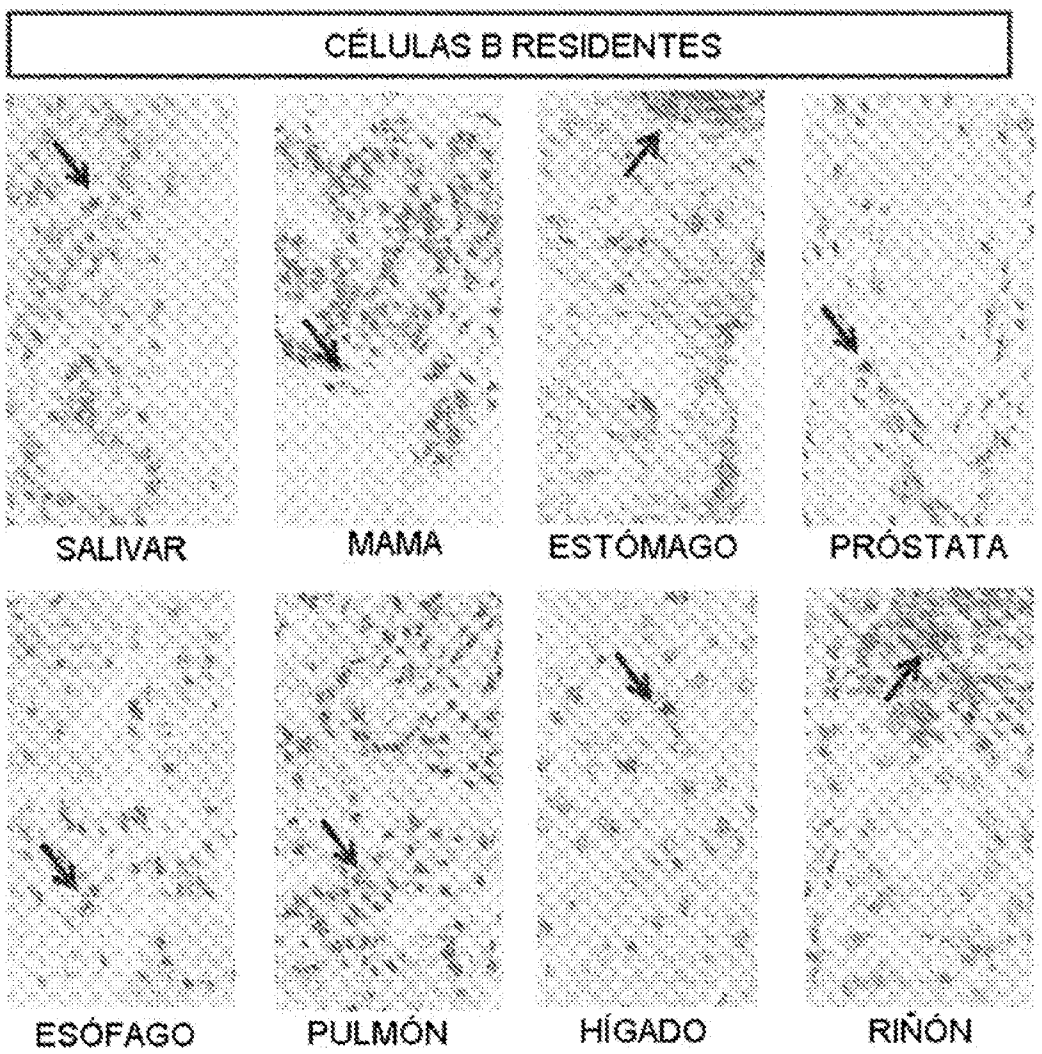

CÉLULAS B RESIDENTES
SALIVAR
MAMA
ESTÓMAGO
PRÓSTATA
ESÓFAGO
PULMÓN
HÍGADO
RIÑÓN

FIG. 38C

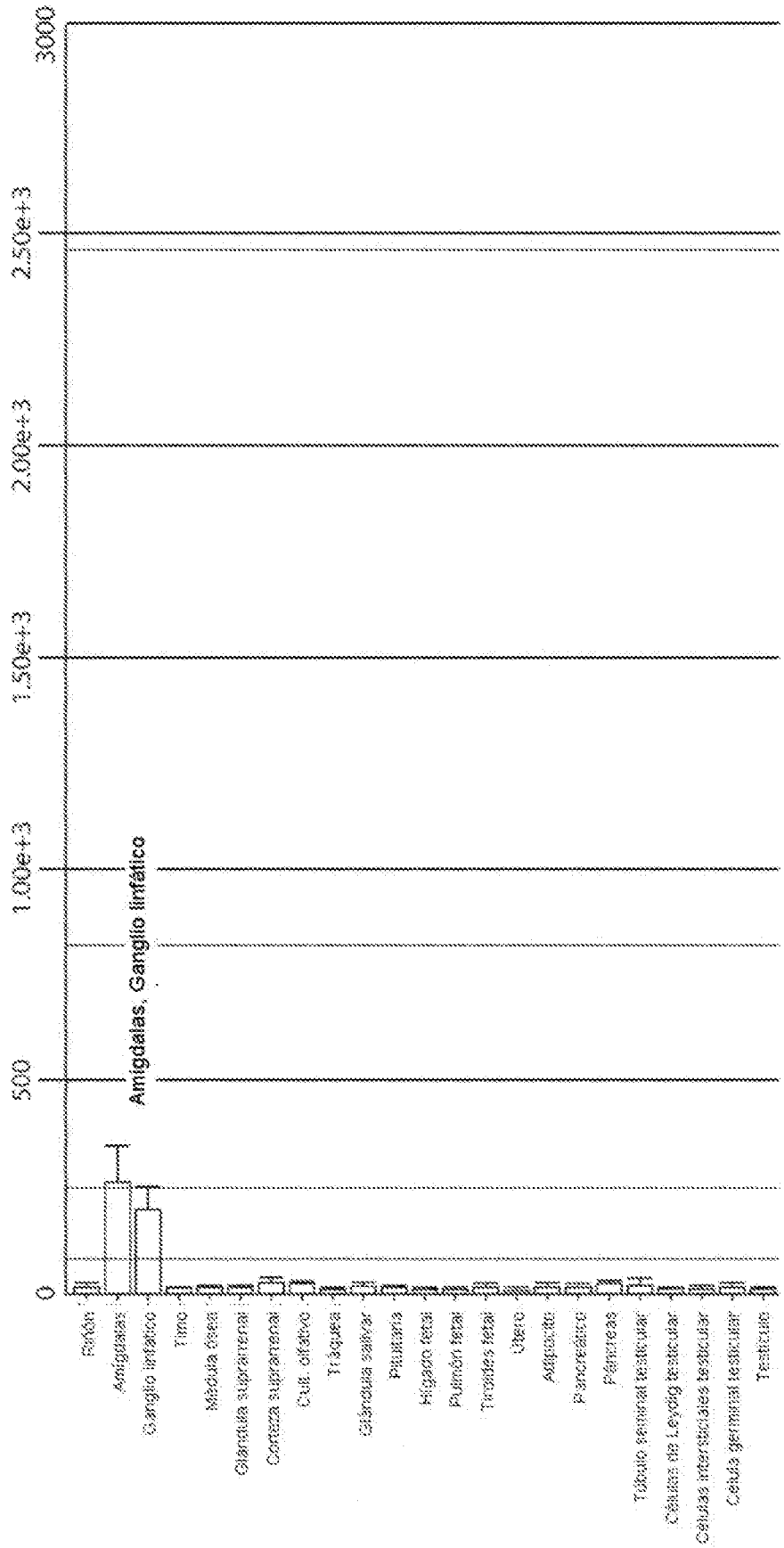

0
500
1.00e+3
1.50e+3
2.00e+3
2.50e+3
3000
Amígdalas, Ganglio linfático
Bazo
Amígdalas
Ganglio linfático
Timo
Médula ósea
Glándula suprarrenal
Corteza suprarrenal
Cul. olfativo
Tráquea
Glándula salival
Placenta
Hígado fetal
Pulmón fetal
Tronco fetal
Útero
Adipocito
Pancreático
Páncreas
Túbulo seminal testicular
Células de Leydig testicular
Células intersticiales testicular
Célula germinal testicular
Testículo

FIG. 39-1

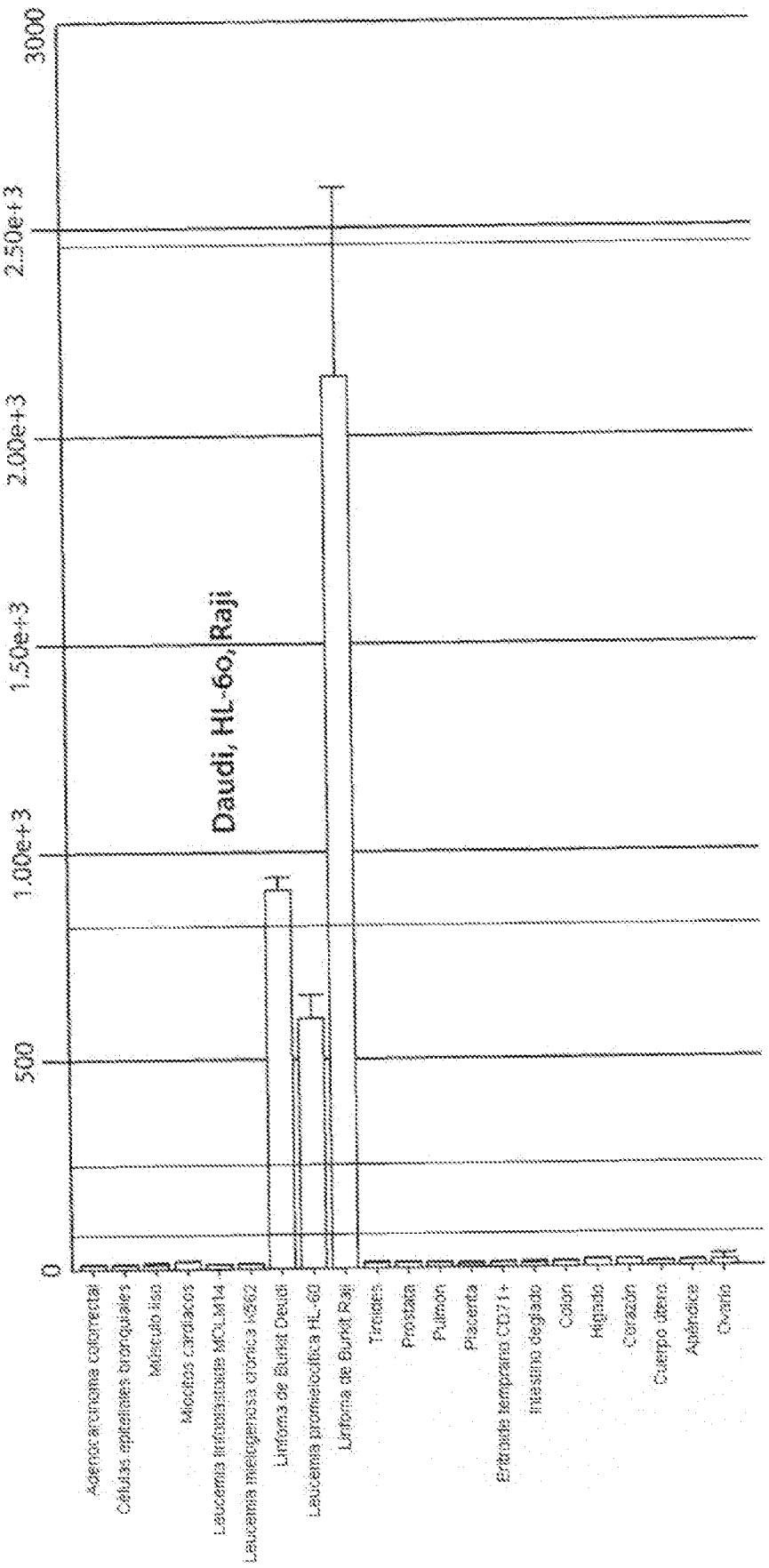

3000
2.50e+3
2.00e+3
1.50e+3
1.00e+3
500
0
Daudi, HL-60, Raji
Adenocarcinoma colorrectal
Células epiteliales bronquiales
Músculo liso
Mioblastos cardíacos
Leucemia linfoblástica MOLM14
Leucemia mielogenosa crónica K562
Linfoma de Burkit Daudi
Leucemia promielocítica HL-60
Linfoma de Burkit Raji
Timo
Próstata
Pulmón
Placenta
Epitelio temporal CD71+
Intestino delgado
Colon
Hígado
Corazón
Cuerpo uterino
Apéndice
Ovario

FIG. 39-2

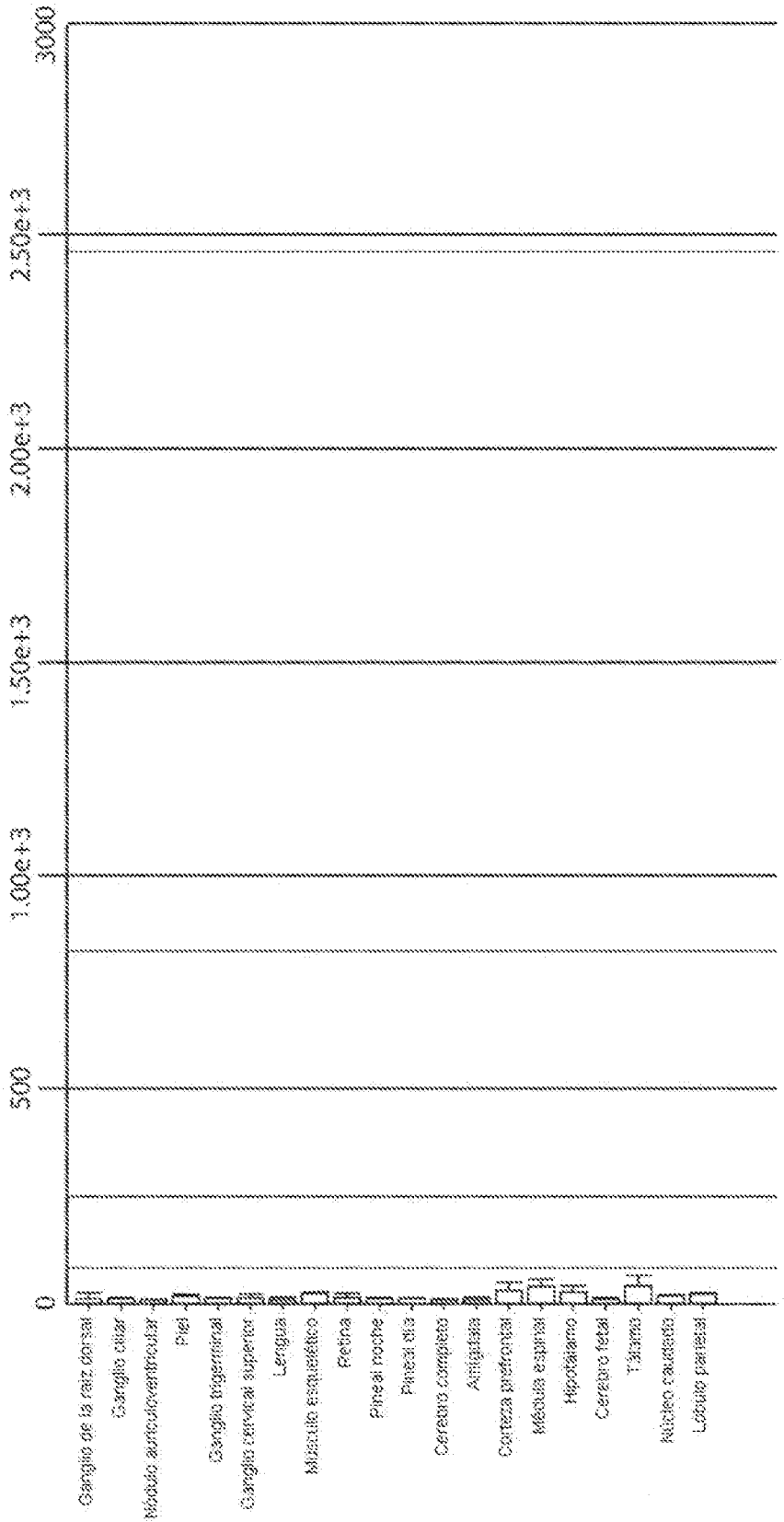

3000
2.50e+3
2.00e+3
1.50e+3
1.00e+3
500
0
Ganglio de la raíz dorsal
Ganglio ciliar
Módulo auriculoventricular
Piel
Ganglio trigeminal
Ganglio cervical superior
Lengua
Músculo esquelético
Retina
Glándula mostaza
Pared ósea
Cerebro completo
Amígdalas
Corteza prefrontal
Médula espinal
Hipotálamo
Cerebro fetal
Tálamo
Núcleo caudado
Lóbulo parietal

FIG. 39-3

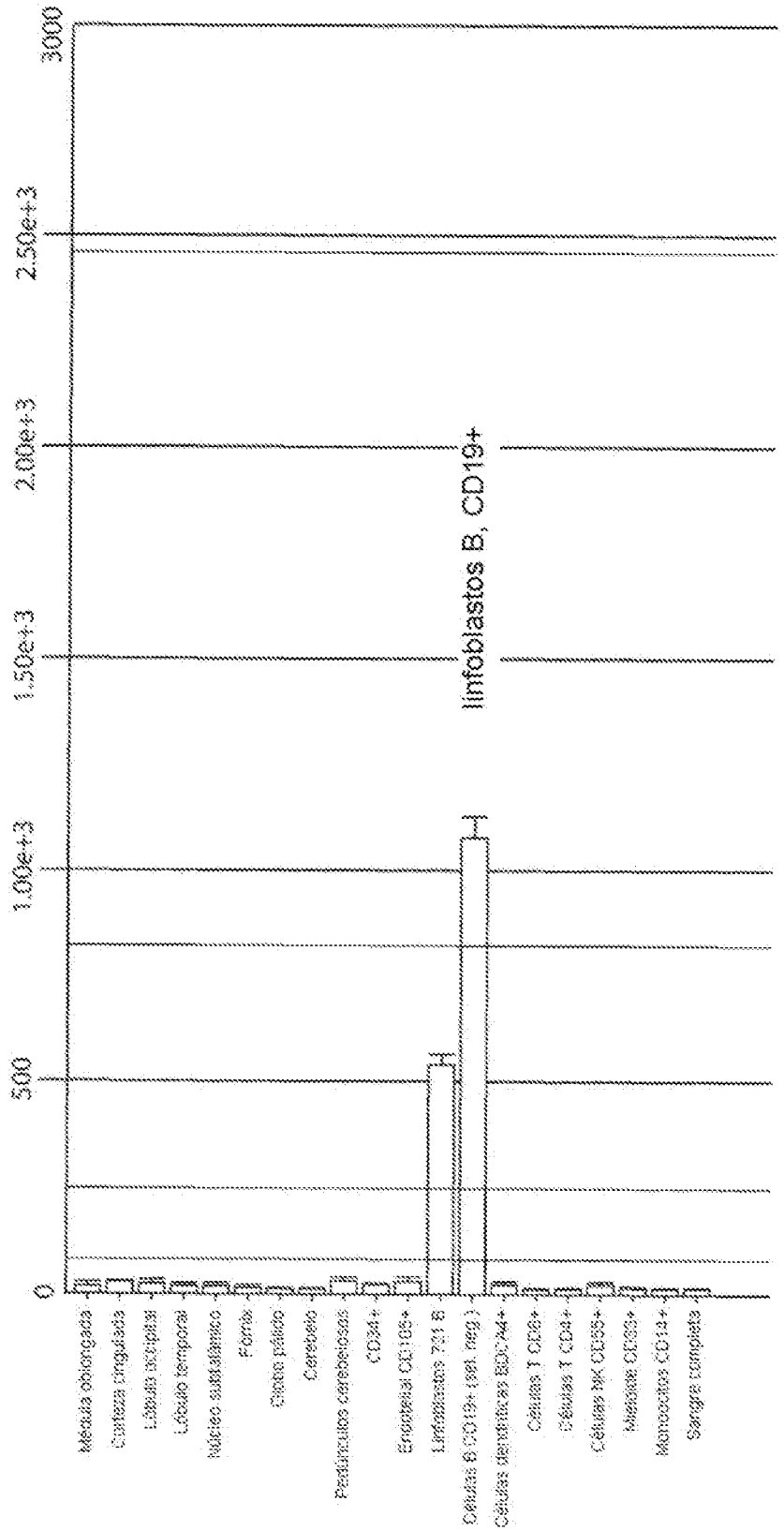


FIG. 39-4

Fuente: BioGPS.org, GeneAtlas U133A, grma

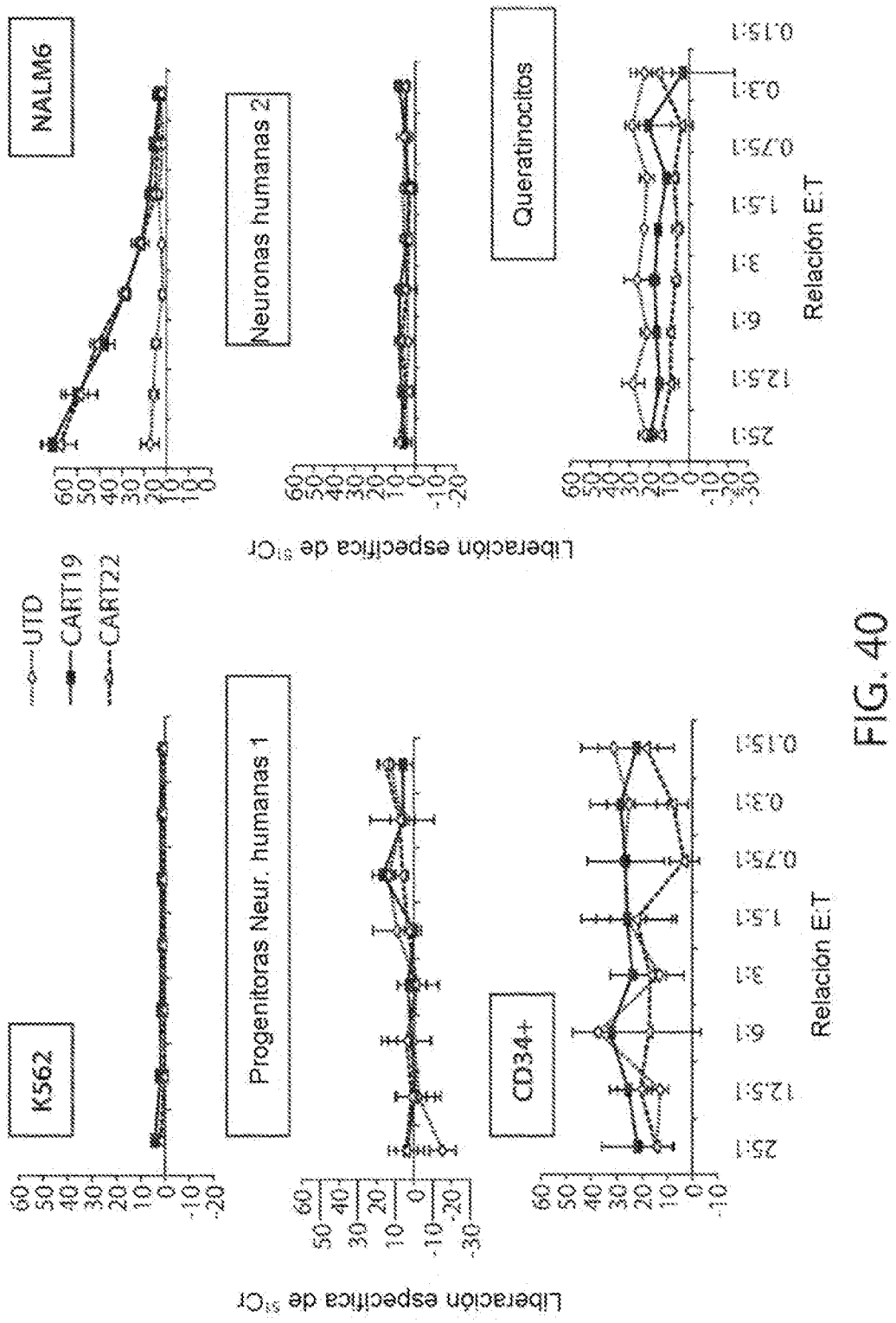

NALM6
Neuronas humanas 2
Queratinocitos
Liberación específica de 51Cr
Relación E:T
25:1
12,5:1
6:1
3:1
1,5:1
0,75:1
0,3:1
0,15:1
UTD
CART19
CART22
K562
Progenitoras Neur. humanas 1
CD34+

FIG. 40

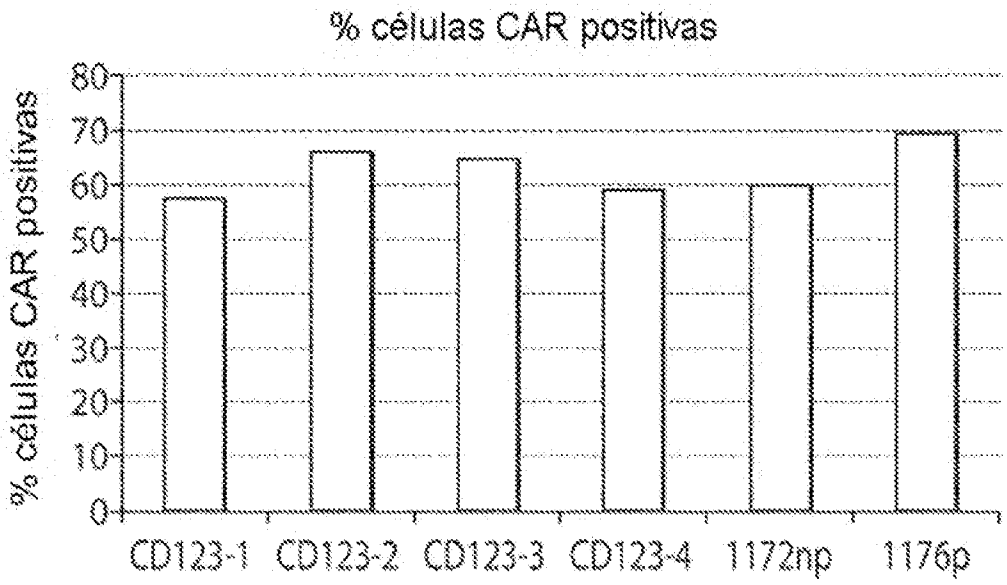

% células CAR positivas
% células CAR positivas
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CD123-1
CD123-2
CD123-3
CD123-4
1172np
1176p

FIG. 41

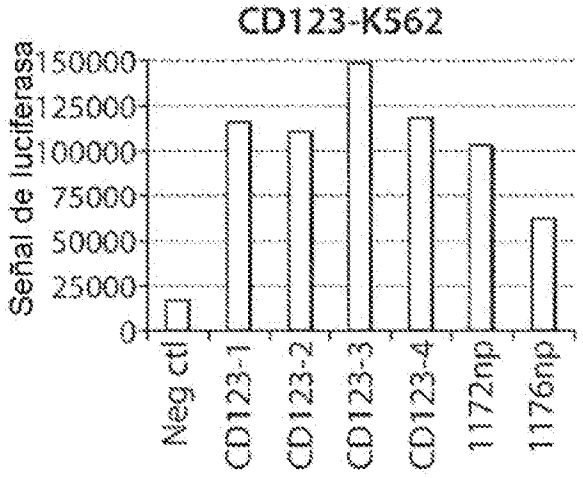


FIG. 42A

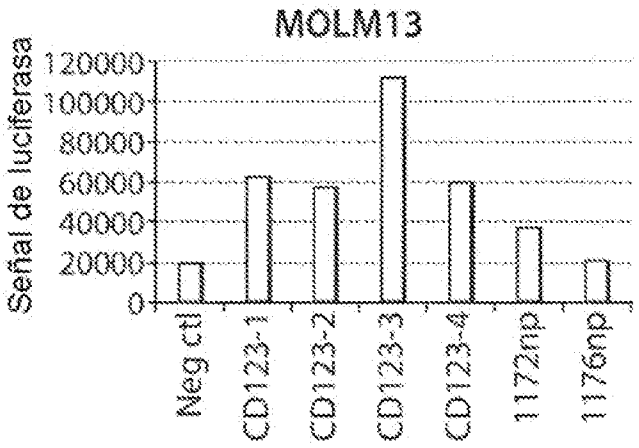


FIG. 42B

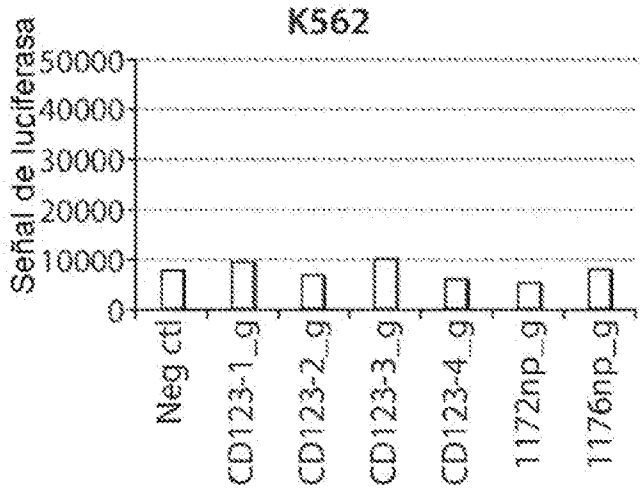


FIG. 42C

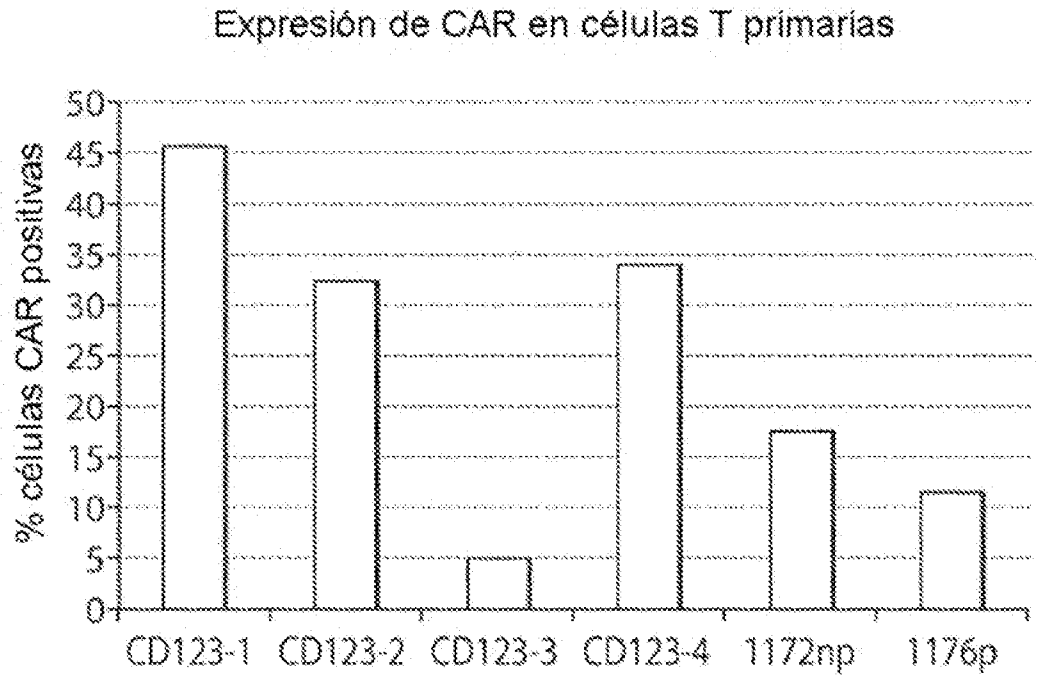

Expresión de CAR en células T primarias
% células CAR positivas
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
CD123-1
CD123-2
CD123-3
CD123-4
1172np
1176p

FIG. 43A

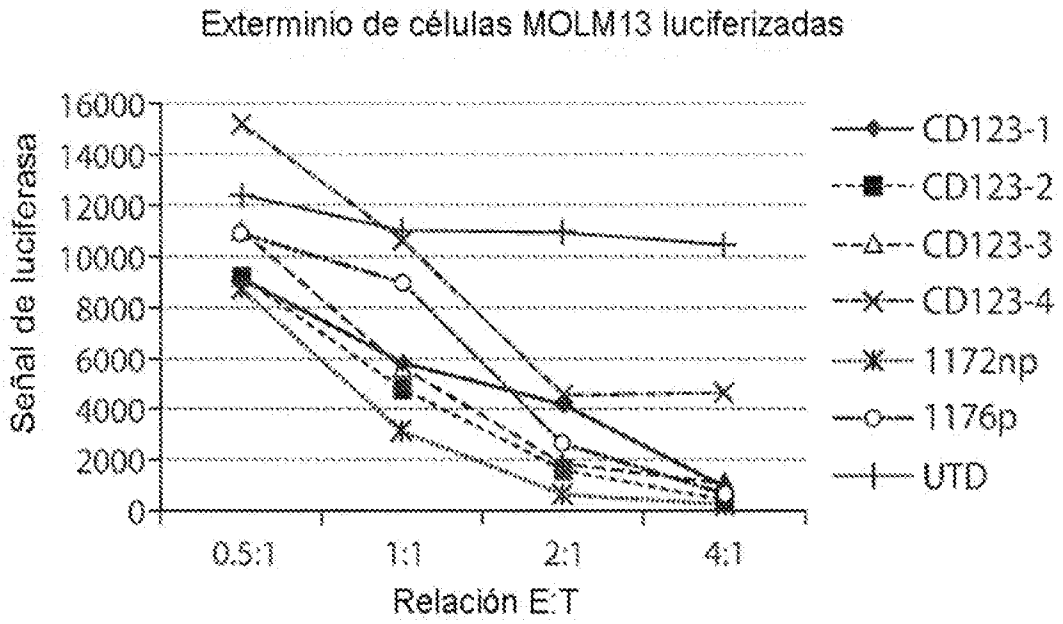

Exterminio de células MOLM13 luciferizadas
Señal de luciferasa
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.5:1
1:1
2:1
4:1
Relación E:T
CD123-1
CD123-2
CD123-3
CD123-4
1172np
1176p
UTD

FIG. 43B

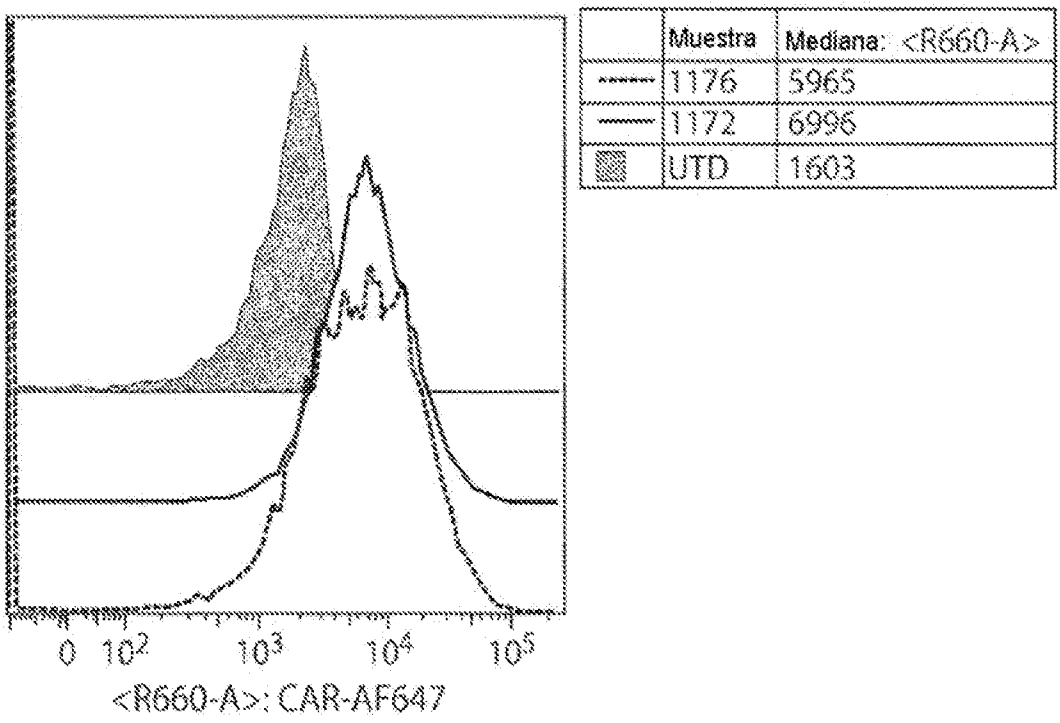


FIG. 44A

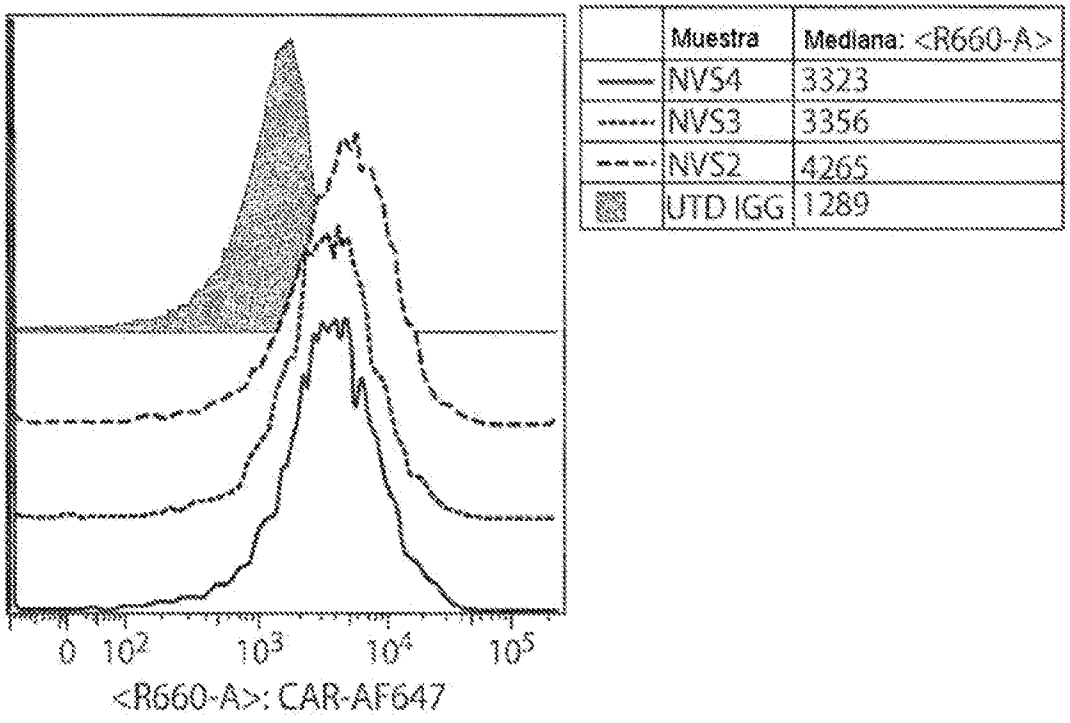


FIG. 44B

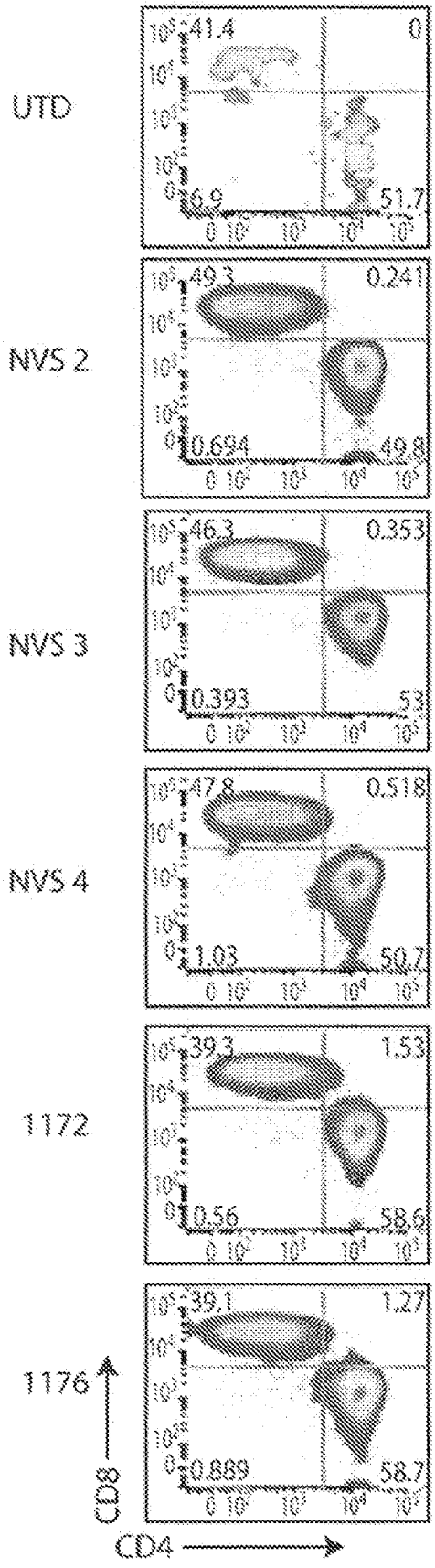

UTD
41.4
0
6.9
51.7
NVS 2
49.3
0.241
0.694
49.8
NVS 3
46.3
0.353
0.393
53
NVS 4
47.8
0.518
1.03
50.7
1172
39.3
1.53
0.56
58.6
1176
39.1
1.27
0.869
58.7
CD8
CD4

FIG. 45

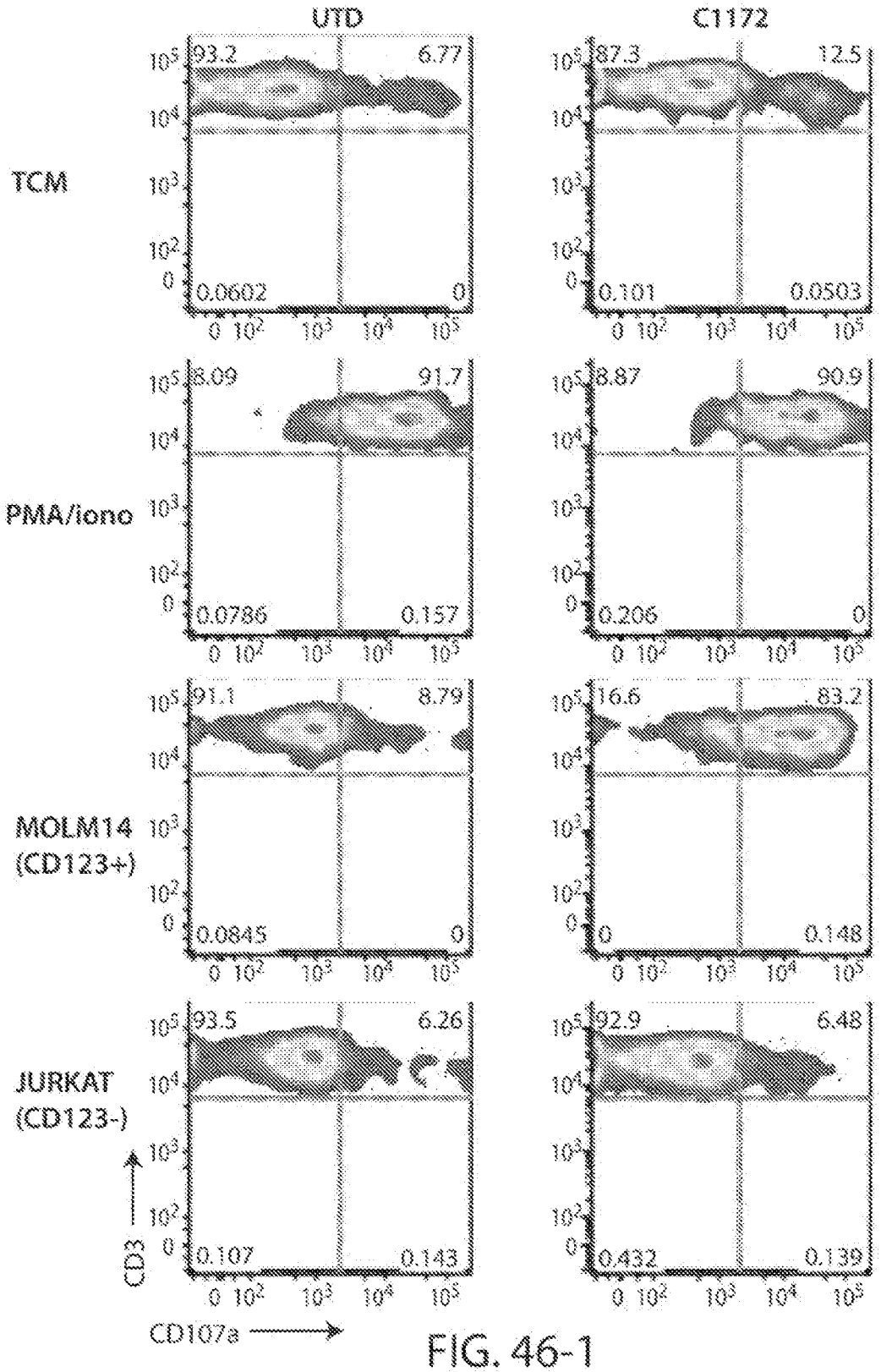

UTD
C1172
TCM
PMA/iono
MOLM14
(CD123+)
JURKAT
(CD123-)
93.2
6.77
0.0602
0
87.3
12.5
0.101
0.0503
8.09
91.7
0.0786
0.157
8.87
90.9
0.206
0
91.1
8.79
0.0845
0
16.6
83.2
0
0.148
93.5
6.26
0.107
0.143
92.9
6.48
0.432
0.139
CD3
CD107a

FIG. 46-1

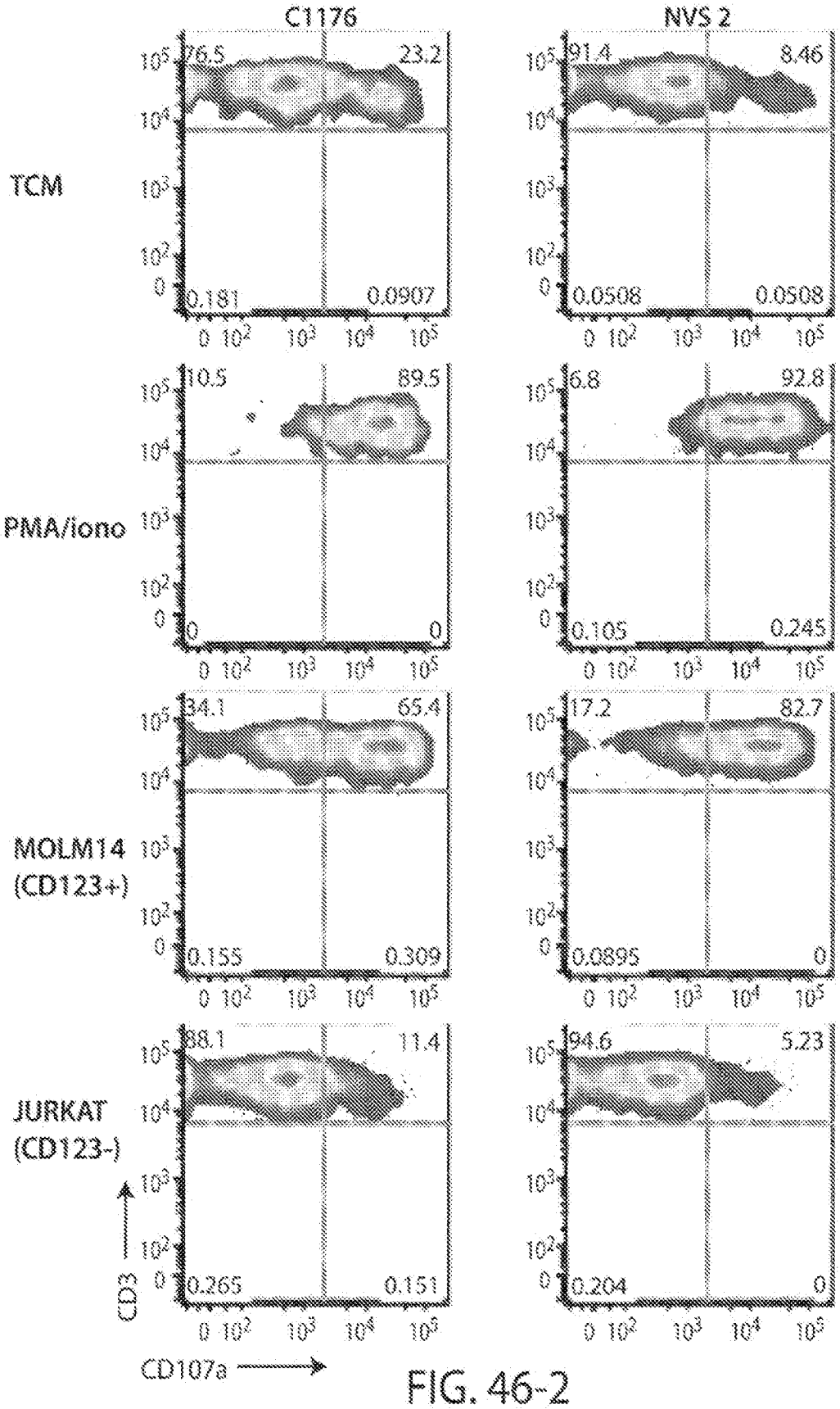

C1176
NVS 2
TCM
PMA/iono
MOLM14 (CD123+)
JURKAT (CD123-)
76.5
23.2
0.181
0.0907
91.4
8.46
0.0508
0.0508
10.5
89.5
0
0
6.8
92.8
0.105
0.245
34.1
65.4
0.155
0.309
17.2
82.7
0.0895
0
88.1
11.4
0.265
0.151
94.6
5.23
0.204
0
CD3
CD107a

FIG. 46-2

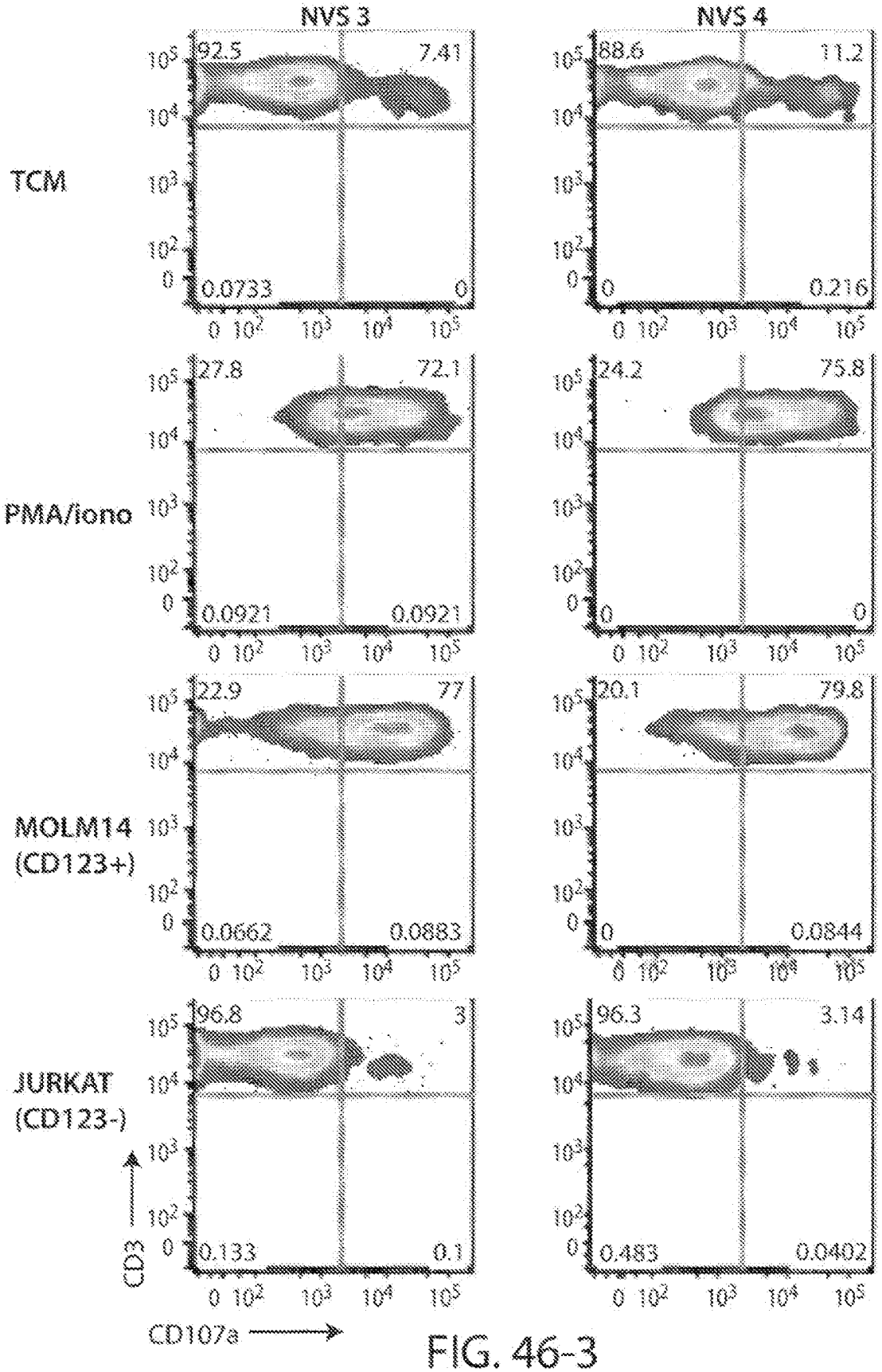

NVS 3
NVS 4
TCM
PMA/iono
MOLM14
(CD123+)
JURKAT
(CD123-)
92.5
7.41
0.0733
0
88.6
11.2
0
0.216
27.8
72.1
0.0921
0.0921
24.2
75.8
0
0
22.9
77
0.0662
0.0883
20.1
79.8
0
0.0844
96.8
3
0.133
0.1
96.3
3.14
0.483
0.0402
CD3
CD107a

FIG. 46-3

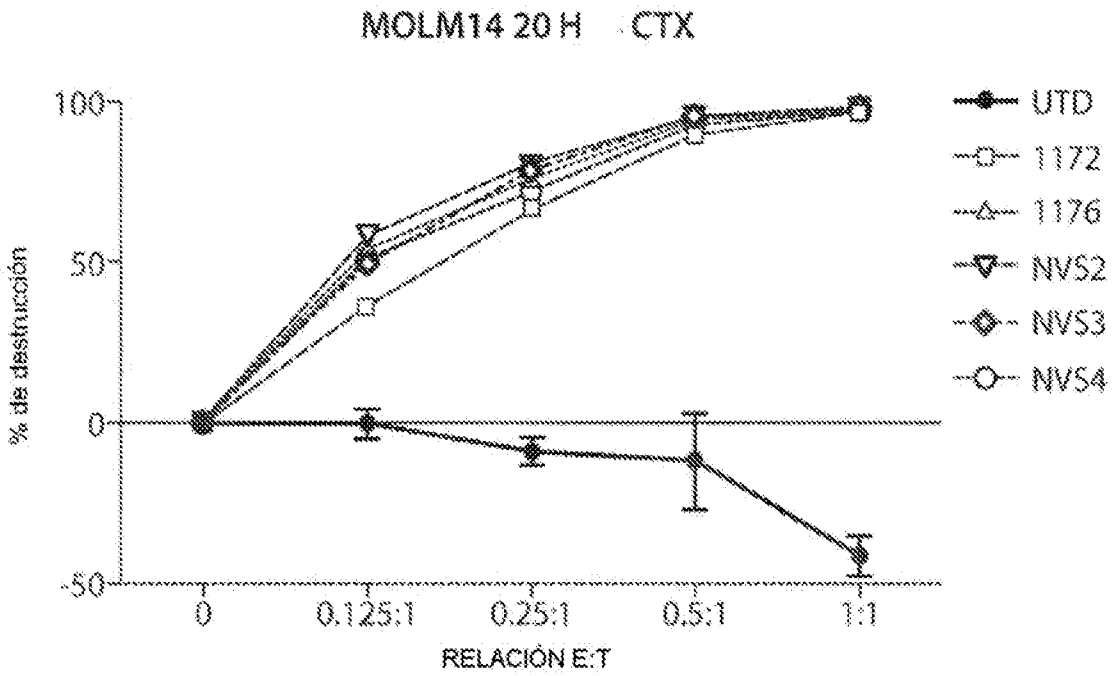

MOLM14 20 H CTX
100
50
0
-50
% de destrucción
0
0.125:1
0.25:1
0.5:1
1:1
RELACIÓN E:T
UTD
1172
1176
NVS2
NVS3
NVS4

FIG. 47

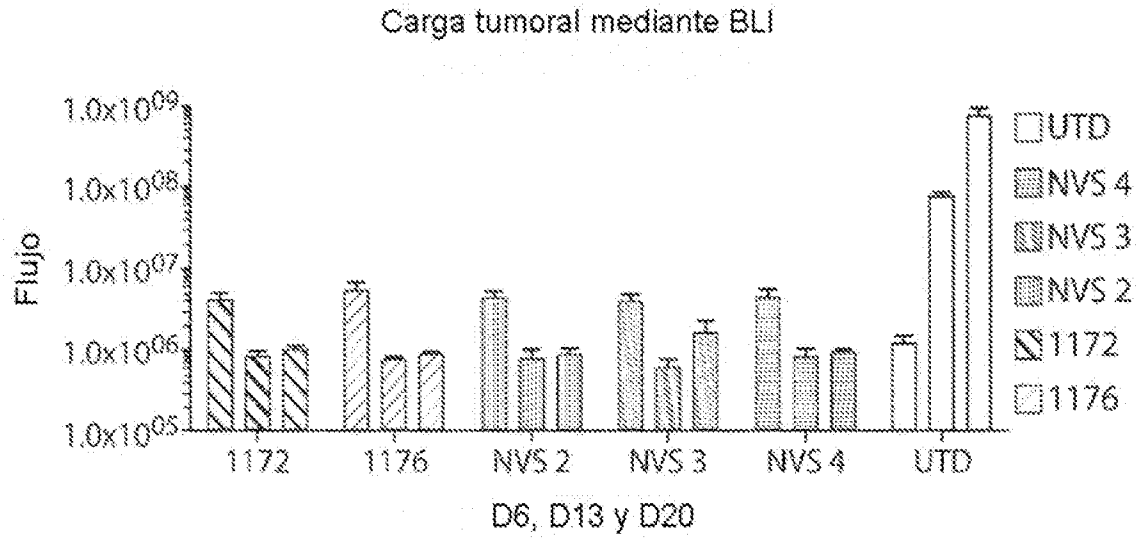

Carga tumoral mediante BLI
Flujo
1.0x10^09
1.0x10^08
1.0x10^07
1.0x10^06
1.0x10^05
1172
1176
NVS 2
NVS 3
NVS 4
UTD
D6, D13 y D20
UTD
NVS 4
NVS 3
NVS 2
1172
1176

FIG. 48

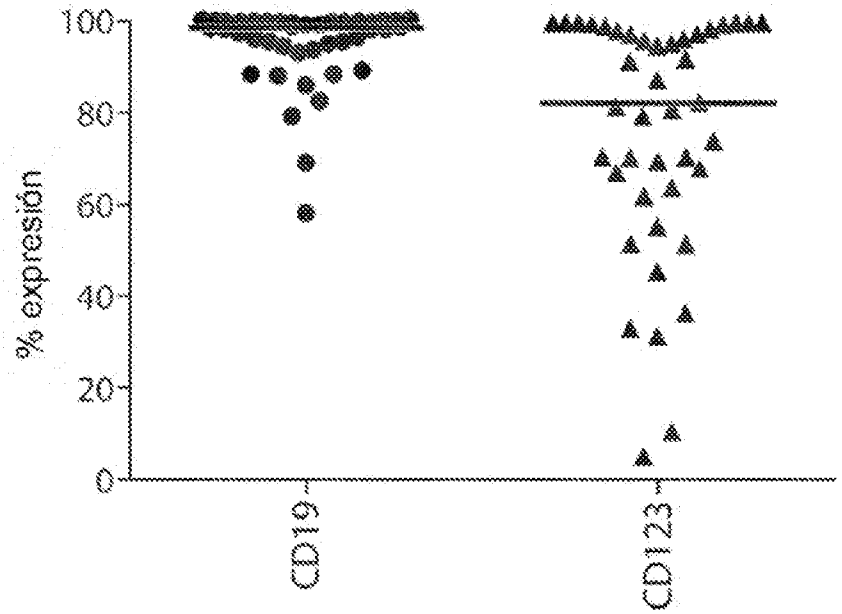


FIG. 49A

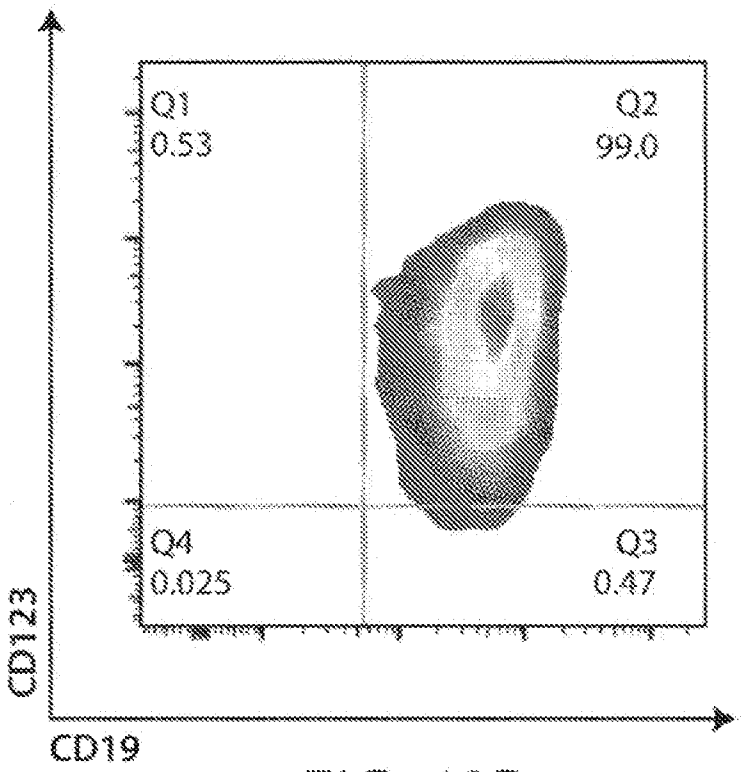


FIG. 49B

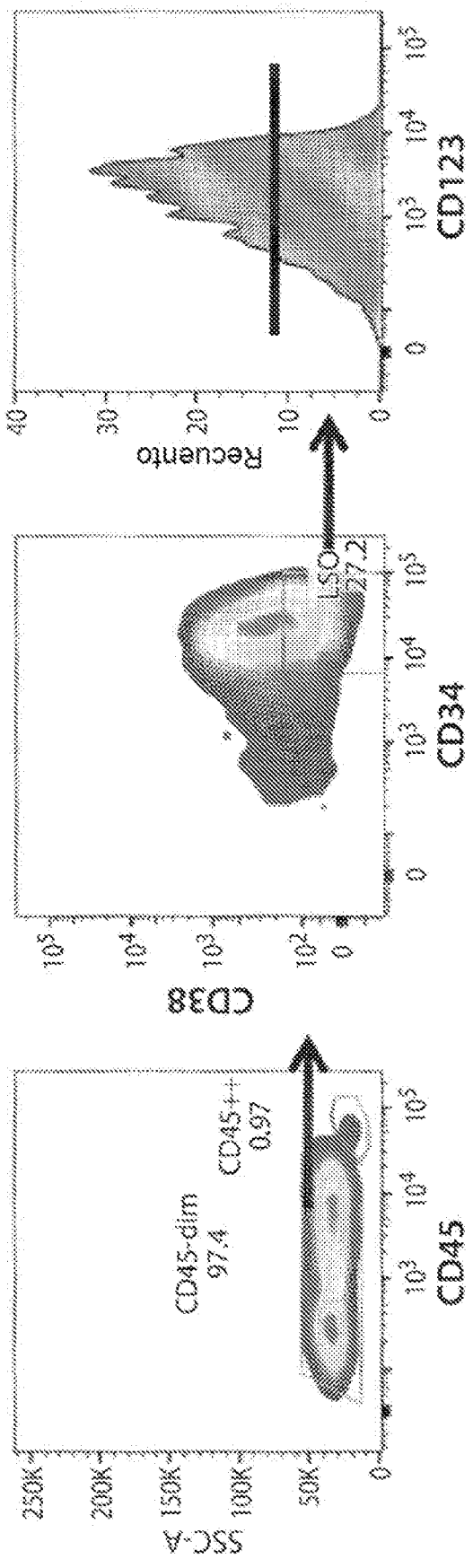
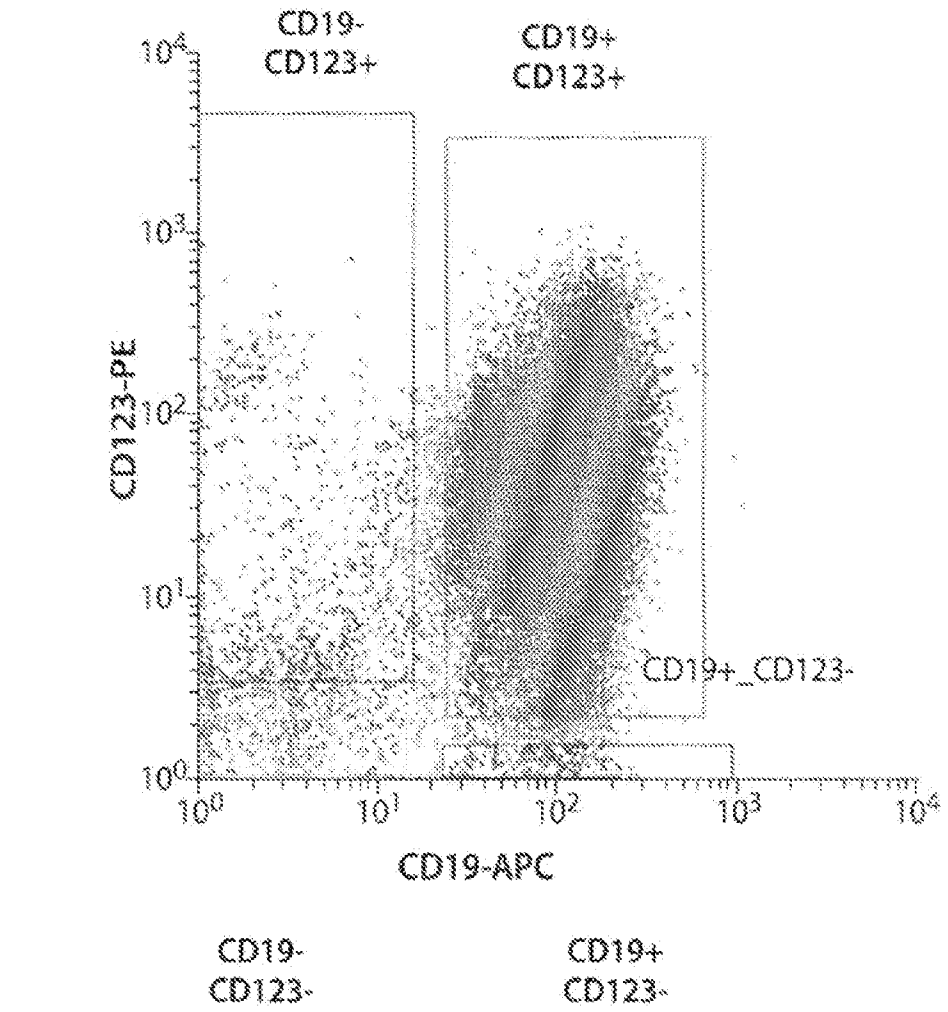

SSC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0
CD45
CD45-dim
97.4
CD45++
0.97
CD38
CD34
LSC
27.2
Recuento
CD123

FIG. 49C


CD19-
CD123+
CD19+
CD123+
CD123-PE
CD19+_CD123-
CD19-APC
CD19-
CD123-
CD19+
CD123-

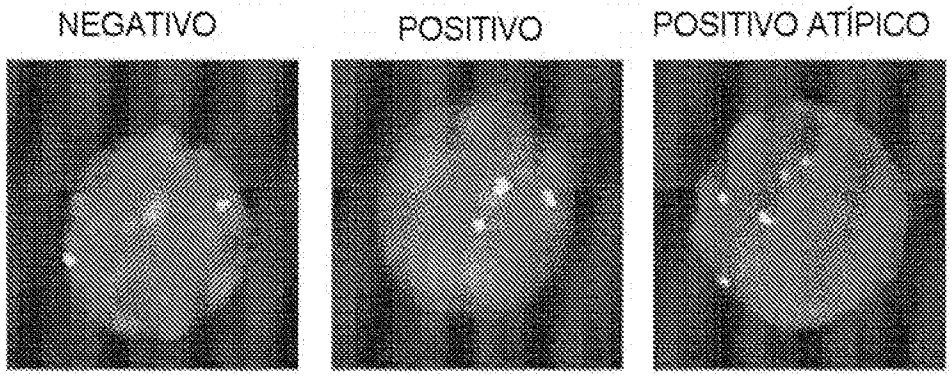

NEGATIVO
POSITIVO
POSITIVO ATÍPICO

FIG. 49D

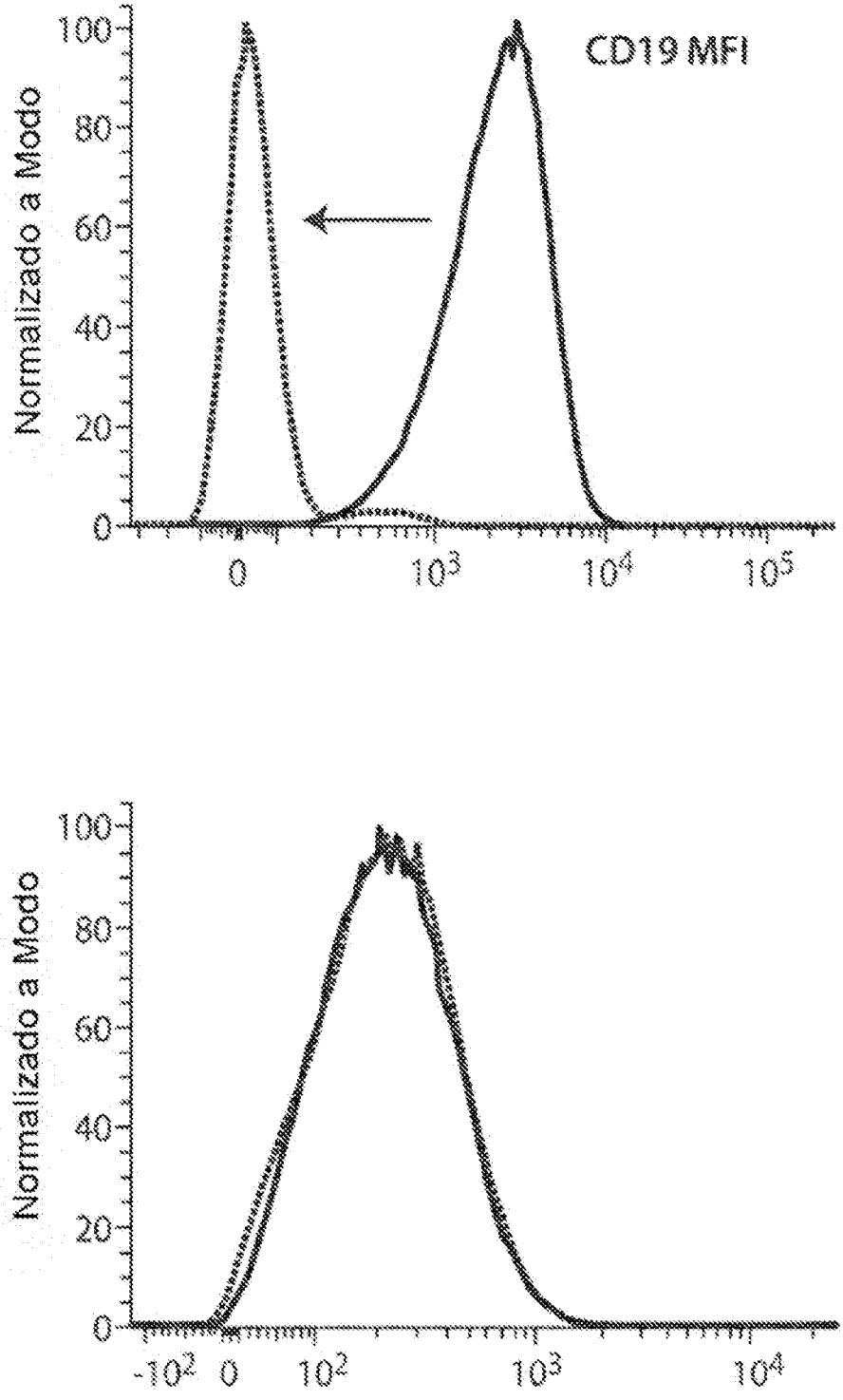

CD19 MFI
Normalizado a Modo
100
80
60
40
20
0
0
10^3
10^4
10^5
Normalizado a Modo
100
80
60
40
20
0
-10^2
0
10^2
10^3
10^4

FIG. 49E

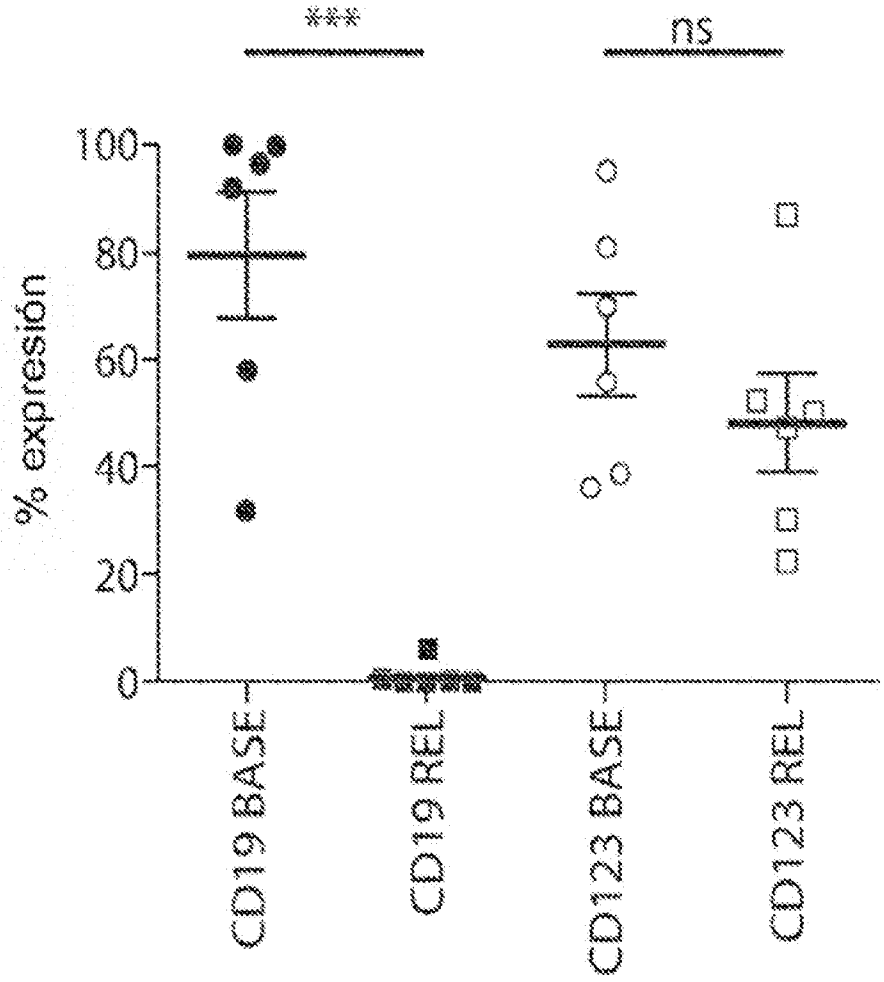

***
ns
100
80
60
40
20
0
% expresión
CD19 BASE
CD19 REL
CD123 BASE
CD123 REL

FIG. 49F

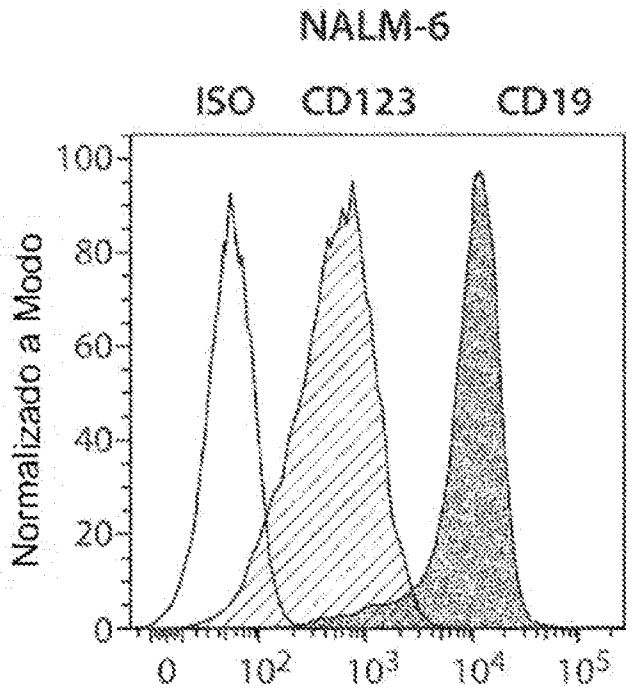


FIG. 50A

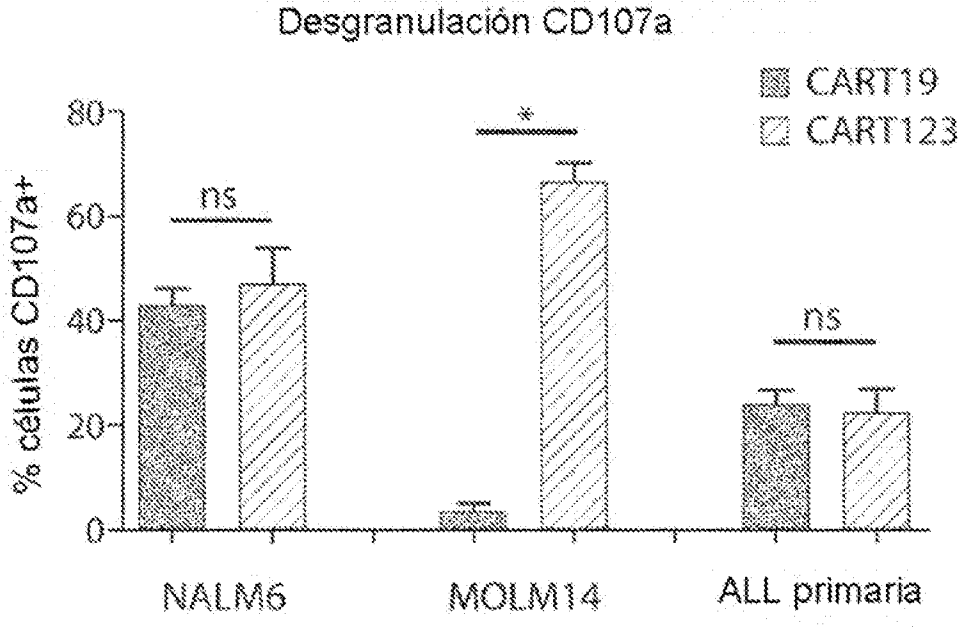


FIG. 50B

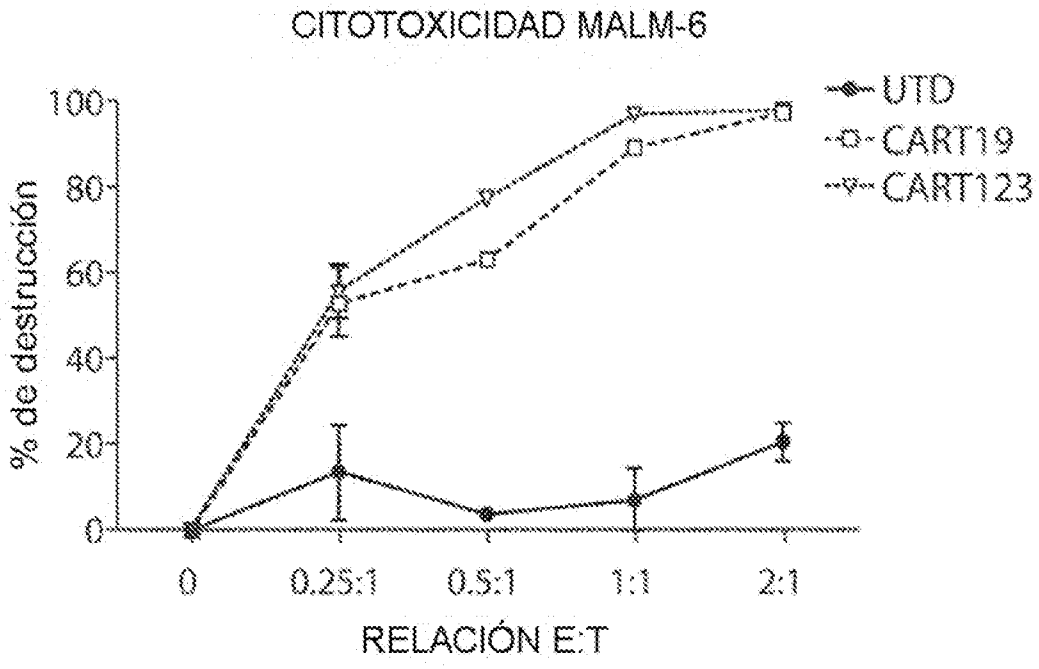


FIG. 50C

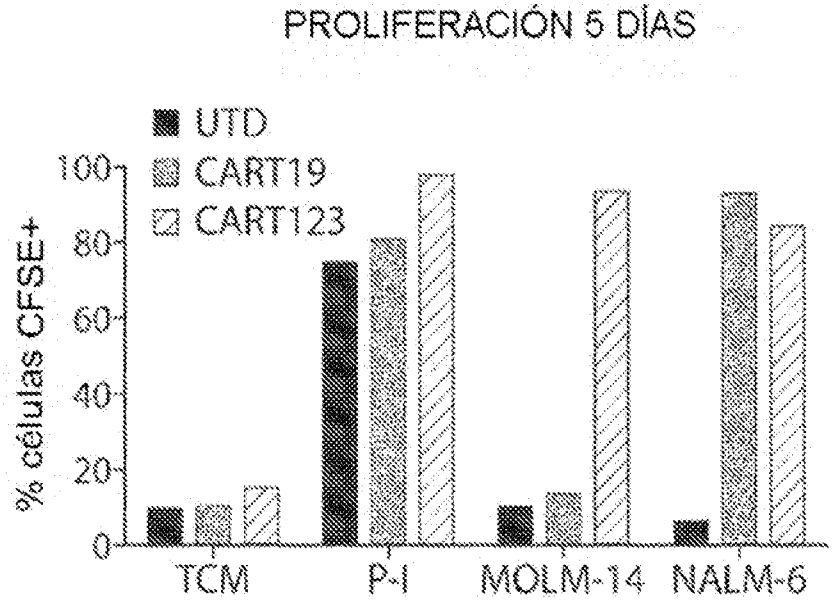


FIG. 50D

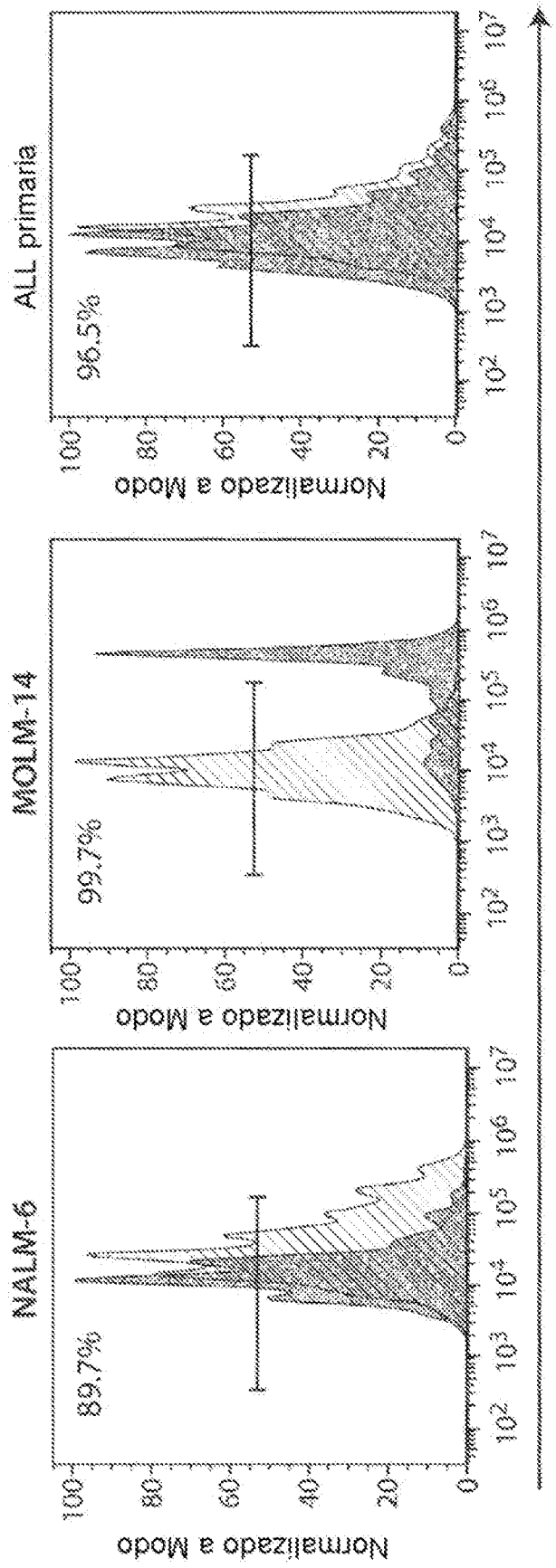

NALM-6
89.7%
MOLM-14
99.7%
ALL primaria
96.5%
Normalizado a Modo
0
20
40
60
80
100
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7
CFSE

FIG. 50E

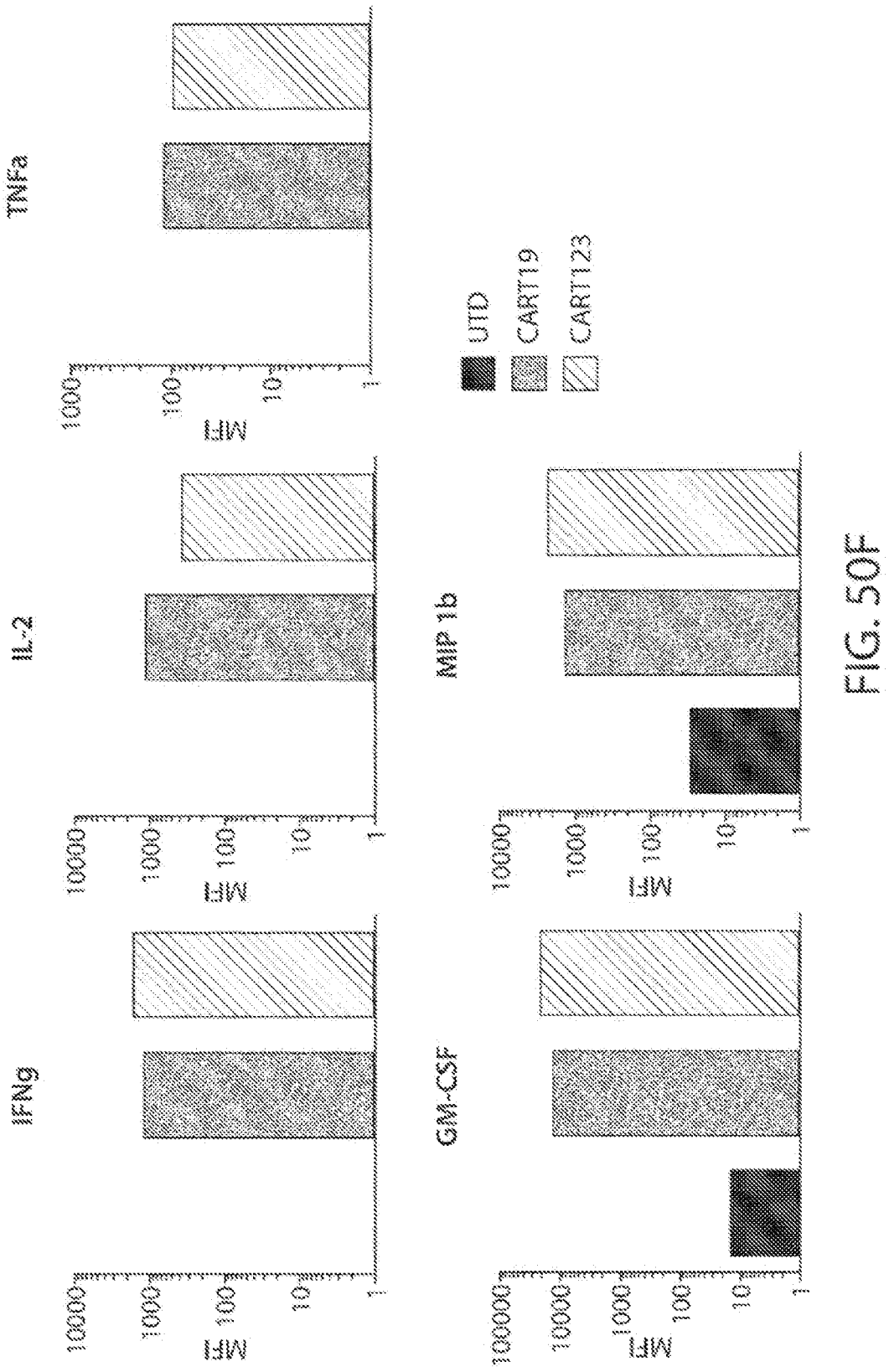


FIG. 50F

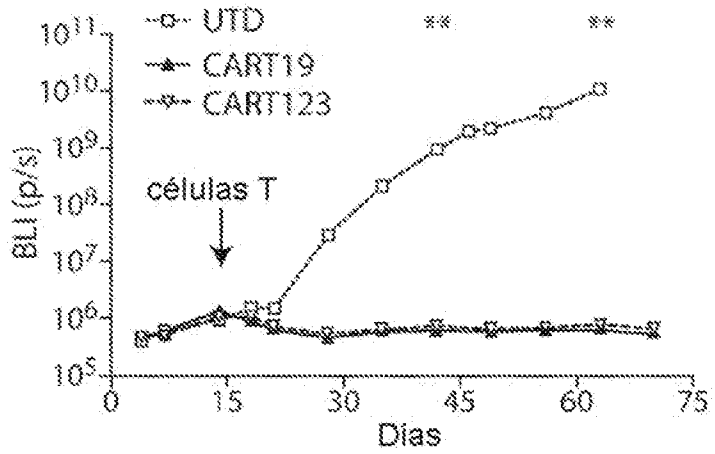


FIG. 51A

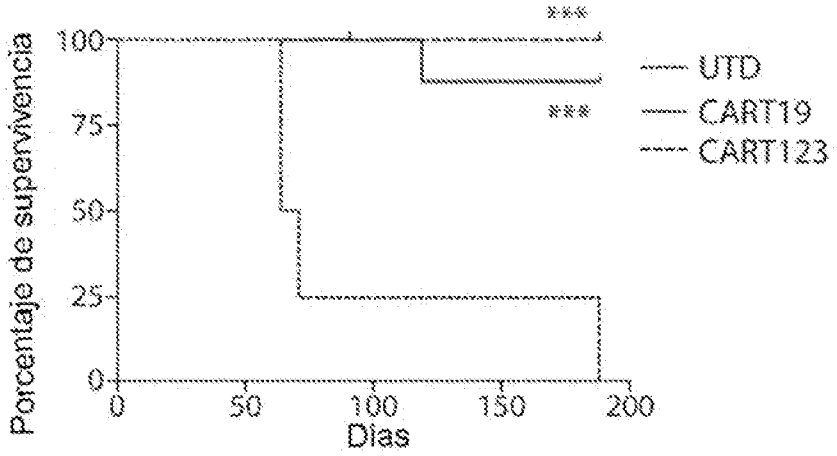


FIG. 51B

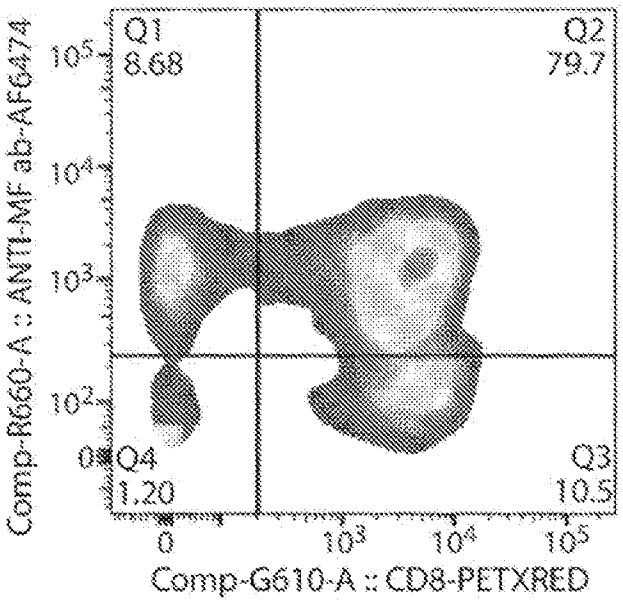


FIG. 51C

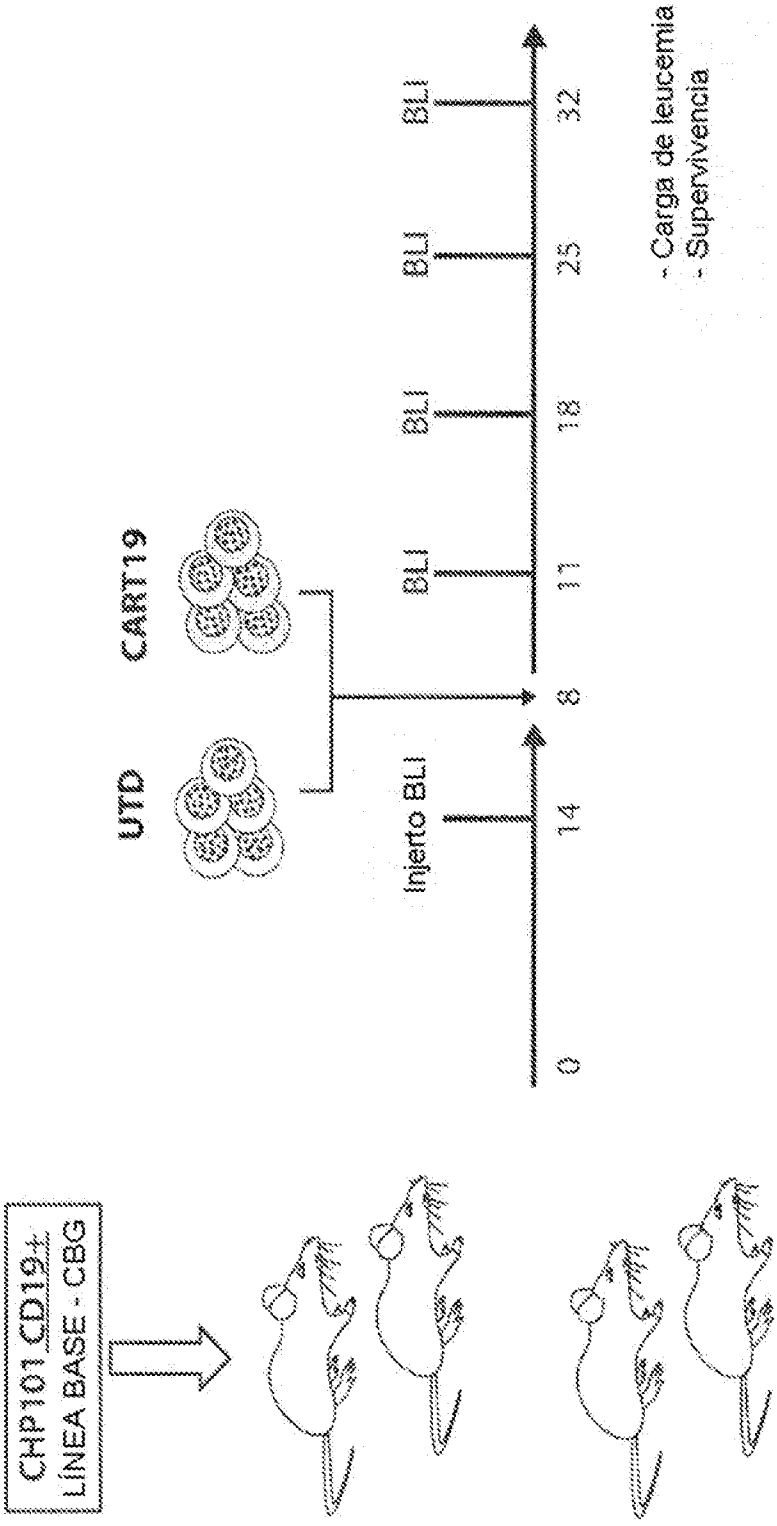

CHP101 CD19+
LÍNEA BASE - CBG
CHP101 CD19-
RECIDIVA - CBR
UTD
CART19
Injerto BLI
BLI
BLI
BLI
BLI
0
14
8
11
18
25
32
- Carga de leucemia
- Supervivencia

FIG. 52A

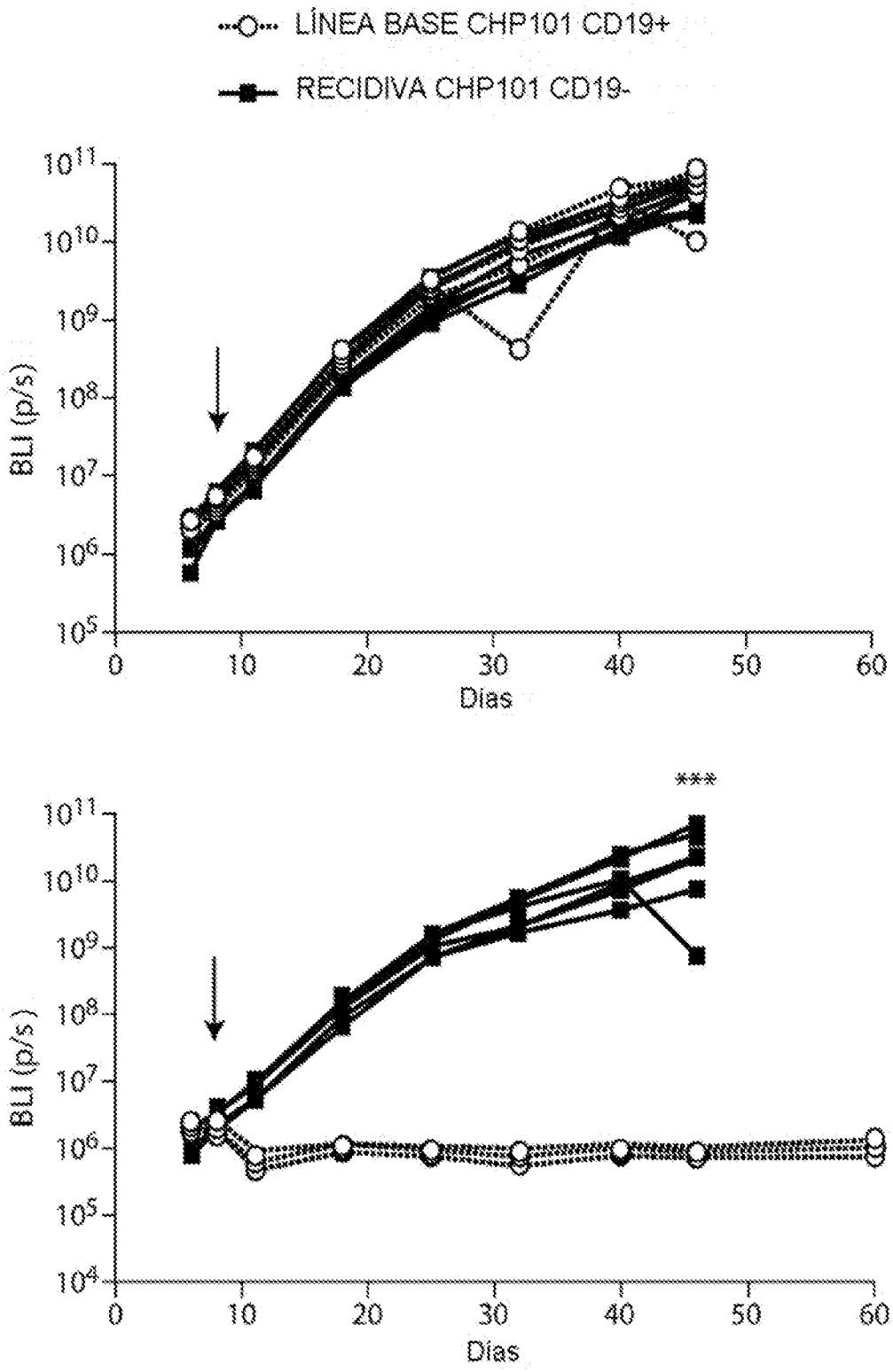


FIG. 52B

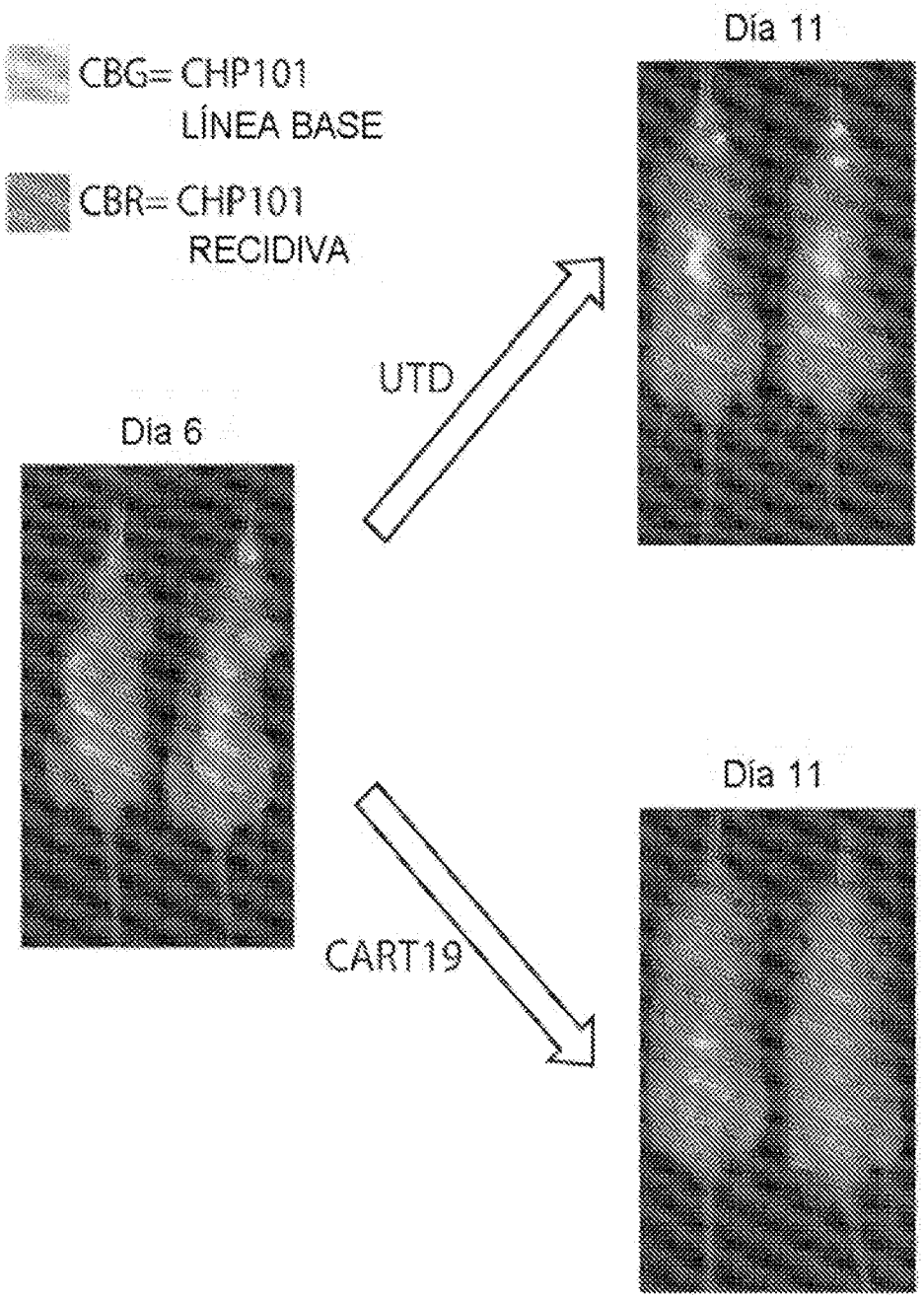

CBG= CHP101
LÍNEA BASE
CBR= CHP101
RECIDIVA
Día 6
UTD
Día 11
CART19
Día 11

FIG. 52C

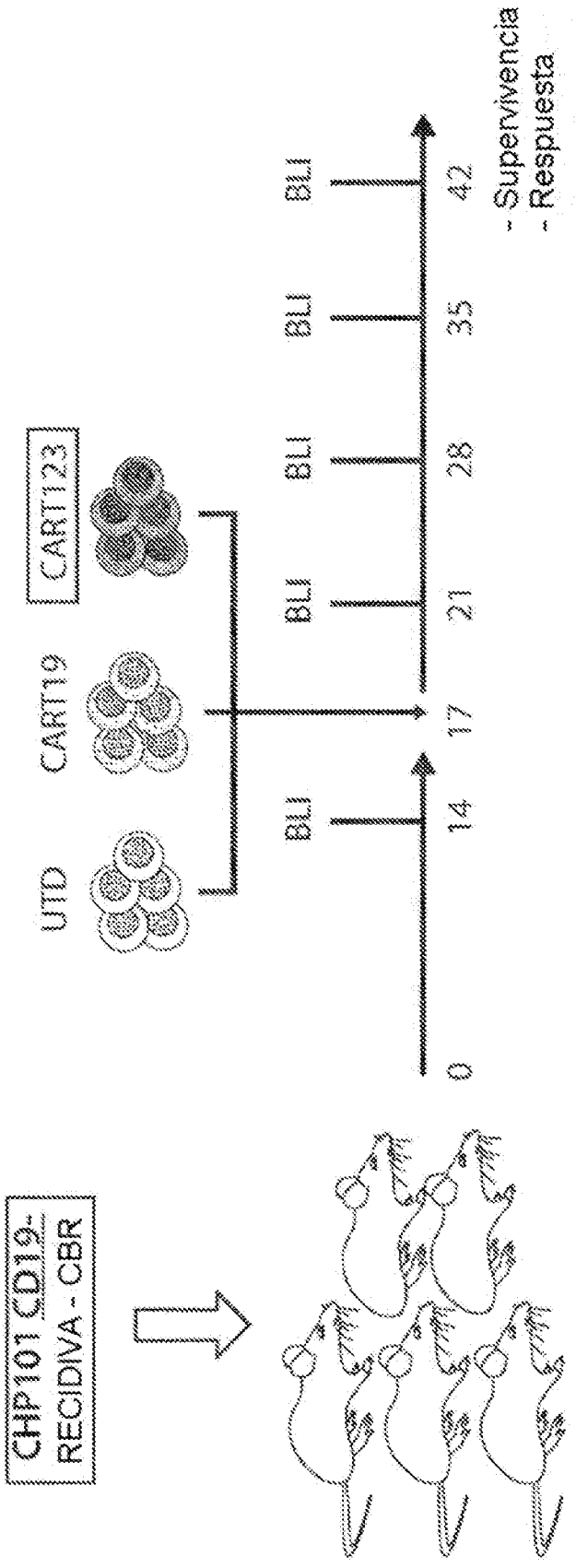

CHP101 CD19-
RECIDIVA - CBR
UTD
CART19
CART123
BLI
BLI
BLI
BLI
BLI
0
14
17
21
28
35
42
- Supervivencia
- Respuesta

FIG. 52D

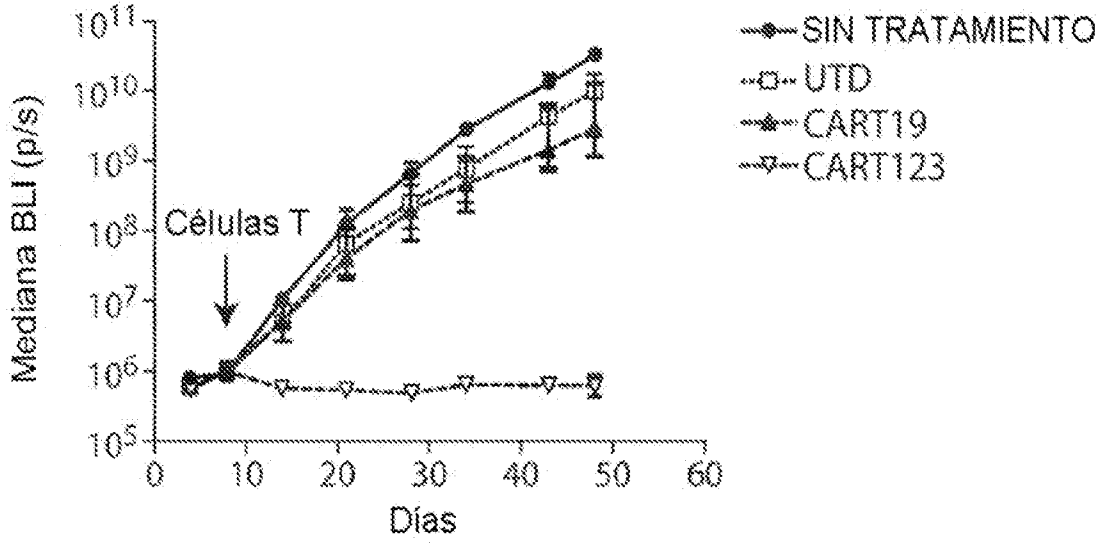


FIG. 52E

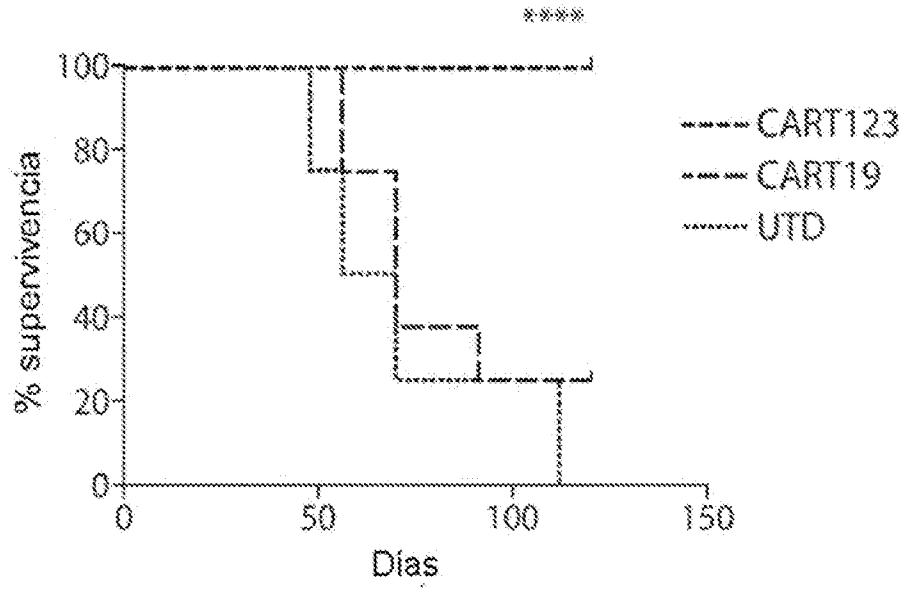


FIG. 52F

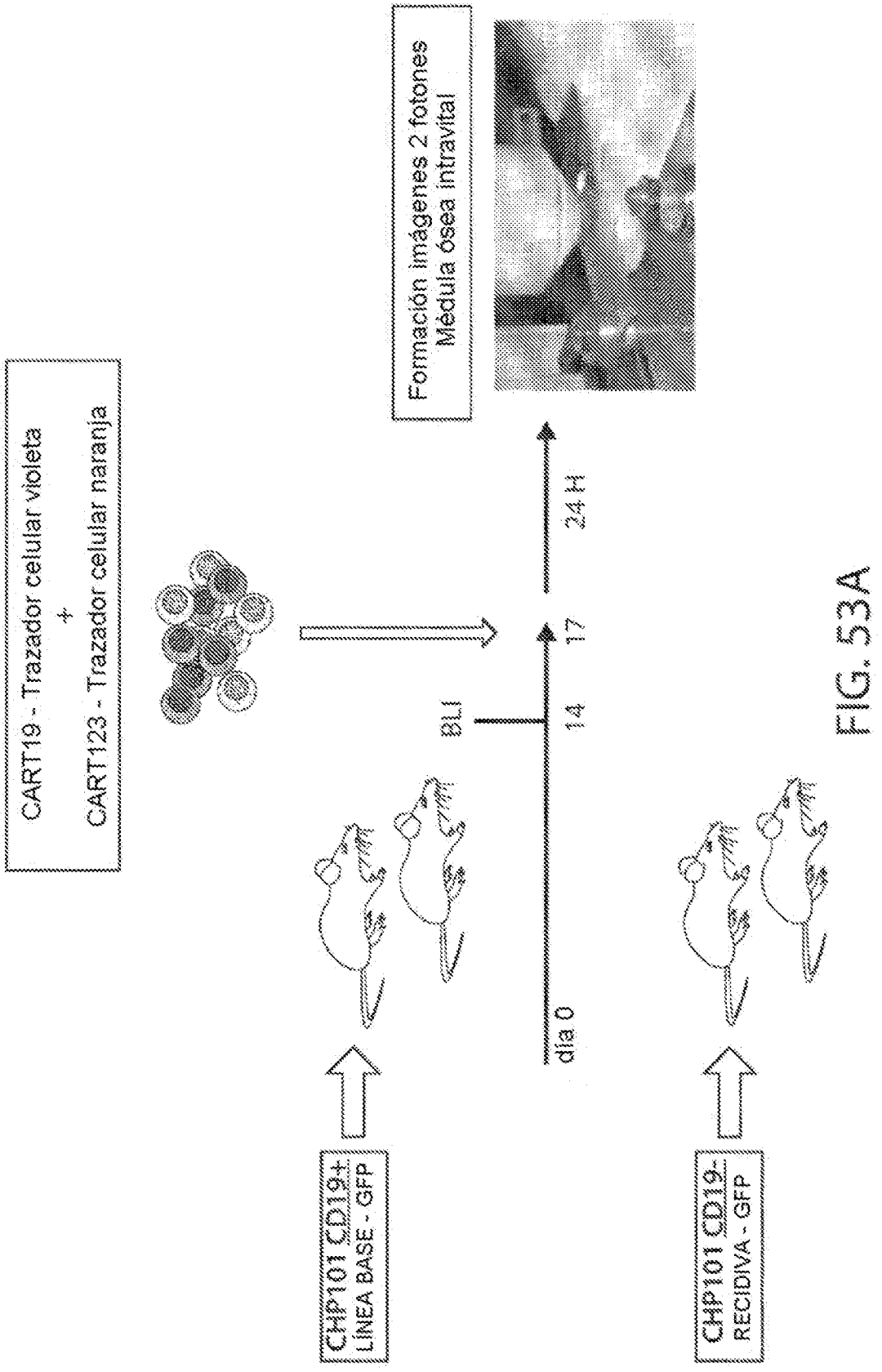

CART19 - Trazador celular violeta
+
CART123 - Trazador celular naranja
Formación imágenes 2 fotones
Médula ósea intravital
CHP101 CD19+
LÍNEA BASE - GFP
CHP101 CD19-
RECIDIVA - GFP
día 0
14
17
BLI
24 H

FIG. 53A

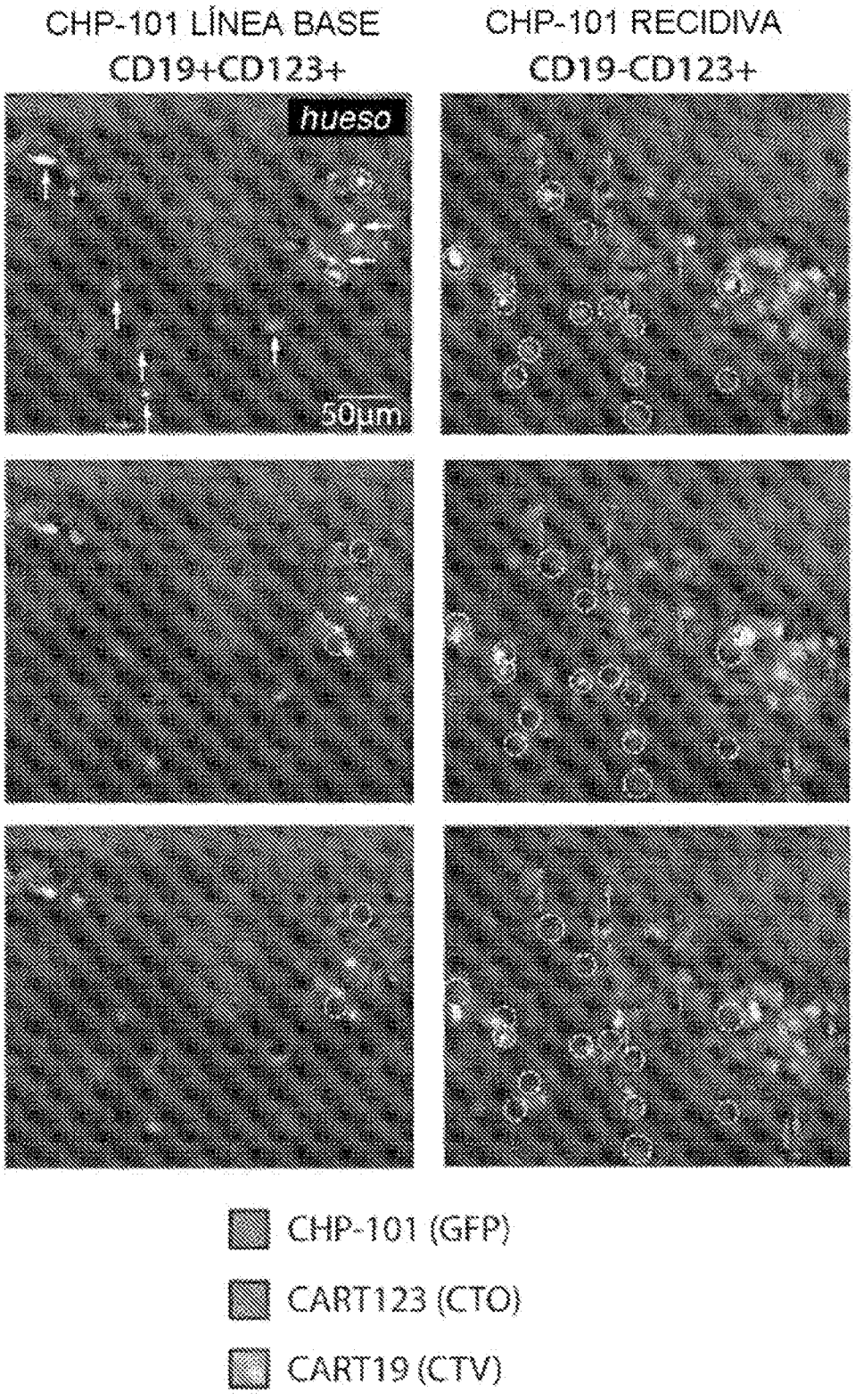

CHP-101 LÍNEA BASE
CD19+CD123+
CHP-101 RECIDIVA
CD19-CD123+
hueso
50µm
CHP-101 (GFP)
CART123 (CTO)
CART19 (CTV)

FIG. 53B

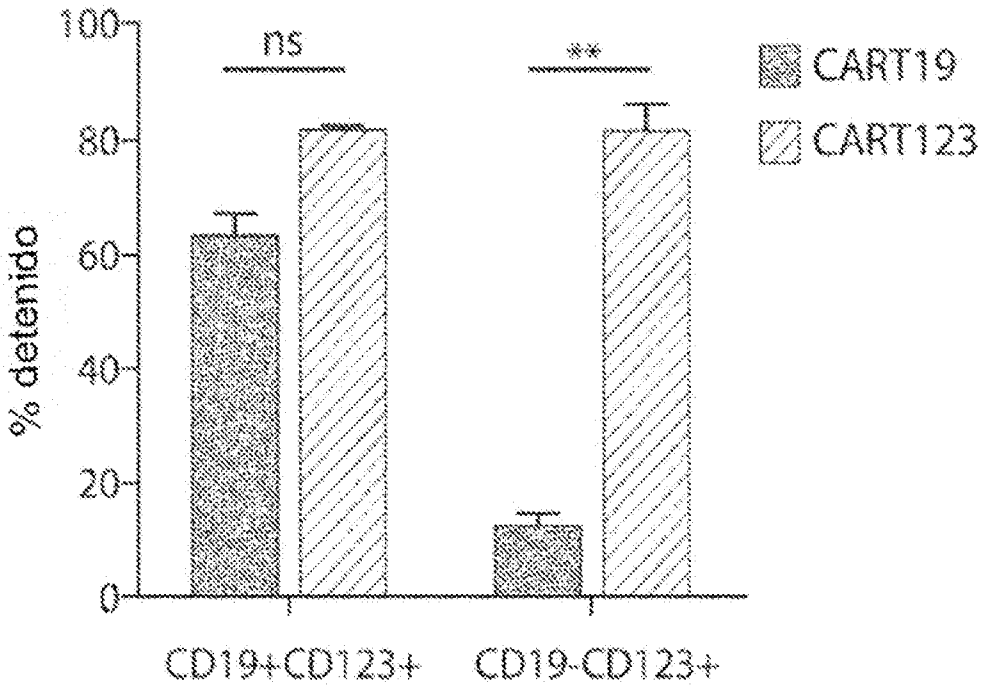

100
80
60
40
20
0
% detenido
ns
**
CART19
CART123
CD19+CD123+
CD19-CD123+

FIG. 53C

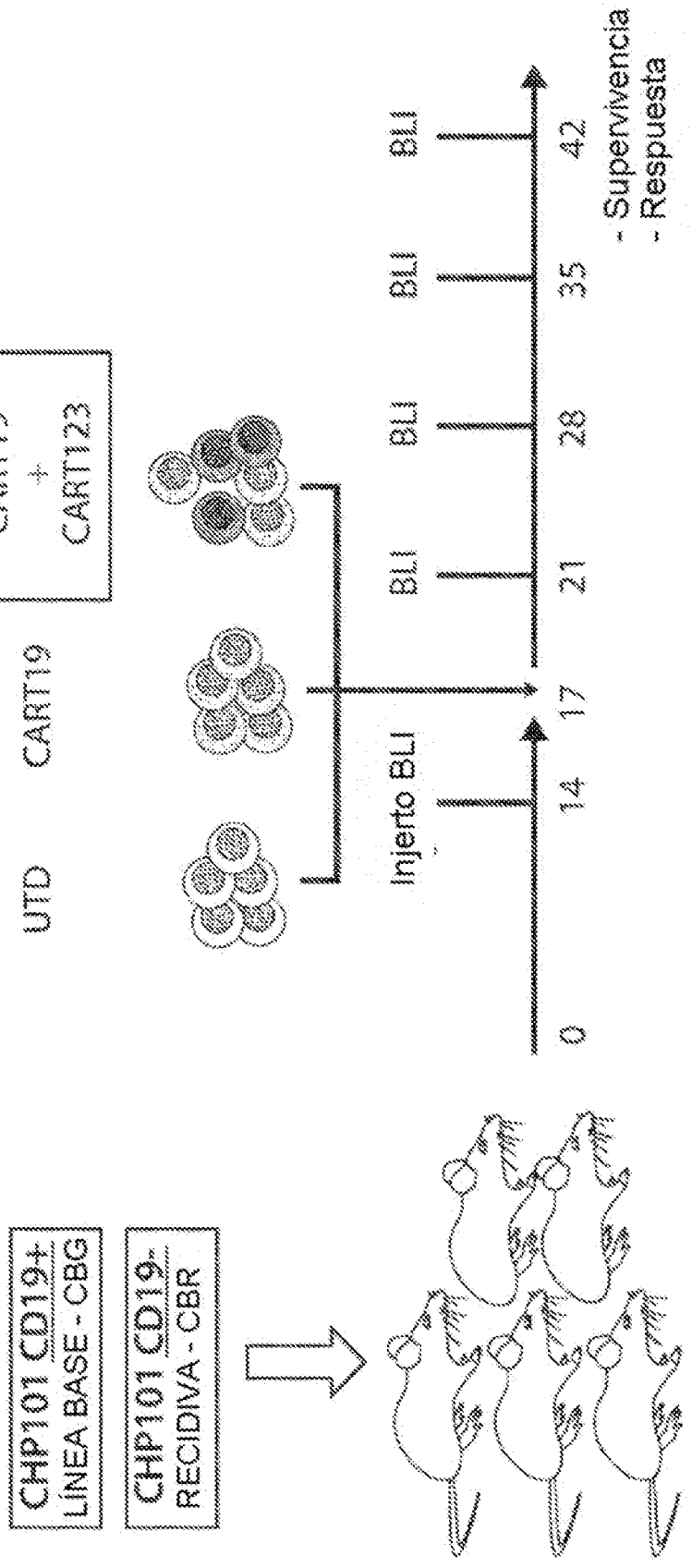

CHP101 CD19+
LÍNEA BASE - CBG
CHP101 CD19-
RECIDIVA - CBR
UTD
CART19
CART19
+
CART123
Injerto BLI
0
14
17
21
28
35
42
BLI
BLI
BLI
BLI
- Supervivencia
- Respuesta

FIG. 54A

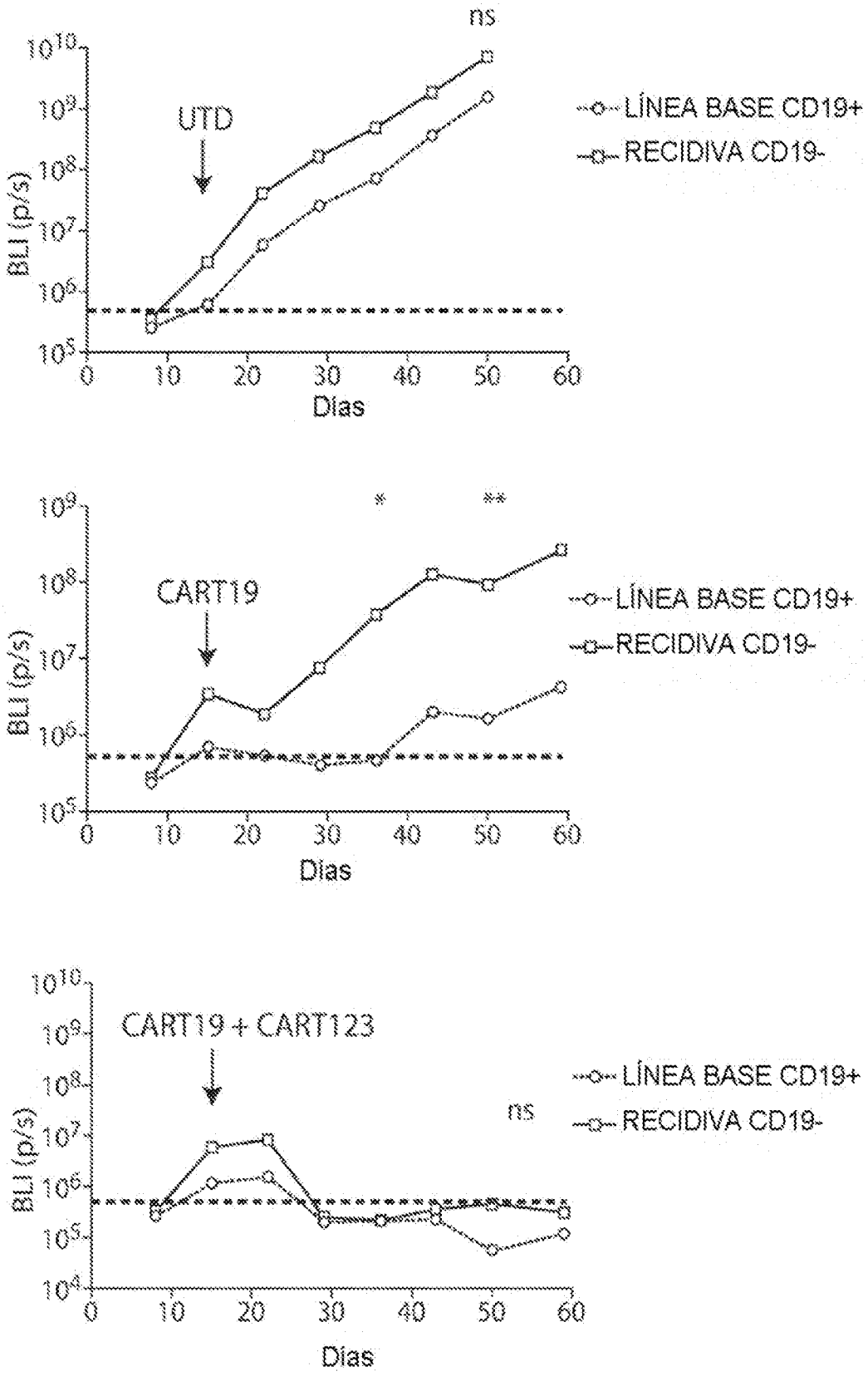

ns
UTD
BLI (p/s)
Días
LÍNEA BASE CD19+
RECIDIVA CD19-
*
**
CART19
BLI (p/s)
Días
LÍNEA BASE CD19+
RECIDIVA CD19-
CART19 + CART123
ns
BLI (p/s)
Días
LÍNEA BASE CD19+
RECIDIVA CD19-

FIG. 54B

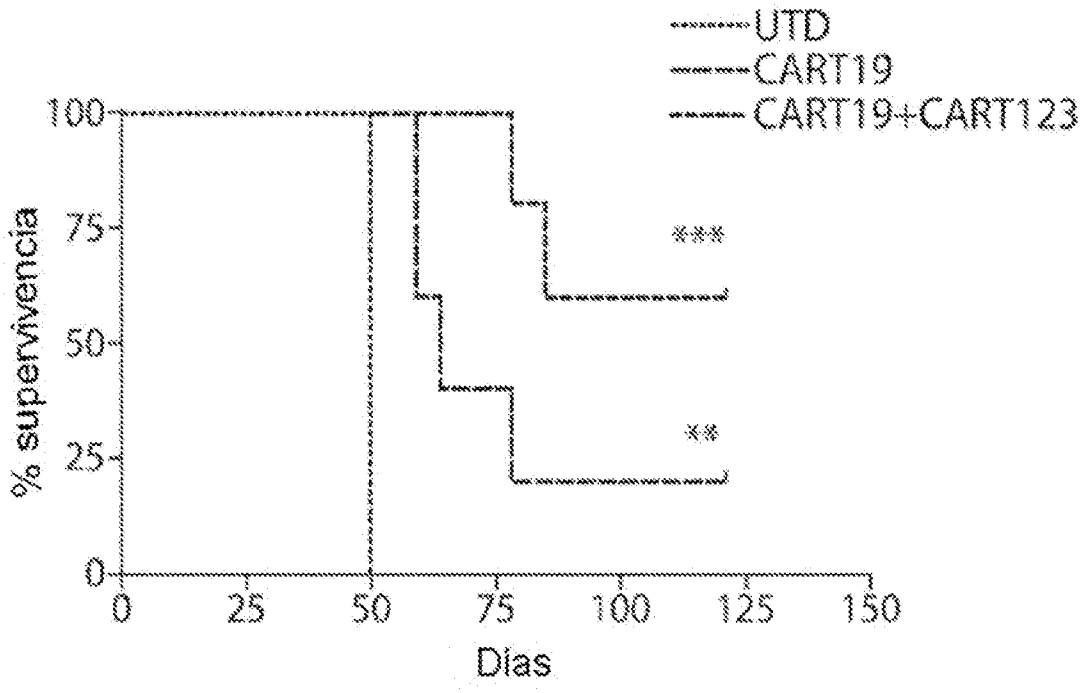

UTD
CART19
CART19+CART123
100
75
50
25
0
% supervivencia
***
**
0
25
50
75
100
125
150
Días

FIG. 54C

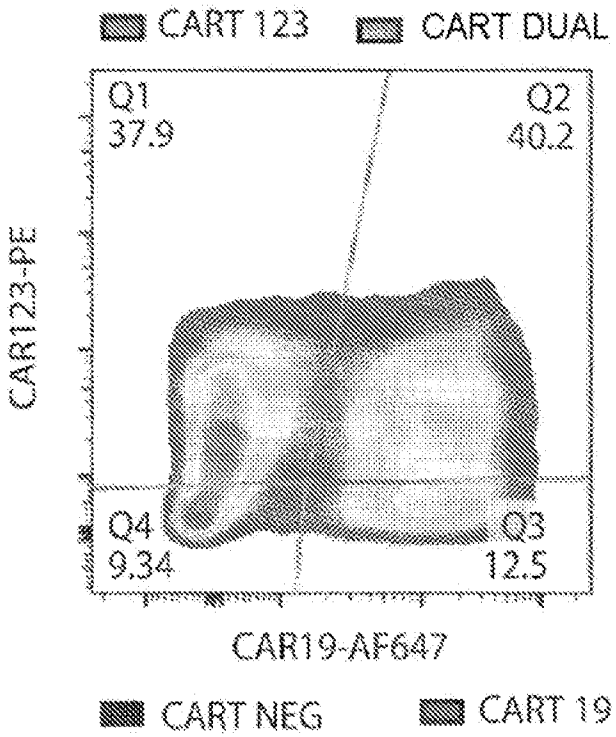


FIG. 55A

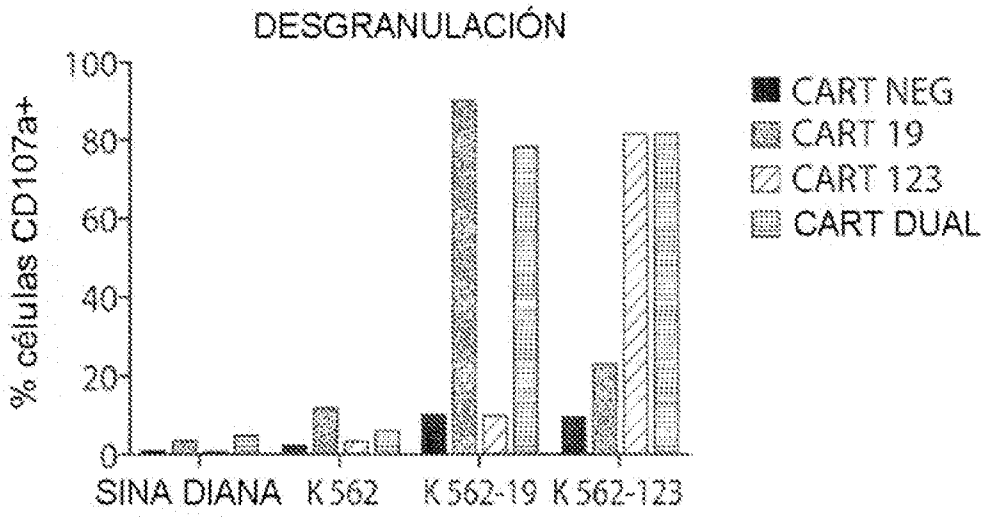


FIG. 55B

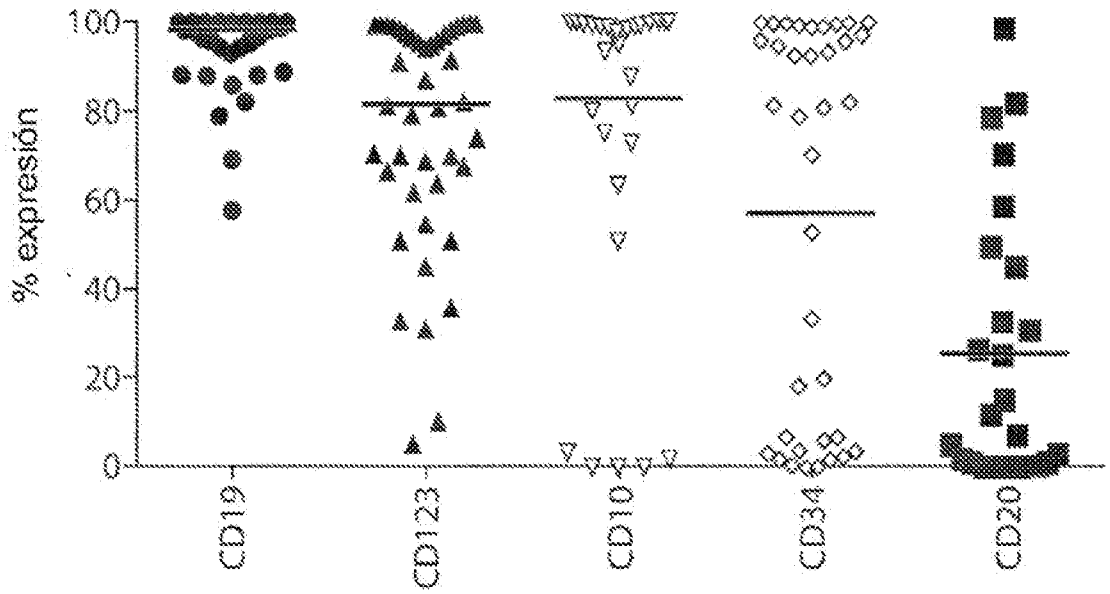
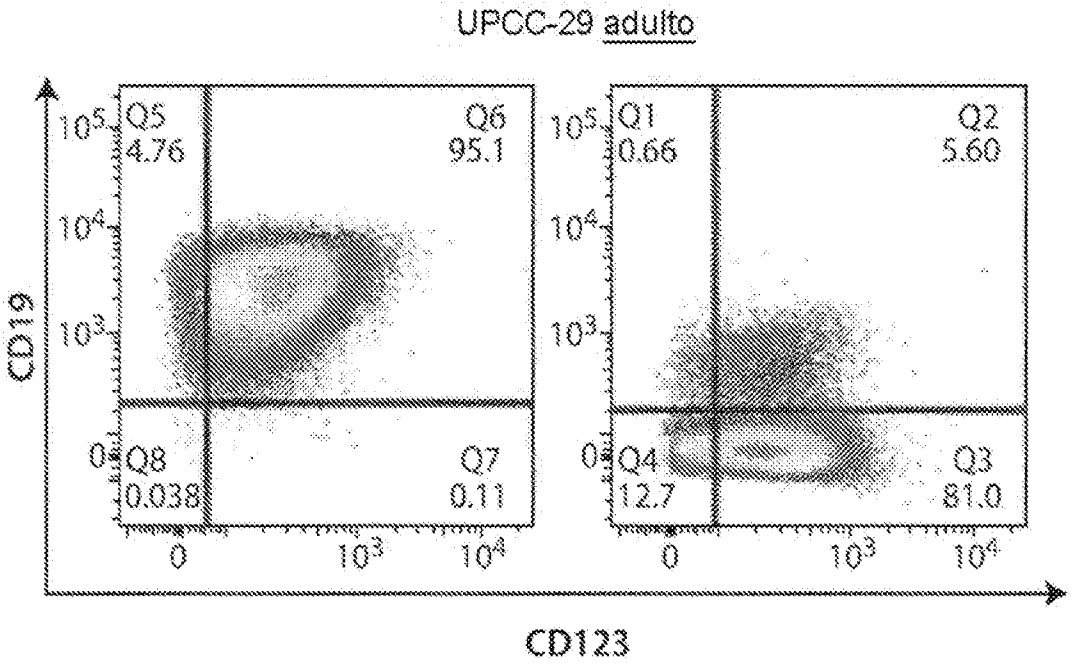


FIG. 56A


UPCC-29 adulto
CD19
CD123
Q5
4.76
Q6
95.1
Q8
0.038
Q7
0.11
Q1
0.66
Q2
5.60
Q4
12.7
Q3
81.0

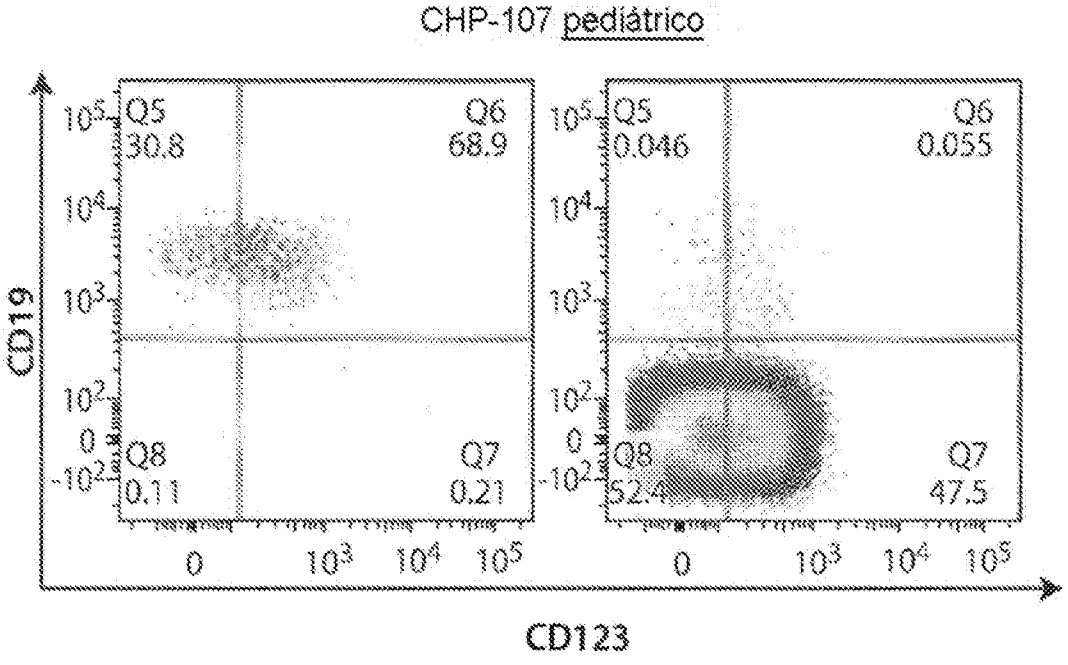

CHP-107 pediátrico
CD19
CD123
Q5
30.8
Q6
68.9
Q8
0.11
Q7
0.21
Q5
0.046
Q6
0.055
Q8
52.4
Q7
47.5

FIG. 56B

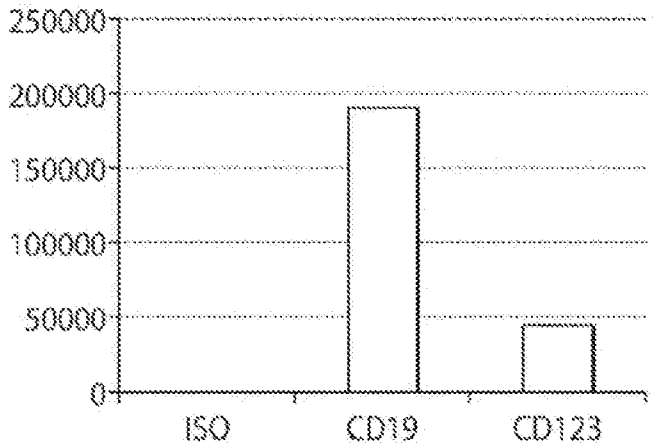


FIG. 57A

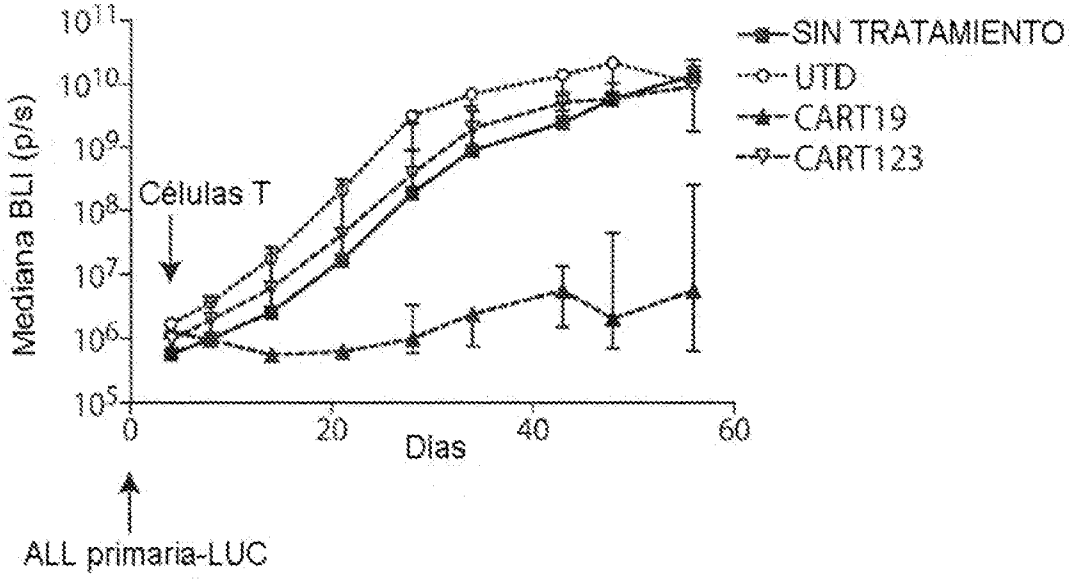


FIG. 57B

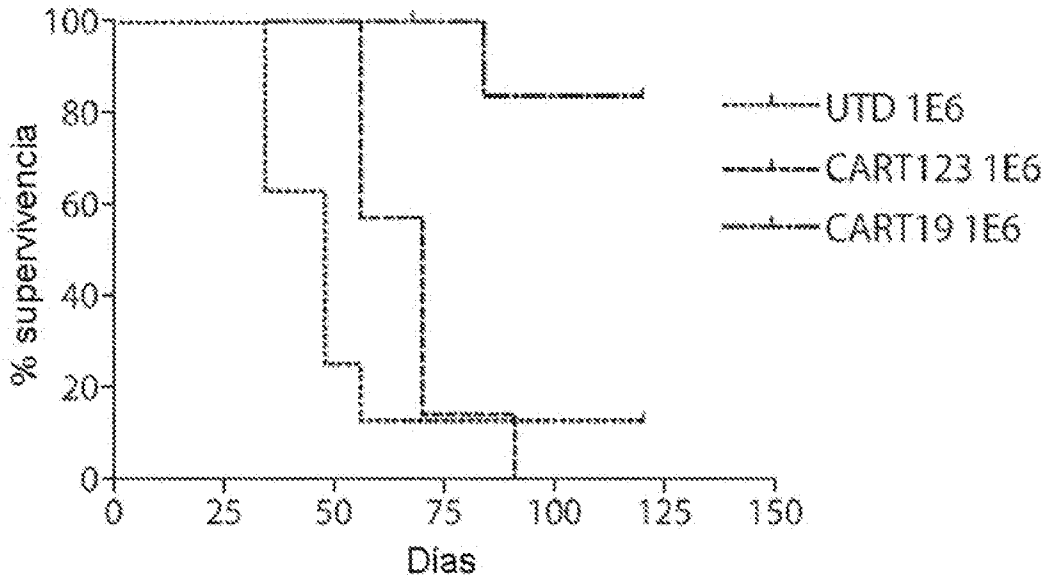


FIG. 57C

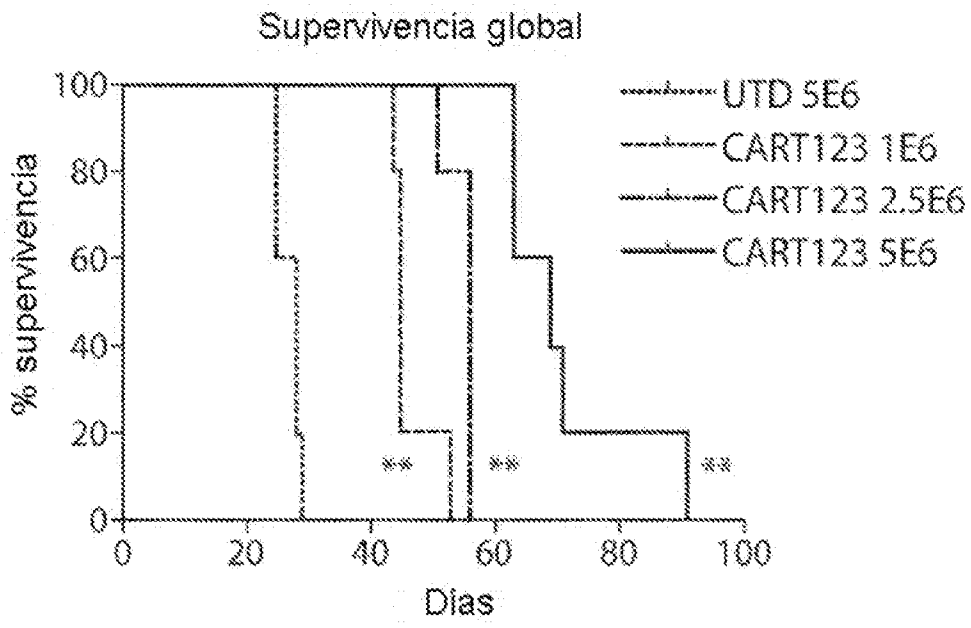


FIG. 57D

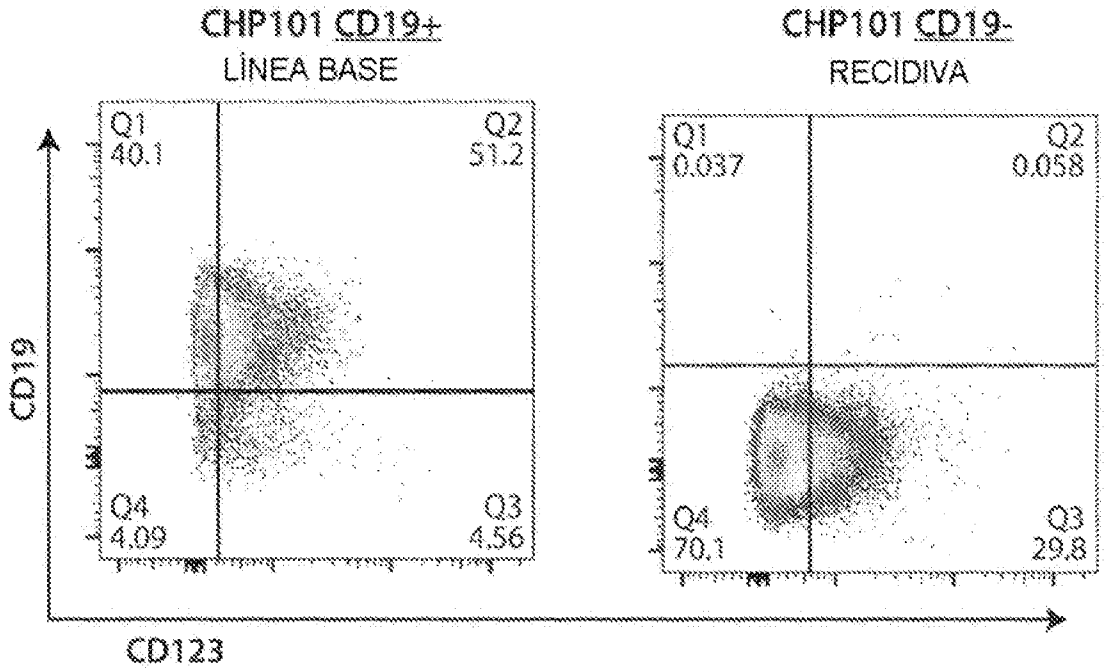

CHP101 CD19+
LÍNEA BASE
Q1
40.1
Q2
51.2
Q4
4.09
Q3
4.56
CHP101 CD19-
RECIDIVA
Q1
0.037
Q2
0.058
Q4
70.1
Q3
29.8
CD19
CD123

FIG. 58A

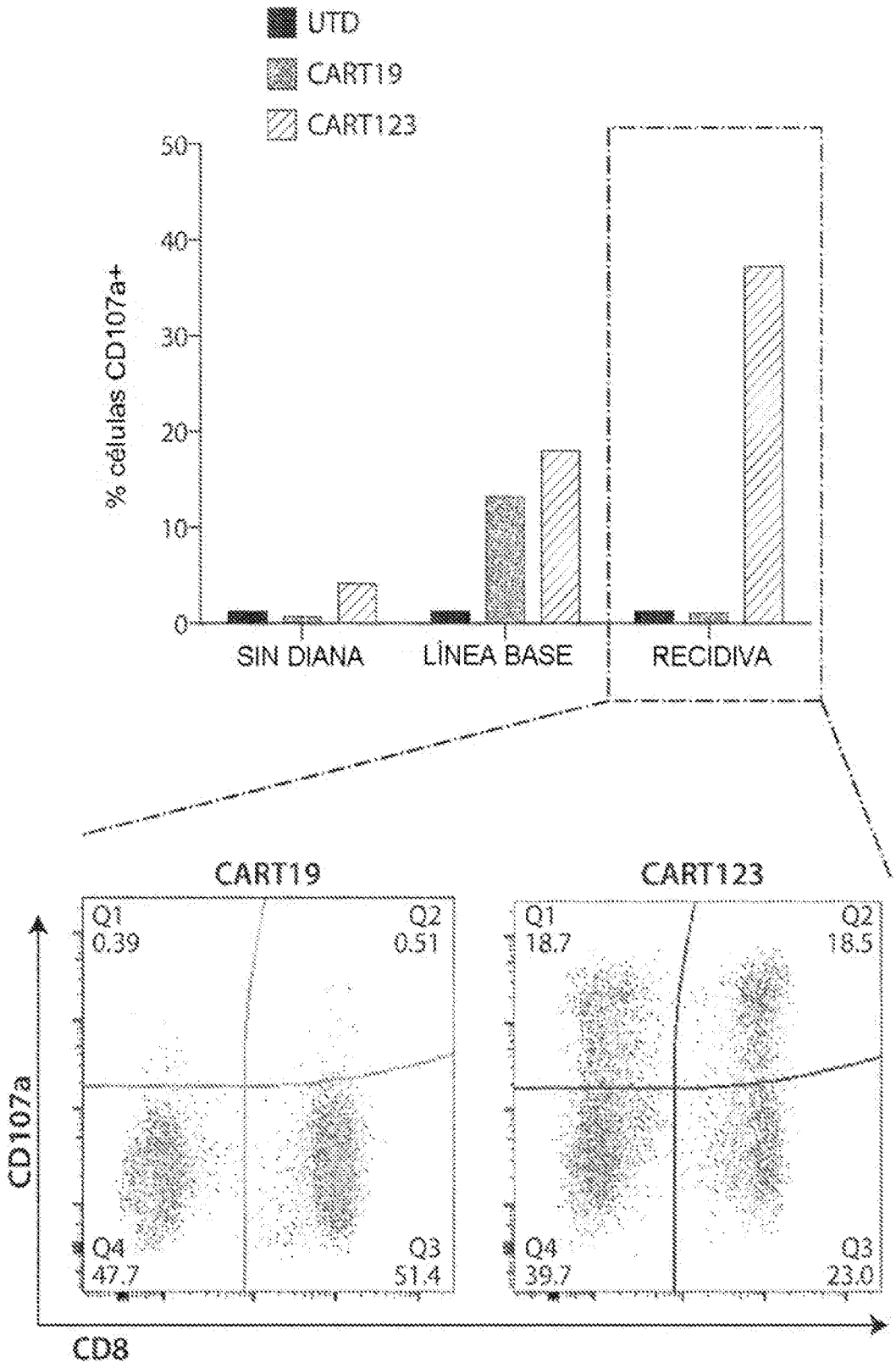

UTD
CART19
CART123
% células CD107a+
50
40
30
20
10
0
SIN DIANA
LÍNEA BASE
RECIDIVA
CART19
CART123
Q1
0.39
Q2
0.51
Q4
47.7
Q3
51.4
Q1
18.7
Q2
18.5
Q4
39.7
Q3
23.0
CD107a
CD8

FIG. 58B

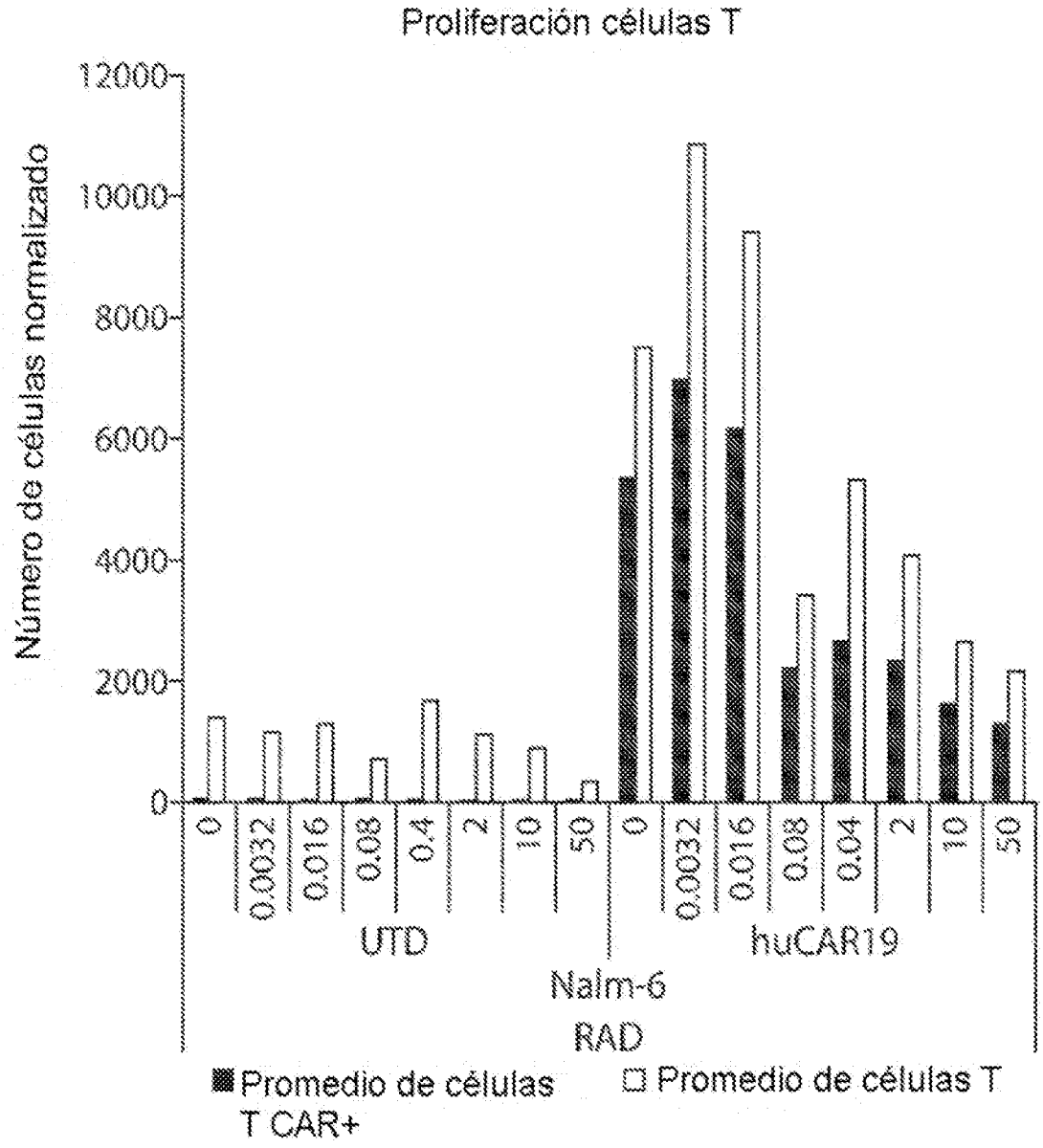

Proliferación células T
Número de células normalizado
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0,0032
0,016
0,08
0,4
2
10
50
0
0,0032
0,016
0,08
0,04
2
10
50
UTD
huCAR19
Nalm-6
RAD
Promedio de células T CAR+
Promedio de células T

FIG. 59

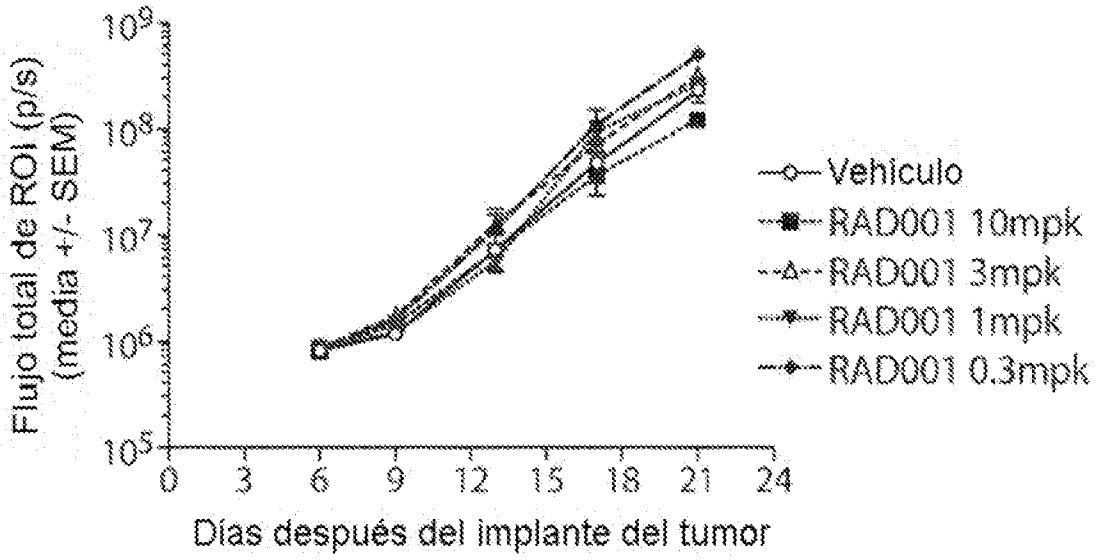

Flujo total de ROI (p/s)
(media +/- SEM)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
3
6
9
12
15
18
21
24
Días después del implante del tumor
Vehiculo
RAD001 10mpk
RAD001 3mpk
RAD001 1mpk
RAD001 0.3mpk

FIG. 60

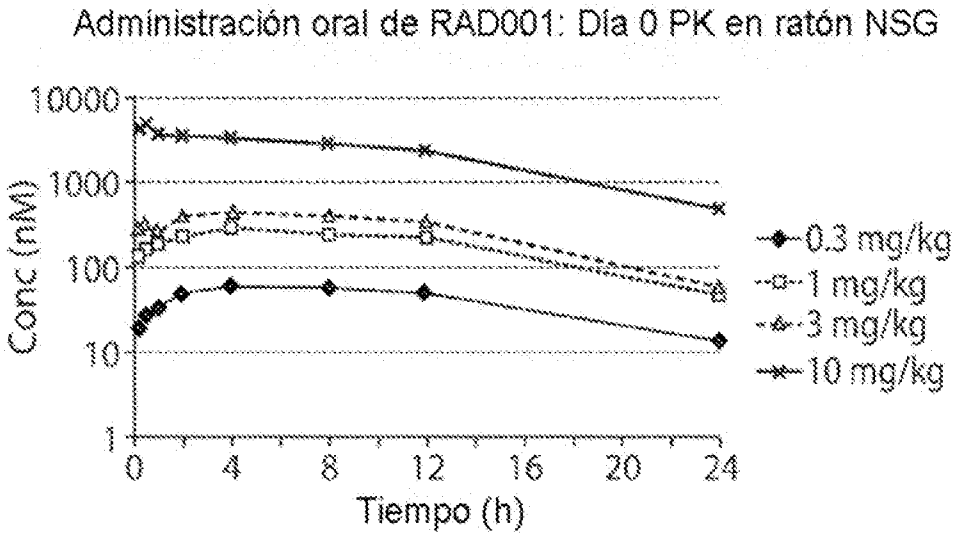


FIG. 61A

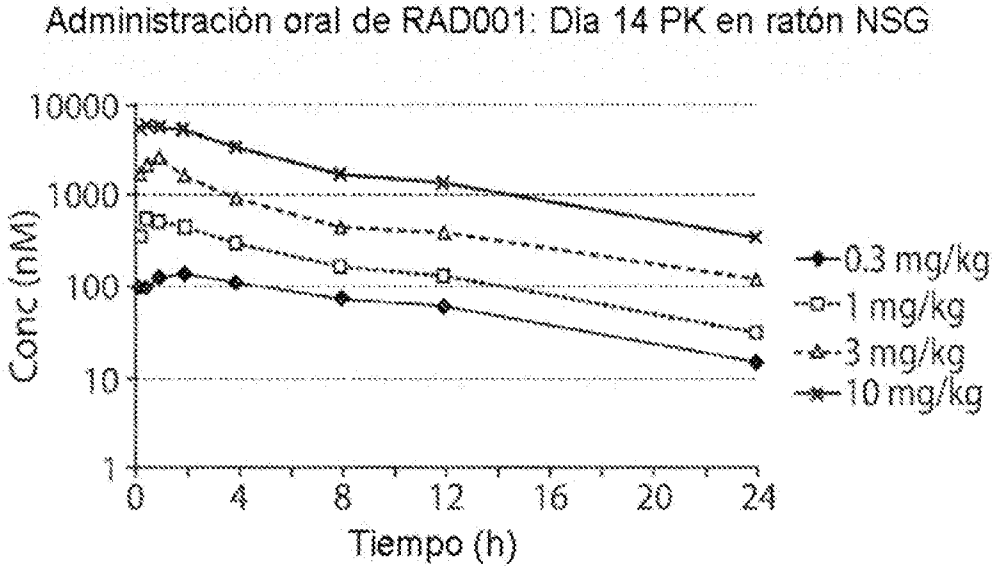


FIG. 61B

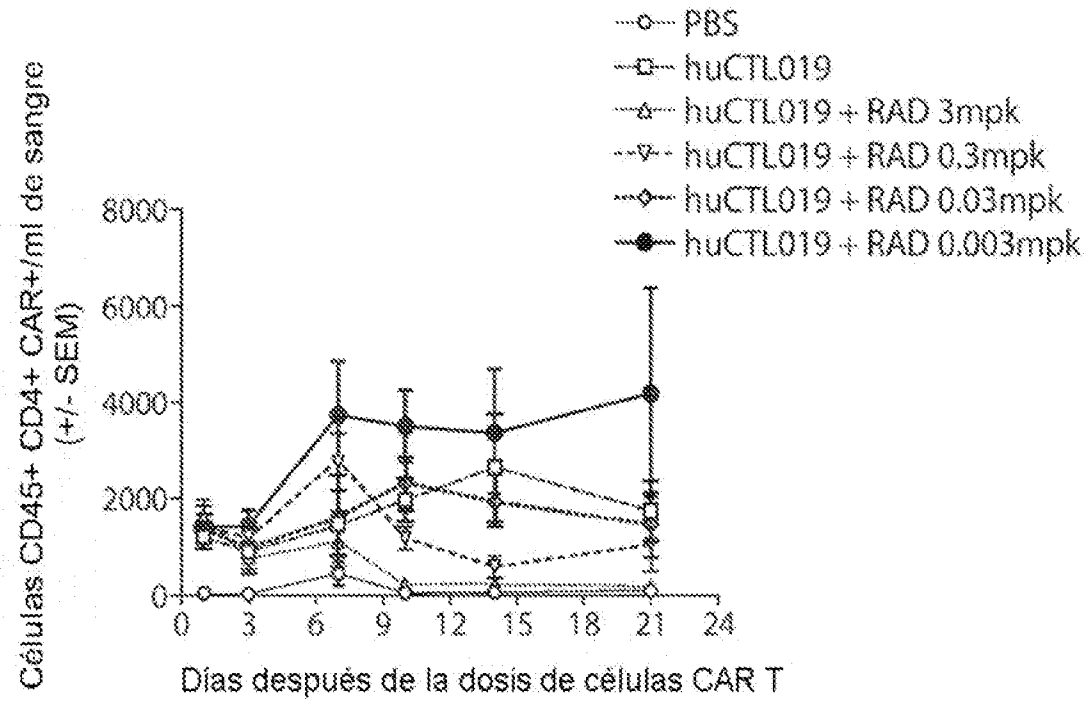


FIG. 62A

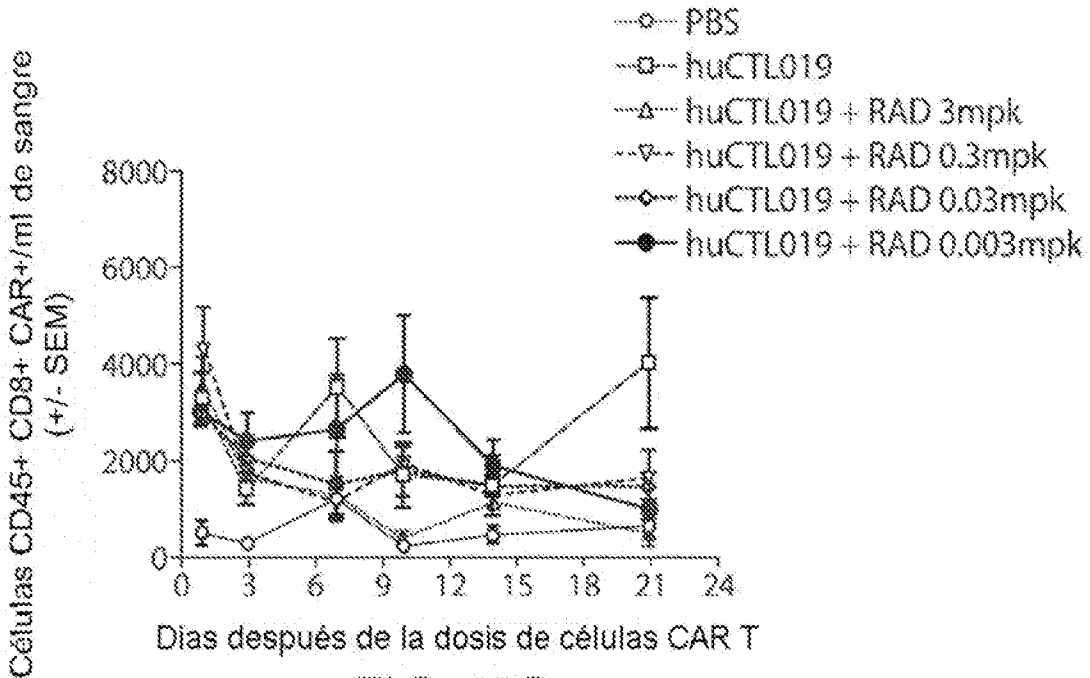


FIG. 62B

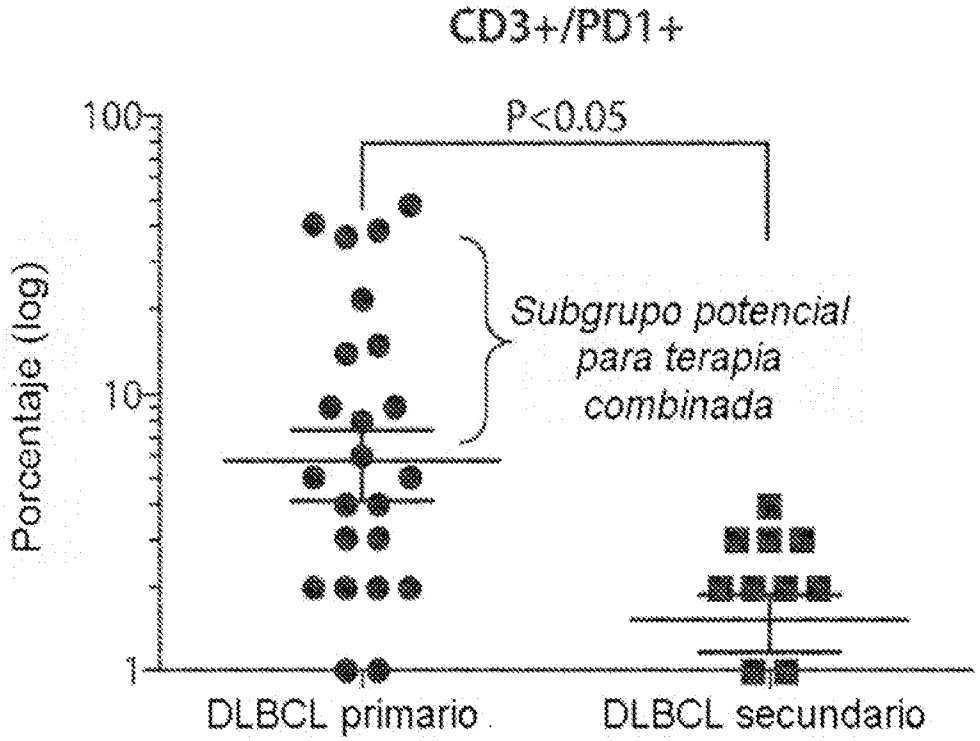

CD3+/PD1+
P<0.05
100
10
1
Porcentaje (log)
Subgrupo potencial para terapia combinada
DLBCL primario
DLBCL secundario

FIG. 63

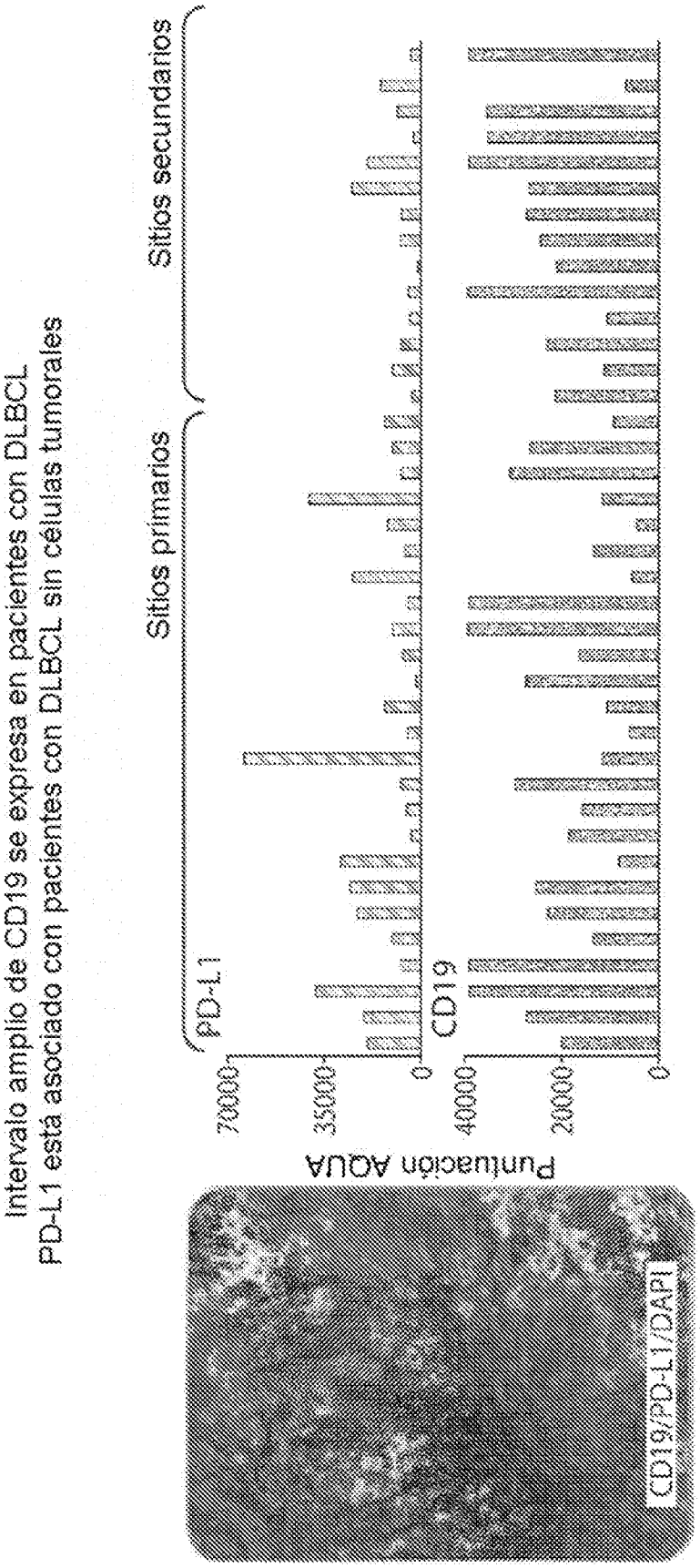

Intervalo amplio de CD19 se expresa en pacientes con DLBCL
PD-L1 está asociado con pacientes con DLBCL sin células tumorales
Sitios primarios
Sitios secundarios
PD-L1
CD19
Puntuación AQUA
70000
35000
0
40000
20000
0
CD19/PD-L1/DAPI

FIG. 64

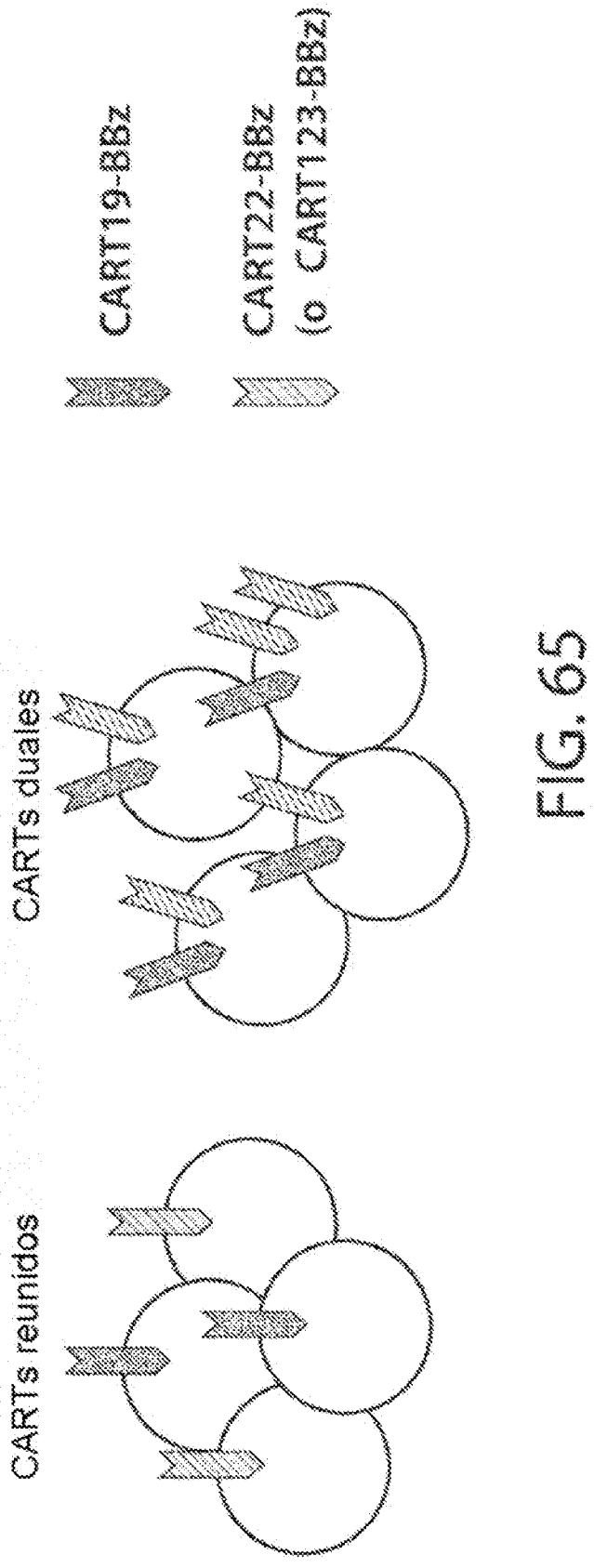

CART19-BBz
CART22-BBz
(o CART123-BBz)
CARTs duales
CARTs reunidos

FIG. 65

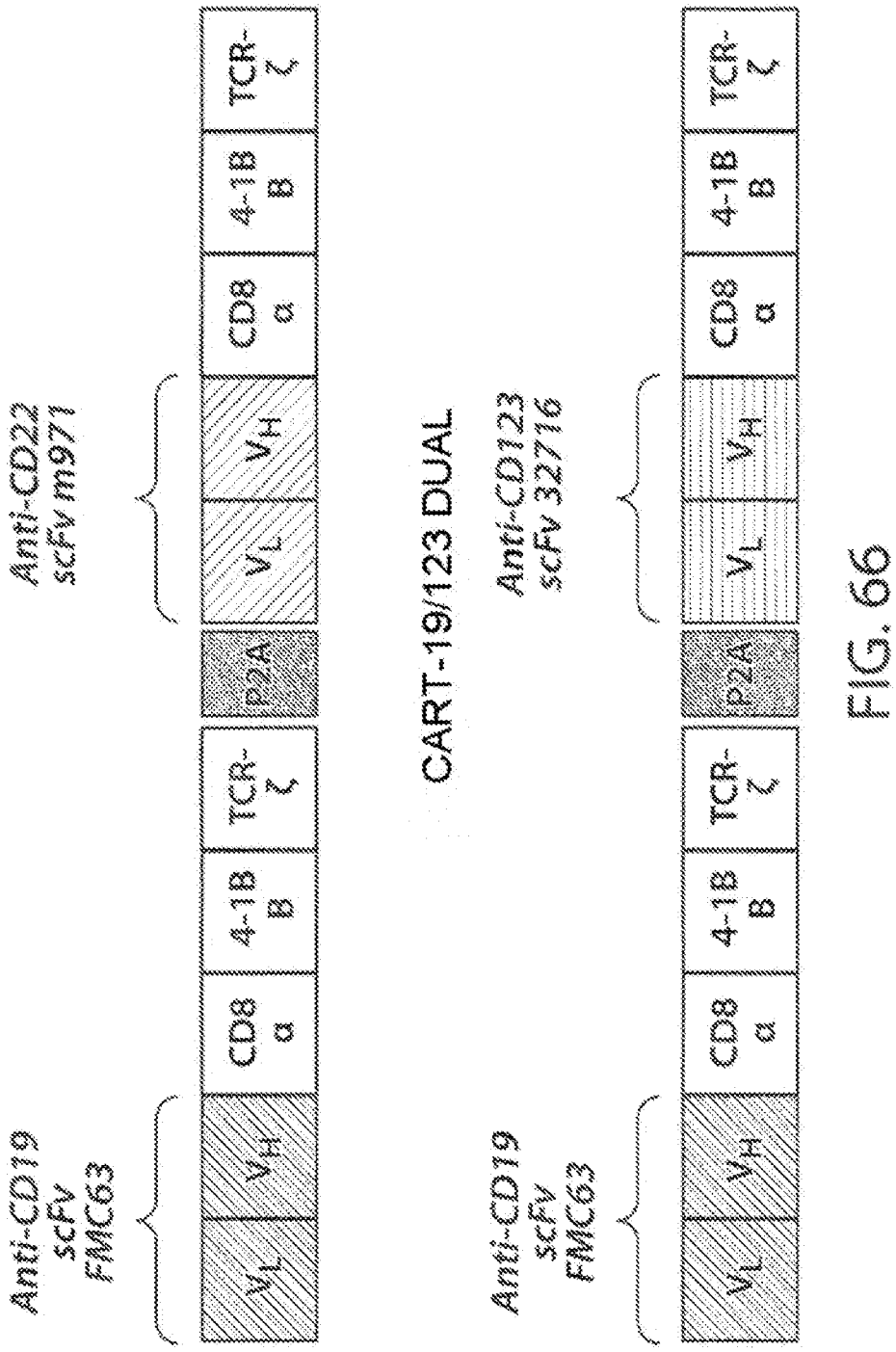

CART-19/22 DUAL
Anti-CD19 scFv FMC63
Anti-CD22 scFv m971
VL
VH
CD8 α
4-1B B
TCR-ζ
P2A
CART-19/123 DUAL
Anti-CD19 scFv FMC63
Anti-CD123 scFv 32716

FIG. 66

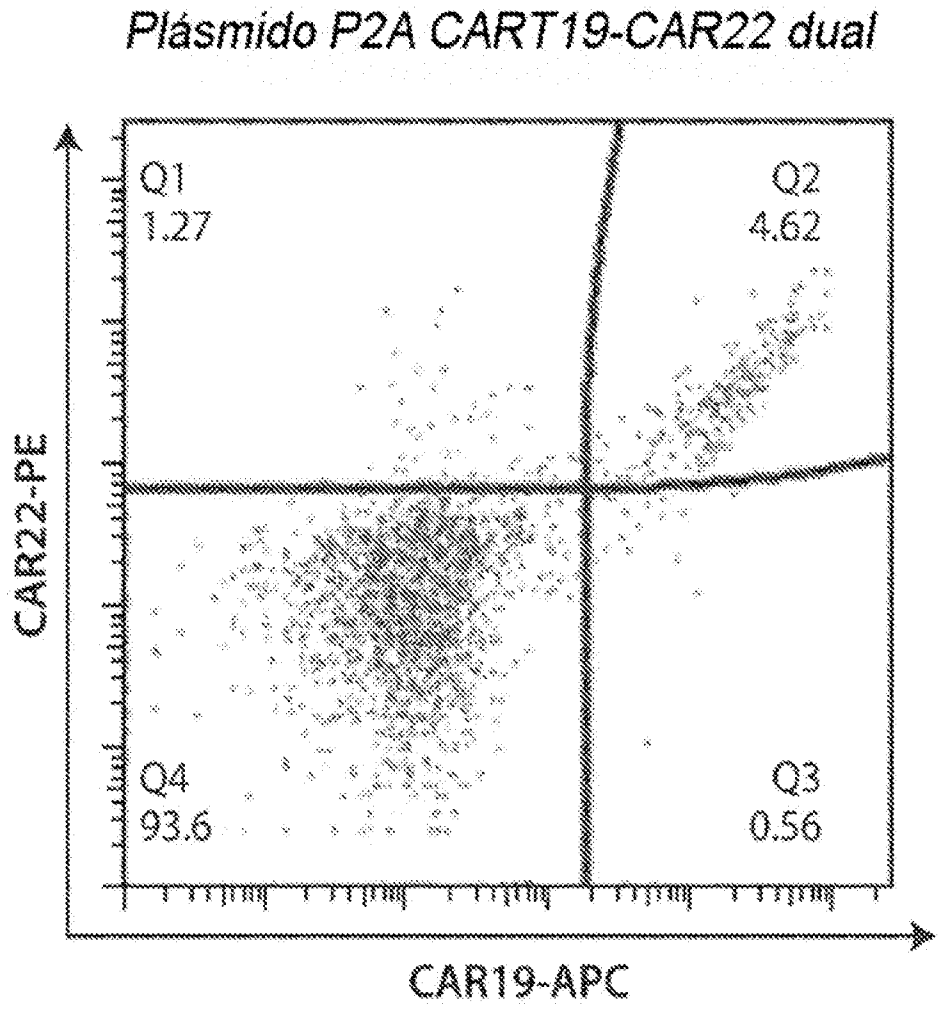

Plásmido P2A CART19-CAR22 dual
Q1
1.27
Q2
4.62
Q4
93.6
Q3
0.56
CAR22-PE
CAR19-APC

FIG. 67

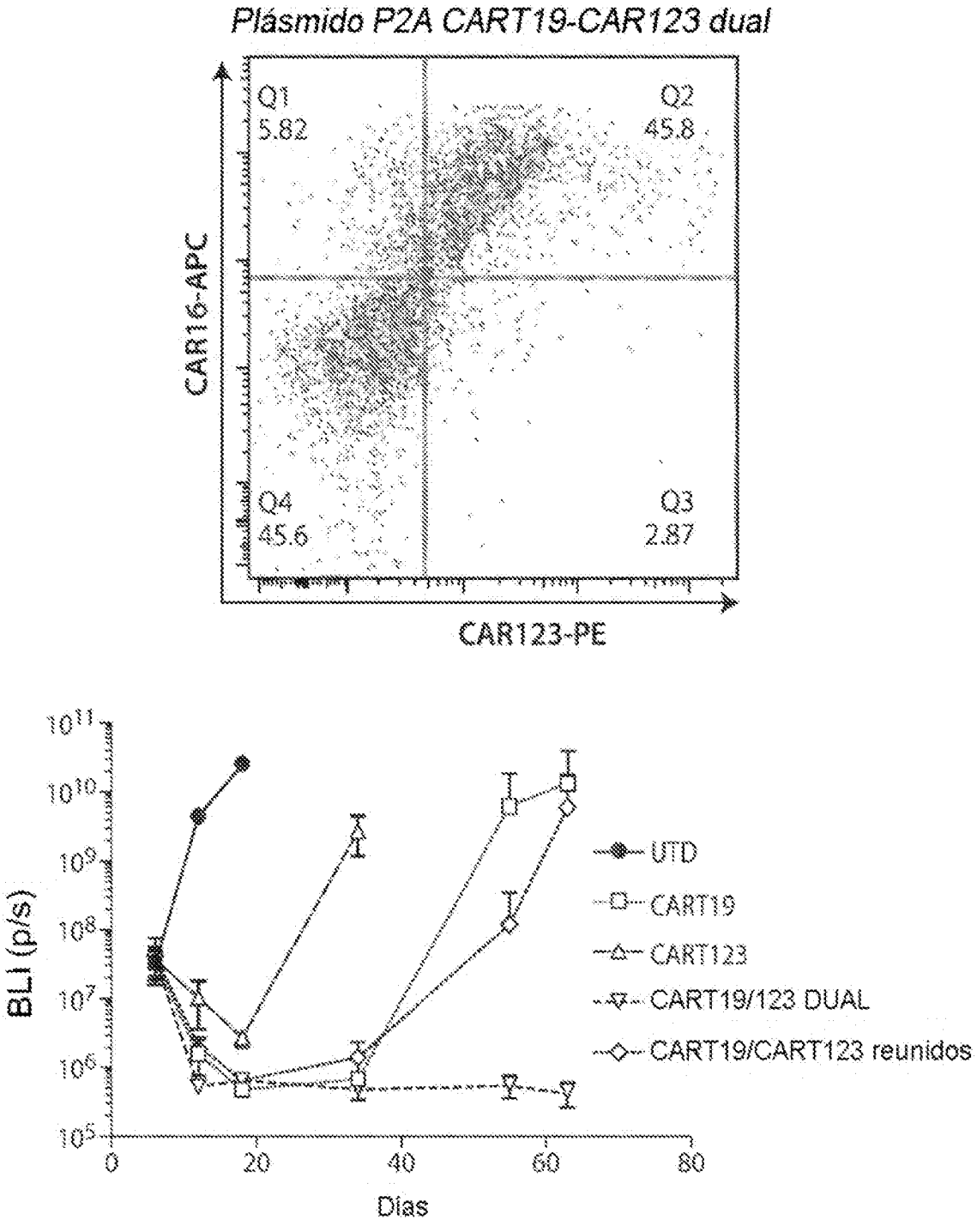

Plásmido P2A CART19-CAR123 dual
Q1
5.82
Q2
45.8
Q4
45.6
Q3
2.87
CAR16-APC
CAR123-PE
BLI (p/s)
Días
UTD
CART19
CART123
CART19/123 DUAL
CART19/CART123 reunidos

FIG. 68

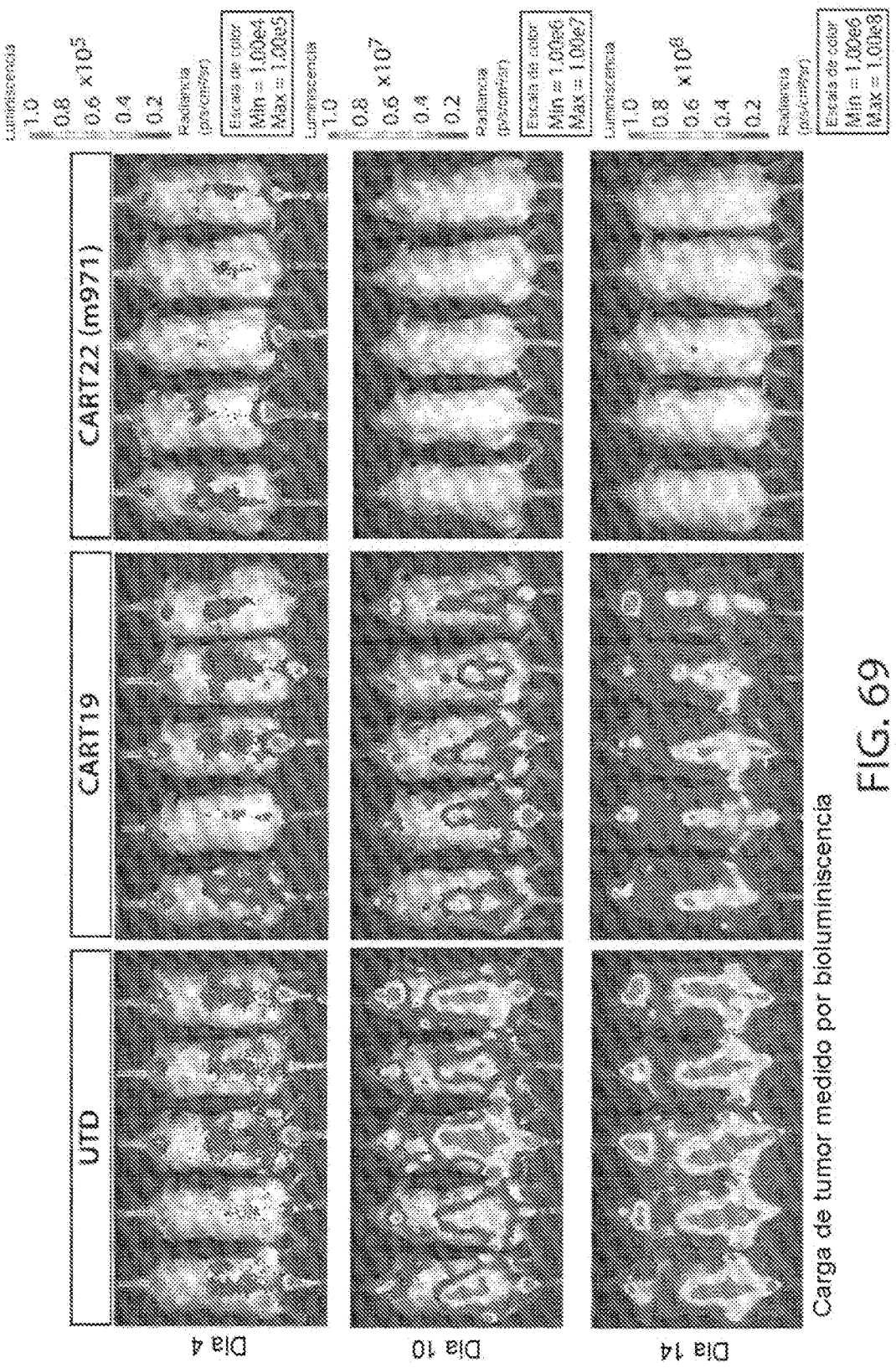

UTD
CART19
CART22 (m971)
Día 4
Día 10
Día 14
Luminiscencia
Radiancia (p/s/cm²/sr)
Escala de color
Min = 1.00e4
Max = 1.00e5
Min = 1.00e6
Max = 1.00e7
Min = 1.00e6
Max = 1.00e8
Carga de tumor medido por bioluminiscencia

FIG. 69

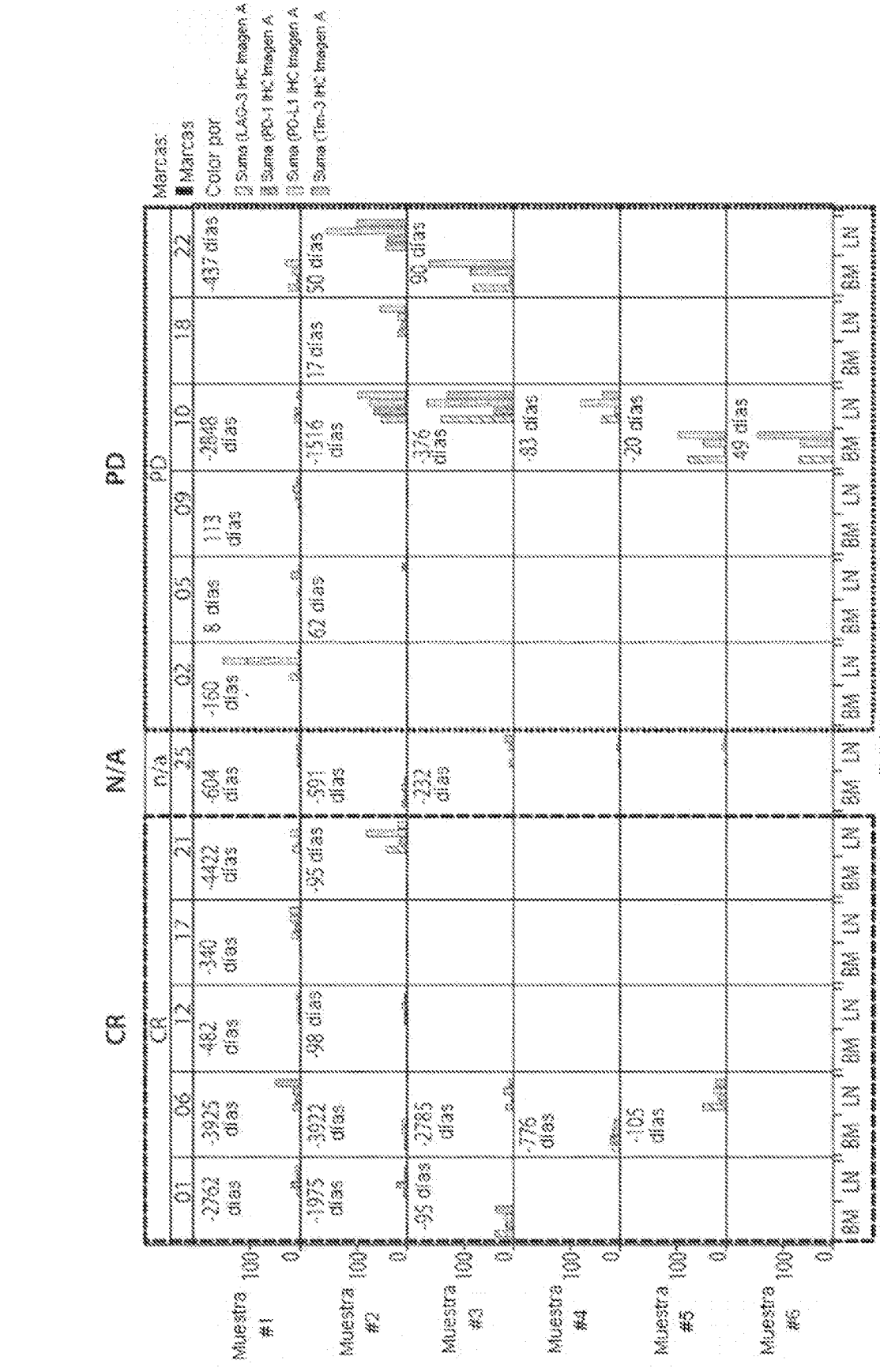

CR
N/A
PD
Marcas:
Marcas
Color por
Suma (LAG-3 IHC Imagen A
Suma (PD-1 IHC Imagen A
Suma (PD-L1 IHC Imagen A
Suma (Tim-3 IHC Imagen A
Muestra #1
Muestra #2
Muestra #3
Muestra #4
Muestra #5
Muestra #6
Tejido
BM
LN

FIG. 70

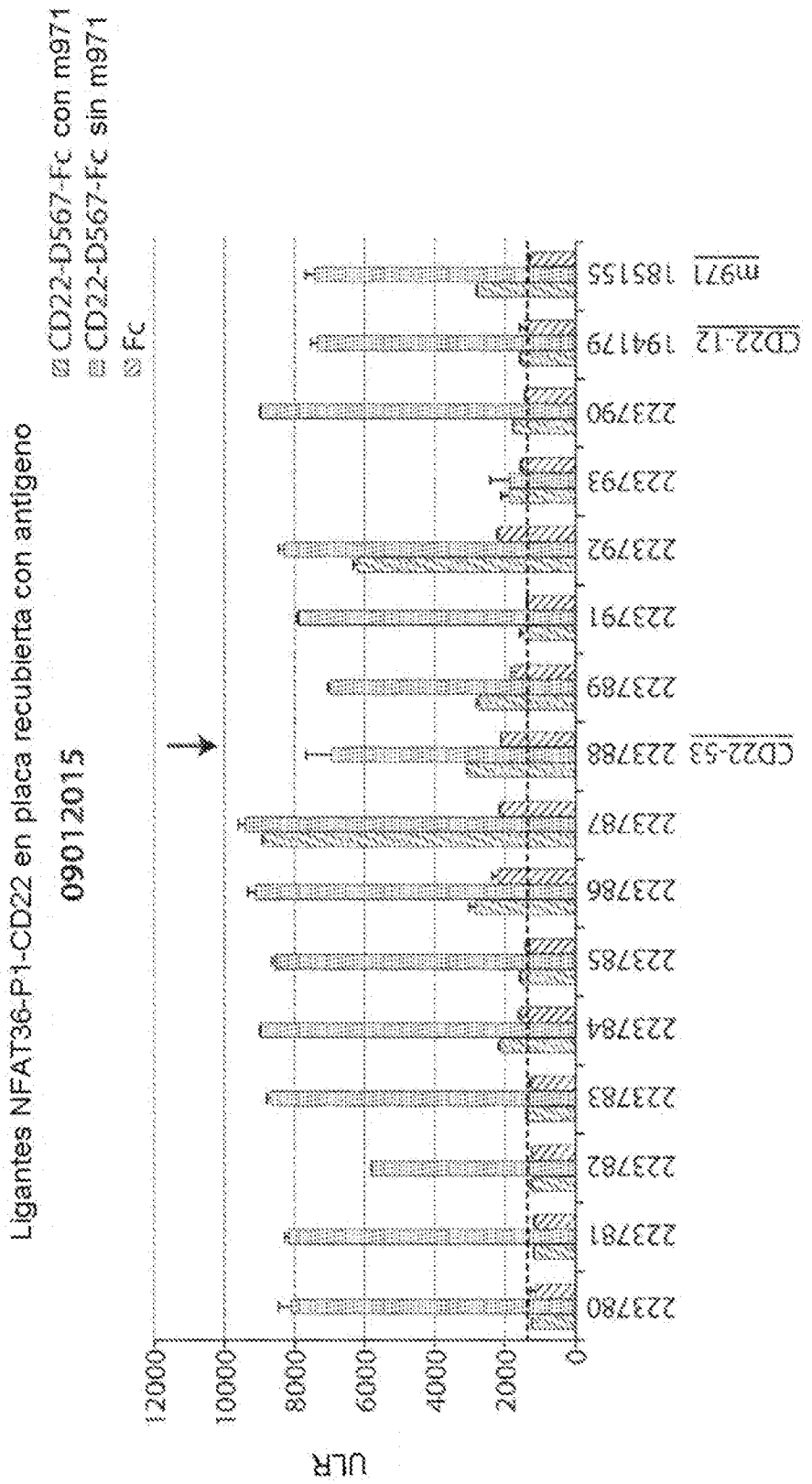

Ligantes NFAT36-P1-CD22 en placa recubierta con antigeno
09012015
CD22-D567-Fc con m971
CD22-D567-Fc sin m971
Fc
ULR
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
223780
223781
223782
223783
223784
223785
223786
223787
223788
223789
223791
223792
223793
223790
194179
185155
CD22-53
CD22-12
m971

FIG. 71

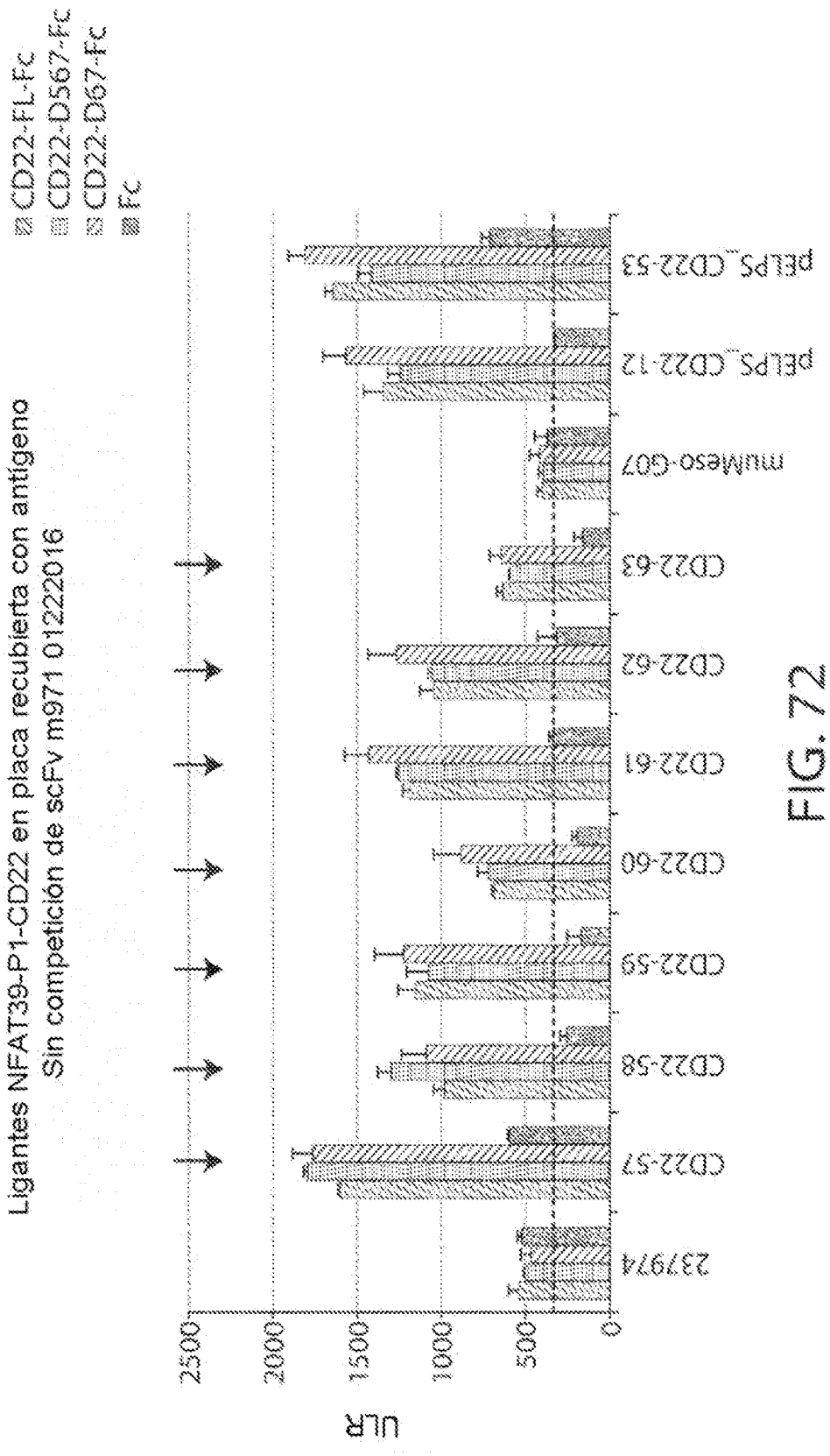

Ligantes NFAT39-P1-CD22 en placa recubierta con antígeno
Sin competición de scFv m971 01222016
CD22-FL-Fc
CD22-D567-Fc
CD22-D67-Fc
Fc
ULR
2500
2000
1500
1000
500
0
237974
CD22-57
CD22-58
CD22-59
CD22-60
CD22-61
CD22-62
CD22-63
muMeso-G07
pELPS_CD22-12
pELPS_CD22-53

FIG. 72

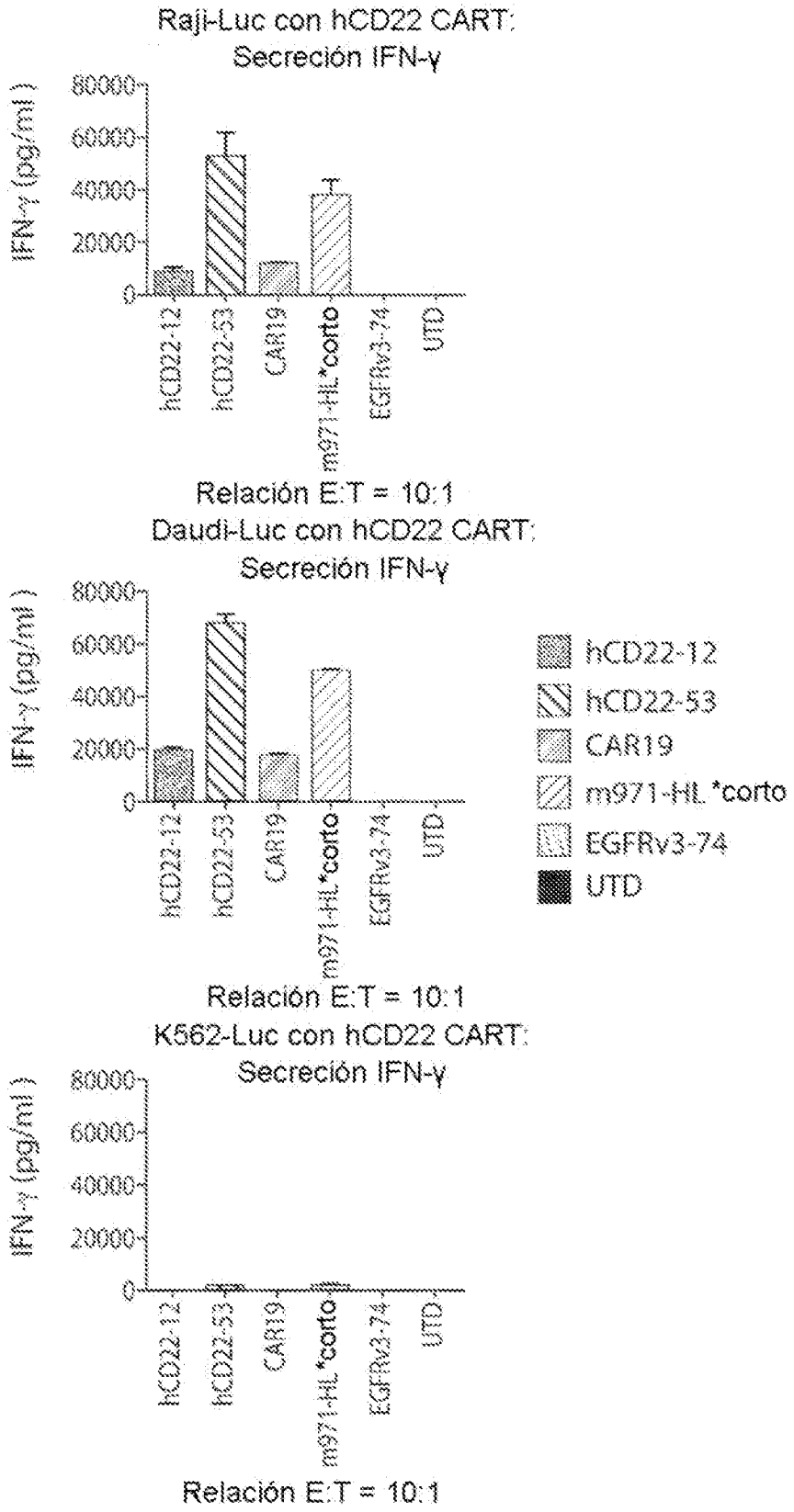

Raji-Luc con hCD22 CART:
Secreción IFN-γ
IFN-γ (pg/ml)
80000
60000
40000
20000
0
hCD22-12
hCD22-53
CAR19
m971-HL*corto
EGFRv3-74
UTD
Relación E:T = 10:1
Daudi-Luc con hCD22 CART:
Secreción IFN-γ
IFN-γ (pg/ml)
80000
60000
40000
20000
0
hCD22-12
hCD22-53
CAR19
m971-HL*corto
EGFRv3-74
UTD
Relación E:T = 10:1
K562-Luc con hCD22 CART:
Secreción IFN-γ
IFN-γ (pg/ml)
80000
60000
40000
20000
0
hCD22-12
hCD22-53
CAR19
m971-HL*corto
EGFRv3-74
UTD
Relación E:T = 10:1

FIG. 73

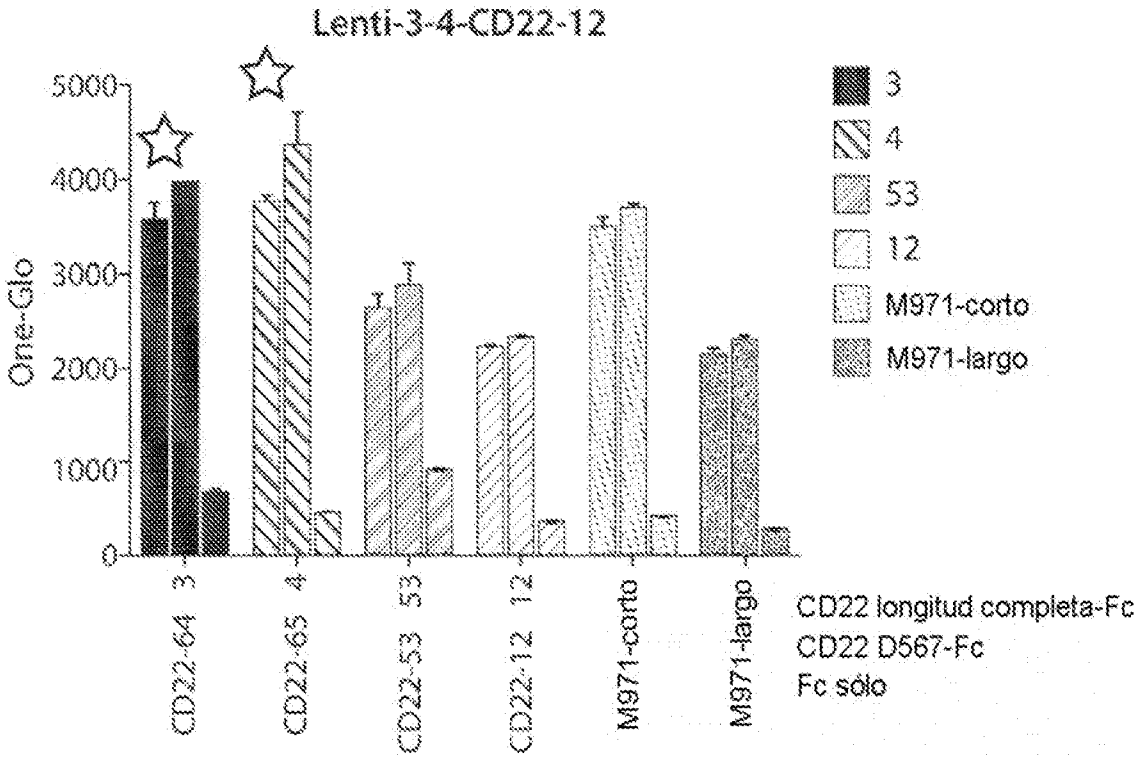

Lenti-3-4-CD22-12
One-Glo
5000
4000
3000
2000
1000
0
3
4
53
12
M971-corto
M971-largo
CD22-64 3
CD22-65 4
CD22-53 53
CD22-12 12
M971-corto
M971-largo
CD22 longitud completa-Fc
CD22 D567-Fc
Fc sólo

FIG. 74

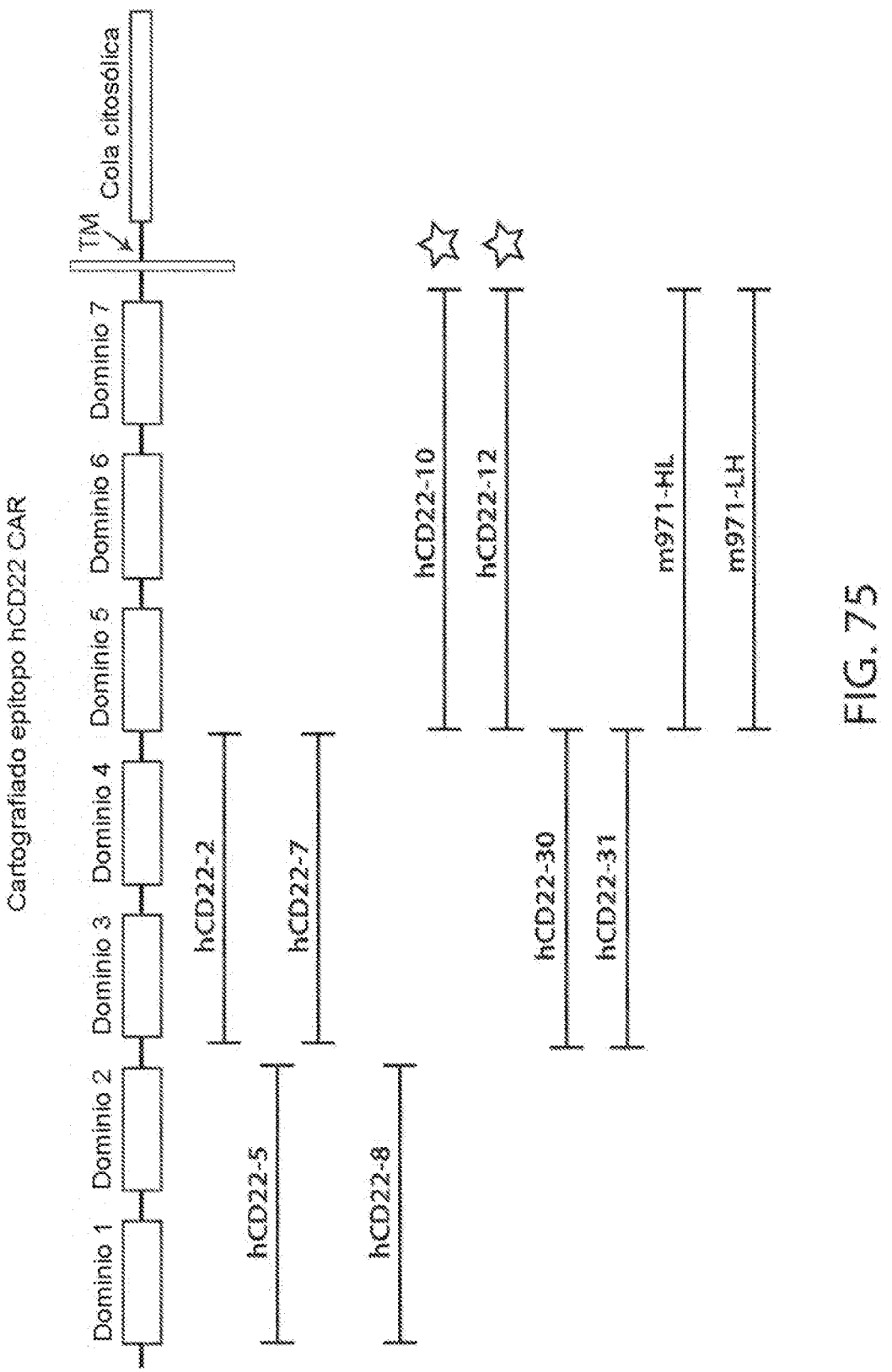

Cartografiado epítopo hCD22 CAR
Dominio 1
Dominio 2
Dominio 3
Dominio 4
Dominio 5
Dominio 6
Dominio 7
TM
Cola citosólica
hCD22-2
hCD22-7
hCD22-5
hCD22-8
hCD22-10
hCD22-12
hCD22-30
hCD22-31
m971-HL
m971-LH

FIG. 75