



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 958 849**

⑮ Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 14/725** (2006.01)  
**C12N 5/0783** (2010.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2018** PCT/US2018/056011

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2019** WO19079249

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2018** E 18867942 (7)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023** EP 3697426

⑭ Título: **Composiciones y métodos para tratar el cáncer con inmunoterapia anti-CD22**

⑩ Prioridad:

**16.10.2017 US 201762572926 P**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.02.2024**

⑬ Titular/es:

**LENTIGEN TECHNOLOGY, INC. (50.0%)**  
910 Clopper Road, Suite 200 South Building  
Gaithersburg, MD 20878, US y  
THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE  
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND  
HUMAN SERVICES (50.0%)

⑫ Inventor/es:

**ORENTAS, RIMAS J.;**  
**SCHNEIDER, DINA;**  
**DROPULIC, BORO;**  
**DIMITROV, DIMITER S. y**  
**ZHU, ZHONGYU**

⑭ Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

### Observaciones:

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

**ES 2 958 849 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para tratar el cáncer con inmunoterapia anti-CD22

5 **CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN**

Esta solicitud se refiere al campo del cáncer, particularmente a los dominios de unión al antígeno CD22, y a los receptores de antígeno químicos (CAR) que contienen dichos dominios de unión al antígeno CD22, y a sus métodos de uso.

10 **ANTECEDENTES**

El cáncer es una de las amenazas más mortales para la salud humana. Sólo en Estados Unidos, el cáncer afecta a casi 1,3 millones de nuevos pacientes cada año, y es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares, representando aproximadamente 1 de cada 4 muertes. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de esas muertes. Aunque ha habido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos cánceres, la tasa de supervivencia general a 5 años para todos los cánceres ha mejorado sólo alrededor 10% en los últimos 20 años. Los cánceres, o tumores malignos, metastatizan y crecen rápidamente de manera descontrolada, lo que hace que el tratamiento sea extremadamente difícil.

20 El estándar actual de atención para las leucemias de linaje B puede consistir en un tratamiento de inducción de la remisión mediante dosis altas de quimioterapia o radiación, seguido de consolidación, y puede incluir trasplante de células madre y ciclos adicionales de quimioterapia según sea necesario (véase la red mundial en cancer.gov). La alta toxicidad asociada a estos tratamientos, así como el riesgo de complicaciones, tales como recaída, malignidad secundaria, o enfermedad de injerto contra hospedante (EICH), motivan la búsqueda de mejores alternativas terapéuticas. CD22, también conocida como SIGLEC-2 (lectina-2 similar a inmunoglobulina de unión a ácido siálico), es una glicoproteína de superficie transmembrana de 95 kDa, y contiene 6 dominios tipo C2 similares a Ig y un dominio tipo V similar a Ig (uniprot.org/ uniprot/P20273#structure, consultado el 12/07/2017). Durante la ontogenia de las células B, CD22 se expresa en la superficie de las células B comenzando en la etapa de células pre-B, persiste en las células B maduras, y se pierde en las células plasmáticas (Nitschke L, 2009, Immunological Reviews, 230:128-143). CD22 contiene dominios ITIM (motivos de inhibición basados en tirosina de inmunorreceptor) intracelulares que, tras la participación del receptor de células B para el antígeno, sirven para modular negativamente la activación celular. La unión de CD22 al anticuerpo induce la colocalización con SHP-1, y la fosfatasa intracelular que también sirve para modular negativamente la transducción de señales basada en la fosforilación (Lumb S, Fleischcer SJ, Wiedemann A, Daridon C, Maloney A, Shock A, Domer T, 2016, Journal of Cell Communication and Signaling, 10:143-151). El punto clave de relevancia para el tratamiento de las neoplasias malignas de células B es que CD22 se expresa de manera estrechamente regulada en células B normales, pero no se expresa en células madre hematopoyéticas, o células plasmáticas maduras, lo que lo convierte en un antígeno diana adecuado para las leucemias de células B. La expresión de CD22 en neoplasias malignas de células B tanto adultas como pediátricas (pre-B-LLA) ha llevado a explotar esta diana para la terapia basada en anticuerpos y en células T con receptor de antígeno químico (CAR) (Hasso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, FitzGerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ, 2013, Blood, 121:1165-1174) (Wayne AS, Kreitman RJ, Findley HW, Lew G, Delbrook C, Steinberg SM, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I, 2010, Clinical Cancer Research, 16:1894-1903).

45 Se han desarrollado varios enfoques novedosos para tratar la leucemia y el linfoma de células B, incluidos anticuerpos anti-CD22 vinculados a toxinas bacterianas o agentes hemoterapéuticos (Wayne AS, FitzGerald DJ, Kreitman RJ, Pastan I, 2014, Immunotoxins for leukemia, Blood, 123:2470-2477). Inotuzumab Ozogamicina (CMC-544, una versión humanizada del anticuerpo monoclonal murino G5/44) es un conjugado de fármaco-anticuerpo, y actualmente se está evaluando en ensayos clínicos, ya sea como agente único o administrado en combinación con quimioterapia (NCT01664910, patrocinador: M.D. Anderson Cancer Center) (DiJoseph JF, et al., 2004, Blood, 103:1807-1814). Como agente único, los resultados superaron los observados con la terapia estándar, aunque se observó una toxicidad hepática significativa (Kantarjian H, et al., 2016, Inotuzumab ozogamicin versus standard therapy for acute lymphoblastic leukemia (ALL), New England Journal of Medicine, 375:740-753). El anticuerpo terapéutico CD22 no modificado, Epratuzumab, también se está probando en combinación con quimioterapia (NCT01219816, patrocinador: Nantes 55 University Hospital). Epratuzumab es una proteína química compuesta de CDR murinas injertadas en una estructura de anticuerpo humano. Aunque es eficaz en algunas leucemias, Moxetumomab pasudotox no se encuentra en un desarrollo clínico amplio debido a problemas tanto con la inmunogenicidad de la toxina bacteriana a la que se fusiona el anticuerpo como con niveles modestos o comparables de actividad con otros agentes (véase NCT01829711, patrocinador: MedImmune, LLC). Hasta la fecha, muchos de los restos de unión para CD22 empleados en constructos de CAR utilizan un dominio derivado de estos anticuerpos murinos y no activan eficazmente las células T que se dirigen contra este dominio de CD22 (tal como el aglutinante HA22 anti-CD22 usado como base para Moxetumomab pasudotox, véase James SE, Greenberg PD, Jensen MC, Lin Y, Wang J, Till BG, Raubitschek AA, Forman SJ, Press OW, 2008, Journal of Immunology 180:7028-7038). Un aglutinante anti-CD22 que es eficaz como CAR anti-CD22 se encuentra actualmente en ensayo clínico en los National Institutes of Health (NIH), aunque los resultados no se han publicado (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT02315612, Anti-CD22 Chimeric Receptor T Cells in Pediatric and Young Adults with Recurrent or Refractory CD22-expressing B Cell Malignancies, patrocinador: NCI). Este aglutinante

se basa en el anticuerpo completamente humano m971 desarrollado en el laboratorio de uno de los inventores de esta solicitud, el Dr. Dimiter Dimitrov (Xiao X, Ho M, Zhu Z, Pastan I, Dimitrov D, 2009, Identification and characterization of fully human anti-CD22 monoclonal antibodies, MABS, 1:297-303). Se demostró que el dominio m971 es eficaz como CAR en un trabajo supervisado por otro de los inventores de esta solicitud, el Dr. Rimas Orentas (Haso W, et al., 2013, 5 Anti-CD22-CARs targeting B-cell precursor ALL, Blood, 121:1165-1174).

Los receptores de antígeno quiméricos (CAR) son moléculas híbridas que comprenden tres unidades esenciales: (1) un motivo de unión a antígeno extracelular, (2) motivos de enlace/transmembrana, y (3) motivos de señalización de células T intracelulares (Long AH, Haso WM, Orentas RJ. Lessons learned from a highly-active CD22-specific CAR. 10 Oncoimmunology. 2013; 2 (4):e23621). El motivo de unión al antígeno de un CAR se forma comúnmente a partir de un fragmento variable monocatenario (ScFv), el dominio de unión mínimo de una molécula de inmunoglobulina (Ig). También se han diseñado en los CAR motivos alternativos de unión a antígeno, tales como ligandos de receptores (es decir, IL-13 se ha diseñado para unirse al receptor de IL-13 expresado en tumores), receptores inmunes intactos, 15 péptidos derivados de bibliotecas, y moléculas efectoras del sistema inmune innato (tal como NKG2D). También se están desarrollando dianas celulares alternativas para la expresión de CAR (tales como las células NK o T gamma-delta) (Brown CE et al. Clin Cancer Res. 2012;18(8):2199-209; Lehner M et al. PLoS One. 2012; 7 (2):e31210). Queda mucho trabajo por hacer con respecto a definir la población de células T más activa para transducir con vectores CAR, 20 determinar las técnicas óptimas de cultivo y expansión, y definir los detalles moleculares de la propia estructura de la proteína CAR.

Los motivos de enlace de un CAR pueden ser un dominio estructural relativamente estable, tal como el dominio constante de IgG, o se pueden diseñar para ser un enlazador flexible extendido. Se pueden usar motivos estructurales, tales como los derivados de dominios constantes de IgG, para extender el dominio de unión de ScFv lejos de la superficie de la membrana plasmática de las células T. Esto puede ser importante para algunas dianas tumorales en las que el dominio de unión está particularmente cerca de la membrana de la superficie de la célula tumoral (tal como para el disialogangliósido GD2; Orentas et al., observaciones no publicadas). Hasta la fecha, los motivos de señalización utilizados en los CAR siempre incluyen la cadena CD3- $\zeta$  debido a que este motivo central es la señal clave para la activación de las células T. Los primeros CAR de segunda generación informados presentaban dominios de señalización CD28 y la secuencia transmembrana de CD28. Este motivo también se utilizó en los CAR de tercera generación que contienen motivos de señalización CD137 (4-1BB) (Zhao Y et al J Immunol. 2009; 183 (9): 5563-74). Con la llegada de la nueva tecnología, ya no era necesario que el propio CAR codificara la activación de las células T con perlas unidas a los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y la presencia de la "señal 2" canónica de CD28. Usando la activación con perlas, se descubrió que los vectores de tercera generación no eran superiores a los vectores de segunda generación en ensayos *in vitro*, y no proporcionaron ningún beneficio claro sobre los vectores de segunda generación en modelos de leucemia en ratones (Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, FitzGerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ. Anti-CD22-CARs targeting B cell precursor ALL, Blood. 2013; 121 (7):1165-74; Kochenderfer JN et al. Blood. 2012; 119 (12):2709-20). Además de CD137, otros miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, tal como OX40, 25 también pueden proporcionar importantes señales de persistencia en células T transducidas con CAR (Yvon E et al. Clin Cancer Res. 2009;15(18):5852-60). Igualmente importantes son las condiciones de cultivo bajo las cuales se cultivaron las poblaciones de células T con CAR, por ejemplo la inclusión de las citocinas IL-2, IL-7 y/o IL-15 (Kaiser AD et al. Cancer Gene Ther. 2015; 22(2):72-78).

Los retos actuales en la adaptación más amplia y efectiva de la terapia de CAR para el cáncer se refieren a la escasez 45 de dianas convincentes. Actualmente es fácil crear aglutinantes para los antígenos de la superficie celular, pero descubrir un antígeno de la superficie celular que sea específico para los tumores y que no cubra los tejidos normales sigue siendo un reto formidable. Una forma potencial de imbuir una mayor especificidad de las células diana para las células T que expresan CAR es usar enfoques combinatorios de CAR. En un sistema, las unidades de señal CD3- $\zeta$  y CD28 se dividen entre dos constructos CAR diferentes expresados en la misma célula; en otro, dos CAR se expresan 50 en la misma célula T, pero uno tiene una afinidad menor y, de este modo, requiere que el CAR alternativo se active primero para que el segundo tenga plena actividad (Lanitis E et al. Cancer Immunol Res. 2013;1( 1):43-53; Kloss CC et al. Nat Biotechnol. 2013;31(1):71-5). Un segundo reto para la generación de un único CAR basado en ScFv como agente inmunoterapéutico es la heterogeneidad de las células tumorales. Al menos un grupo ha desarrollado una estrategia CAR para el glioblastoma mediante la cual la población de células efectoras se dirige contra múltiples 55 antígenos (HER2, IL-13Ra, EphA2) al mismo tiempo con la esperanza de evitar el crecimiento de poblaciones negativas para el antígeno diana. (Hegde M et al. Mol Ther. 2013;21(11):2087-101).

La inmunoterapia basada en células T se ha convertido en una nueva frontera en la biología sintética; se prevén 60 múltiples promotores y productos genéticos para dirigir estas células altamente potentes contra el microambiente tumoral, en el que las células T pueden evadir señales reguladoras negativas y mediar en la destrucción eficaz del tumor. La eliminación de células T no deseadas mediante la dimerización inducida por fármacos de constructos de caspasa 9 inducibles con dimerizadores de base química, tal como AP1903, demuestra una forma en la que se puede iniciar farmacológicamente un potente interruptor que puede controlar las poblaciones de células T (Di Stasi A. et al. N Engl J Med. 2011;365(18):1673-83). La creación de poblaciones de células T efectoras que son inmunes a los 65 efectos reguladores negativos del factor de crecimiento transformante  $\beta$  mediante la expresión de un receptor señuelo demuestra aún más el grado en que las células T efectoras pueden diseñarse para una actividad antitumoral óptima

(Foster AE et al. *J Immunother*.2008;31(5):500-5). Por lo tanto, si bien parece que los CAR pueden desencadenar la activación de las células T de manera similar a un receptor endógeno de células T, un impedimento importante para la aplicación clínica de esta tecnología hasta la fecha ha sido la expansión limitada *in vivo* de células T CAR+, la rápida desaparición de las células después de la infusión, y la actividad clínica decepcionante. Esto puede deberse en parte

5 al origen murino de algunas de las secuencias CAR empleadas, un obstáculo abordado directamente por nuestras invenciones aquí descritas. El documento WO 2013/059593 describe los CAR anti-CD22 y sus usos. El documento WO 2017/096329 describe CAR modificados y sus usos.

10 En consecuencia, existe una necesidad urgente y sentida desde hace mucho tiempo en la técnica de descubrir composiciones y métodos novedosos para el tratamiento de B-ALL, DLBCL, FL y otras neoplasias malignas de células B que expresan CD22, usando un enfoque que pueda mostrar efectos antitumorales específicos y eficaces sin las deficiencias antes mencionadas.

15 La presente invención aborda estas necesidades proporcionando composiciones de CAR y métodos terapéuticos que pueden usarse para tratar cánceres y otras enfermedades y/o afecciones. En particular, la presente invención como se divulga y describe aquí proporciona CAR que pueden usarse para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión desregulada de CD22, y CAR los cuales contienen dominios de unión al antígeno CD22 que exhiben una alta expresión superficial en células T transducidas, exhiben un alto grado de citólisis de células que expresan CD22, y en los que las células T transducidas demuestran expansión y persistencia *in vivo*.

20 **SUMARIO**

25 se describen aquí nuevos anticuerpos anti-CD22, o dominios de unión a antígeno de los mismos, y receptores de antígeno químéricos (CAR) que contienen dichos dominios de unión a antígeno CD22, así como células hospedantes (por ejemplo, células T) que expresan los receptores, y moléculas de ácido nucleico que codifican los receptores. Los CAR exhiben una alta expresión superficial en células T transducidas, con un alto grado de citólisis, y con expansión y persistencia *in vivo* de células T transducidas. También se describen métodos de uso de los CAR, células hospedantes, y moléculas de ácido nucleico, por ejemplo para tratar un cáncer en un sujeto.

30 La presente invención está definida por la reivindicación independiente. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

35 Según la invención, se proporciona aquí una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno químérico (CAR) que comprende al menos un dominio de unión al antígeno extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno CD22 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 152, o 162, al menos un dominio transmembrana, y al menos un dominio de señalización intracelular.

40 En una realización, el al menos un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno CD22 está codificado por una secuencia nucleotídica que comprende SEQ ID NO: 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 151, o 161.

45 En una realización, el al menos un dominio de unión al antígeno CD22 codificado, el al menos un dominio de señalización intracelular, o ambos, están conectados al dominio transmembrana mediante un dominio enlazador o espaciador, opcionalmente en el que el dominio enlazador codificado deriva del dominio extracelular de CD8 o CD28, y está unido a un dominio transmembrana.

50 En una realización, el dominio de unión al antígeno CD22 extracelular codificado está precedido por una secuencia nucleotídica líder que codifica un péptido líder, opcionalmente en la que la secuencia nucleotídica líder comprende una secuencia nucleotídica que comprende SEQ ID NO: 190 que codifica la secuencia de aminoácidos líder de SEQ ID NO: 191.

55 En una realización, el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana de una proteína que comprende 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, CD83, CD86, CD134, CD137, CD154, TNFRSF19, o cualquier combinación de los mismos.

60 En una realización, el al menos un dominio de señalización intracelular codificado comprende además un dominio intracelular CD3 zeta.

65 En una realización, el al menos un dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio coestimulador, un dominio de señalización primario, o cualquier combinación de los mismos, opcionalmente en el que el al menos un dominio coestimulador codificado comprende un dominio de señalización funcional de OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12, y 4-1BB (CD137), o una combinación de los mismos.

En aún otro aspecto, se describen aquí receptores de antígeno químéricos (CAR) codificados por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas aquí.

5 En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica los CAR descritos puede estar contenida en un vector, opcionalmente en el que el vector se selecciona del grupo que consiste en un vector de ADN, un vector de ARN, un vector plasmídico, un vector cósmido, un vector de virus del herpes, un vector del virus del sarampión, un vector de lentivirus, un vector adenoviral, o un vector de retrovirus, o una combinación de los mismos, que comprende además opcionalmente un promotor, además opcionalmente en el que el promotor es un promotor inducible, un promotor específico de tejido, un promotor constitutivo, un promotor del suicidio, o cualquier combinación de los mismos.

10 10 En otra realización, también se proporcionan células hospedantes que incluyen la molécula de ácido nucleico que codifica el CAR. En algunas realizaciones, la célula hospedante es una célula T, y opcionalmente además la célula T es una célula T CD8+.

15 15 En otra realización, se proporcionan métodos para producir células T que contienen CAR (en lo sucesivo, "células CAR-T"). Los métodos incluyen la transducción de una célula T con un vector o una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR descrito que se une específicamente a CD22, generando así la célula CAR-T.

20 20 En aún otra realización, se proporciona un método para generar una población de células diseñadas con ARN, que comprende introducir en una célula de un sujeto un ARN transrito *in vitro* o un ARN sintético de una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR descrito, generando así una célula CAR.

25 25 En otra realización, se proporciona un método para inhibir, suprimir o prevenir la inmunosupresión de una respuesta inmune antitumoral o anticancerígena en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo anti-CD22 aislado o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162 y 172. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo inhibe la interacción entre una primera célula con una célula T, en la que la primera célula se selecciona del grupo que consiste en una célula tumoral que expresa CD22, un macrófago asociado a tumor, y cualquier combinación de los mismos.

30 30 En aún otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de células T humanas, en la que las células T comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR, en la que el CAR comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno CD22 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 152, 162, al menos un dominio enlazador o espaciador, al menos un dominio transmembrana, al menos un dominio de señalización intracelular, y en la que las células T son células T de un ser humano que tiene cáncer.

35 40 En aún otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de células T, en la que las células T comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR, en la que el CAR comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno CD22 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 152, 162 o 172, al menos un dominio enlazador o espaciador, al menos un dominio transmembrana, al menos un dominio de señalización intracelular, en la que las células T son células T de un sujeto que tiene cáncer, en el que la composición farmacéutica es para uso en un método para tratar el cáncer en dicho sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto la composición farmacéutica.

45 50 En algunos aspectos, las células T son células T de un ser humano que tiene un cáncer hematológico, opcionalmente en el que el cáncer hematológico es leucemia o linfoma, además opcionalmente en el que la leucemia es leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), o leucemia mielógena crónica (CML), o en el que el linfoma es linfoma de células del manto, linfoma no de Hodgkin (NHL) o linfoma de Hodgkin.

55 55 Se entenderá que los CAR, las células hospedantes, los ácidos nucleicos y los métodos son útiles más allá de las realizaciones específicas que se describen en detalle aquí. Las características y ventajas anteriores de la descripción resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

60 60 La **FIGURA 1** representa un esquema de la estructura general del dominio de los CAR con nuevas secuencias del dominio de unión al antígeno CD22 extracelular. Un CAR está compuesto por un dominio ScFv de unión a CD22 extracelular, un dominio espaciador y transmembrana CD8, un dominio coestimulador CD137 de señalización intracelular, y un dominio de señalización CD3 zeta.

65 65 Las **FIGURAS 2A-R** representan varios CAR que contienen nuevas secuencias del dominio de unión al antígeno CD22 extracelular. El esquema general para los CAR incluye, desde el extremo N al extremo C, un

péptido señal, un fragmento de cadena pesada variable ligante anti-CD22 o un fragmento variable monocatenario unido (ScFv), un enlazador extracelular, transmembrana, 4-1BB, CD3 zeta.

5 La **FIGURA 2A** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2202 16P CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 4).

10 La **FIGURA 2B** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2246 24P CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 13) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 14).

15 La **FIGURA 2C** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia nucleotídica LTG 2247 25P CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 23) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 24).

20 La **FIGURA 2D** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2248 11s CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de aminoácidos codificada.

25 La **FIGURA 2E** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2249 12s CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 43) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 44).

30 La **FIGURA 2F** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2203 16P3 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 53) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 54).

35 La **FIGURA 2G** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2204 16P16 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 63) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 64).

40 La **FIGURA 2H** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2205 16P20 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 73) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 74).

45 La **FIGURA 2I** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2206 16P2 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 83) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 84).

50 La **FIGURA 2J** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2207 16P6 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 93) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 94).

55 La **FIGURA 2K** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2208 16P10 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 103) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 104).

60 La **FIGURA 2L** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2209 16P17 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 113) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 114).

65 La **FIGURA 2M** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2210 16P20v2 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 123) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 124).

70 La **FIGURA 2N** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2216 16P1 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 133) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 134).

75 La **FIGURA 2O** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2217 16P3v2 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 143) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 144).

80 La **FIGURA 2P** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2218 16P8 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 153) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 154).

5 La **FIGURA 2Q** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2219 16P13 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 163) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 164).

10 La **FIGURA 2R** representa un vector lentiviral que expresa el CAR que contiene la secuencia de ácido nucleico LTG 2220 16P15 CD22ScFv-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 173) y la secuencia de aminoácidos codificada (SEQ ID NO: 174).

15 10 La **FIGURA 3** representa la expresión en superficie de CART anti-CD22 en células T humanas primarias. Las células CAR T redirigidas al antígeno tumoral CD22 mediante el uso de dominios ScFv (como se enumeran en cada fila de la figura) se generaron mediante transducción lentiviral con constructos de expresión de CAR. La detección de CART se realizó mediante citometría de flujo. Las células T se lavaron dos veces en amortiguador PBS-EDTA frío, y se tiñeron con péptido CD22-Fc, seguido de reactivo anti Fc-PE. Se adquirieron al menos 20.000 células para cada análisis. Las células se clasificaron en función de la dispersión directa y lateral, la discriminación singlete, y la negatividad de 7AAD para que sólo se analizaran las células viables. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec, Inc.). La línea de puntos vertical que atraviesa el panel identifica la población que expresa CAR (aquellas que se encuentran a la derecha de este acotamiento). En la parte superior del panel, las células no transducidas (UTD) se muestran como control negativo, e inmediatamente debajo, en la segunda fila, se muestran las células transducidas con el control positivo m971. Las filas siguientes muestran la expresión de CAR para cada constructo vectorial enumerado en el eje izquierdo de la figura. Los resultados son representativos de las transducciones de células T en tres donantes.

20 25 La **FIGURA 4** representa células CAR T anti-CD22 que incorporan aglutinantes ScFv (16P, 16P1, 16P3v2, 16P8, 16P10, 16P13, 16P15, 16P17), utd = control negativo no transducido, m971 = control positivo de CAR anti-CD22 publicado previamente) que median la citólisis de tumores CD22 positivos *in vitro*. Las células CAR T que expresan constructos anti-CD22 se incubaron con líneas celulares positivas para CD22 (Raji y Reh) o líneas negativas para CD19 (K562 y 293T) que se transdijeron de manera estable con luciferasa de luciérnaga, en una relación de efector a diana de 1,25, 2,5, 5, 10, 20 y 40 (eje x) durante toda la noche. Despues, la actividad citotóxica de CART se evaluó mediante la medida de la actividad de luciferasa como se describe en Materiales y Métodos. Cada barra es la media de 3 réplicas técnicas, y las barras de error representan SD. Representativo de al menos tres experimentos separados.

30 35 La **FIGURA 5** muestra la producción de células CART específicas de CD22 de tres citocinas (interferón gamma, TNF-alfa, e IL-2) cuando se cocultivan solas (gris medio, sólo CAR), con líneas de leucemia CD22 positivas (Raji, barras negras, Reh, gris claro) o una línea CD22 negativa (293T, gris pálido). El ensayo se llevó a cabo durante la noche en una relación E:T de 10:1, entonces se analizaron los sobrenadantes para determinar las concentraciones de citocinas mediante ELISA. N=3 +SEM. Control negativo: células T no transducidas (utd), control positivo: células CAR-T CD22 m971 transducidas. Los números de LTG de cada LV usados para transducir células T humanas se enumeran en el eje x.

40 45 La **FIGURA 6** muestra un análisis de citometría de flujo bidimensional de la expresión de CAR en la superficie de células T transducidas con LV para expresar: no CAR (UTD), o LTG2200, 2202, 2216, 2206, 2217, 2207, 2218, 2208, 2219, 2220, 2209, 2205, vector que expresa GFP de control, o CAR-19 de control (LTG1538), como se muestra leyendo las filas, de izquierda a derecha, y enumeradas encima de cada gráfico. La dimensión del eje y muestra la tinción para CD4, y la dimensión del eje x muestra la expresión de CAR en virtud de la tinción con el antígeno diana (proteína recombinante CD22-Fc (R&D Biosystems), teñida secundariamente con anticuerpo anti-Fc PE).

50 55 Las **FIGURAS 7A-B** muestran la actividad citolítica (actividad CTL) como porcentaje de lisis de líneas celulares diana, cada una de las cuales expresa luciferasa.

La **FIGURA 7A** muestra las líneas celulares positivas para CD22 Raji y Reh, y la línea K562 que no expresa CD22.

60 65 La **FIGURA 7B** muestra líneas celulares K562-CD19 y K562-CD22, que se transfecaron específicamente para expresar los antígenos diana. Se probaron tres relaciones de efector a diana (E:T 10:1, 5:1, 2,5:1) para cada población de células T transducidas con LV, como se indica en el eje x: utd (sin transducir, GFP-LV, LTG1538 (anti-CD19), m971 (LTG2200, anti-CD22 de control), 16p (LTG2202), 16p1 (LTG2216), 16p2 (LTG2206), 16p3v2 (LTG2217), 16p6 (LTG2207), 16p8 (LTG2218), 16p10 (LTG2208), 16p13 (LTG2219), 16p15 (LTG2220), 16p17 (TG2209), 16p20 (LTG2205).

76 85 La **FIGURA 8** muestra la producción de IFN-gamma (arriba), IL-2 (en el centro) y TNF-alfa (panel inferior) por células CART anti-CD22 al co-incubarlas con líneas celulares de leucemia Raji y Reh CD22 positivas (barras negras o grises, respectivamente), o sin células tumorales diana (sólo células T), durante la noche en una

5 relación E:T de 10:1, después los sobrenadantes se analizaron para determinar la concentración de citocinas mediante ELISA. Se utilizaron grupos de control negativo de solamente CAR, para evaluar la secreción espontánea de citocinas por parte de las células CAR T. Representativo de al menos tres experimentos separados. La actividad CAR-T se ilustra, como se indica en el eje x, para células T no transducidas (utd), células T transducidas con GFP-LV (GFP), CD19-CAR (LTG1538), CAR de control CD22 (LTG2220, m971), 16p (LTF2202), 16p1 (LTG2216), 16p2 (LTG2206), 16p3v2 (LTG2217), 16p6 (LTG2207), 16p8 (LTG2218), 16p10 (LTG2208), 16p13 (LTG2219), 16p15 (LTG2220), 16p17 (LTG2209), 16p20 (LTG2205), o dianas de leucemia incubadas sin células CAR T (sólo tumores).

10 10 La **FIGURA 9** muestra la capacidad de CAR T específicas para CD22 para controlar la enfermedad en un modelo animal. A ratones inmunodeficientes (NSG) se les inyectaron por vía intravenosa células de leucemia Raji que expresan de manera estable luciferasa de luciérnaga, el día 0 del estudio. La carga de enfermedad se mide en el eje x, se informa como radiancia promedio para cada grupo, tras la inyección con el sustrato de luciferasa luciferina, y se toma una imagen en un instrumento IVIS que toma imágenes de cada animal. 15 Los animales se asignaron a grupos equivalentes de carga de enfermedad de 6 ratones cada uno el día 6, y se les inyectaron células CAR T el día 7, y se siguió la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo. Los animales a los que se les infundieron células Raji y no se trataron con células T (TA, círculo blanco) progresaron rápidamente y tuvieron que ser sacrificados el día 21. Otros grupos recibieron células T no transducidas (UTD, cuadrado blanco), células T transducidas con CAR-19 (1538 CAR 19, triángulo blanco), 20 CAR anti-CD22 de control (2200 m971, -x-), nuevo CAR LTG2209 (2209 16P17, diamante blanco), nuevo CAR LTG2219 (2219 16P13, triángulo invertido blanco)

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 25 Definiciones

Como se usan aquí, las formas singulares "un", "una" y "el/la" se refieren tanto al singular como al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un antígeno" incluye antígenos individuales o una multitud de ellos, y puede considerarse equivalente a la frase "al menos un antígeno". Como se usa aquí, el 30 término "comprende" significa "incluye". Por tanto, "que comprende un antígeno" significa "que incluye un antígeno", sin excluir otros elementos. La frase "y/o" significa "y" u "o". Debe entenderse además que todos y cada uno de los 35 tamaños de bases o aminoácidos, y todos los pesos moleculares o valores de masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos, son aproximados, y se proporcionan con fines descriptivos, a menos que se indique lo contrario. Aunque se pueden usar muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, a continuación se describen métodos y materiales particularmente adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la 40 presente memoria descriptiva, incluidas las explicaciones de los términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos, y no pretenden ser limitativos. Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos:

45 40 La expresión "alrededor de", cuando se refiere a un valor mensurable 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 llevar a cabo los métodos descritos.

50 45 A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos aquí se usan según el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 1999; Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994; y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995; y otras referencias similares.

55 50 La presente descripción proporciona anticuerpos anti-CD22 o fragmentos de los mismos, así como CAR que tienen dichos dominios de unión al antígeno CD22. La mejora de la actividad funcional del CAR se refiere directamente a la mejora de la actividad funcional de la célula T que expresa CAR. Como resultado de una o más de estas modificaciones, los CAR exhiben un alto grado de citólisis inducida por citocinas y expresión en la superficie celular en células T transducidas, junto con un mayor nivel de expansión y persistencia *in vivo* de células T de la célula T transducida que expresa CAR.

60 55 La capacidad única de combinar restos funcionales derivados de diferentes dominios proteicos ha sido una característica innovadora clave de los CAR. La elección de cada uno de estos dominios proteicos es una característica clave del diseño, al igual que la forma en que se combinan específicamente. Cada dominio de diseño es un componente esencial que se puede usar en diferentes plataformas CAR para diseñar la función de los linfocitos. Por ejemplo, la elección del dominio de unión extracelular puede hacer que un CAR, que de otro modo sería ineficaz, sea eficaz.

65 60 Los componentes estructurales invariables de las secuencias proteicas derivadas de inmunoglobulinas usadas para crear el dominio de unión al antígeno extracelular de un CAR pueden ser completamente neutros, o pueden

autoasociarse y llevar a la célula T a un estado de agotamiento metabólico, haciendo así que la célula T terapéutica que expresan ese CAR sea mucho menos eficaz. Esto ocurre independientemente de la función de unión al antígeno de este dominio de CAR. Además, la elección del dominio o dominios de señalización intracelular también puede controlar la actividad y la durabilidad de la población de linfocitos terapéuticos usada para inmunoterapia. Si bien la capacidad de unirse al antígeno diana y la capacidad de transmitir una señal de activación a la célula T a través de estos dominios extracelular e intracelular, respectivamente, son aspectos importantes del diseño del CAR, lo que también se ha vuelto evidente es que la elección de la fuente de los fragmentos de unión al antígeno extracelular pueden tener un efecto significativo sobre la eficacia del CAR, y por tanto, tener un papel definitorio para la función y utilidad clínica del CAR.

Sorprendente e inesperadamente, ahora se ha descubierto que el uso de un dominio de unión a antígeno completamente humano en un CAR, en lugar de usar fragmentos de unión a antígeno derivados de ratón que son propensos a inducir una respuesta inmune anti-ratón y la eliminación de las CAR T en un hospedante (véase el ensayo clínico patrocinado por UPenn que usa la secuencia SS1 ScFv derivada de ratón, NCT02159716), también puede determinar la actividad funcional de una célula T que expresa CAR.

Los CAR descritos aquí se expresan a un alto nivel en una célula. Una célula que expresa el CAR tiene una alta tasa de proliferación *in vivo*, produce grandes cantidades de citocinas, y tiene una alta actividad citotóxica contra una célula que tiene, en su superficie, un antígeno CD22 al que se une un CAR. El uso de un dominio de unión al antígeno CD22 extracelular humano da como resultado la generación de un CAR que funciona mejor *in vivo*, evitando al mismo tiempo la inducción de inmunidad anti-CAR en la respuesta inmune del hospedante y la destrucción de la población de células CAR T. Los CAR que expresan el dominio de unión al antígeno ScFv CD22 extracelular completamente humano exhiben actividades/propiedades superiores que incluyen i) prevención de la persistencia y función deficientes de las CAR T como se observa con secuencias de unión derivadas de ratón; ii) la falta de administración regional (es decir, intrapleural) del CAR para que sea eficaz; y iii) la capacidad para generar diseños de células CAR T basados en aglutinantes con alta y baja afinidad por CD19. Esta última propiedad permite a los investigadores ajustar mejor la eficacia frente a la toxicidad y/o la especificidad tisular del producto CAR T, ya que los aglutinantes de menor afinidad pueden tener una mayor especificidad para los tumores frente a los tejidos normales debido a una mayor expresión de CD22 en los tumores que en el tejido normal, lo que puede prevenir la toxicidad tumoral en la diana y fuera del tumor y la destrucción de células espectadoras.

Lo que sigue es una descripción detallada de los CAR, que incluye una descripción de su dominio de unión al antígeno CD22 extracelular, el dominio transmembrana y el dominio intracelular, junto con una descripción adicional de los CAR, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, conjugados, nucleótidos, expresión, vectores, y células hospedantes, métodos de tratamiento, composiciones, y kits que emplean los CAR descritos.

#### **A. Receptores de antígeno químicos (CAR)**

Los CAR descritos aquí comprenden al menos un dominio de unión al antígeno CD22 capaz de unirse a CD22, al menos un dominio transmembrana, y al menos un dominio intracelular.

Un receptor de antígeno químico (CAR) es una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene los dominios de unión al antígeno de un anticuerpo (p. ej., fragmento variable monocatenario (ScFv)) unidos a dominios de señalización de células T a través del dominio transmembrana. Las características de los CAR incluyen su capacidad para redirigir de una manera no restringida por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) la especificidad y reactividad de las células T hacia una diana seleccionada, y explotar las propiedades de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales. El reconocimiento del antígeno no restringido por MHC otorga a las células T que expresan los CAR la capacidad de reconocer el antígeno independientemente del procesamiento del mismo, evitando así un mecanismo importante de escape del tumor. Además, cuando se expresan en células T, los CAR ventajosamente no se dimerizan con las cadenas alfa y beta del receptor endógeno de células T (TCR).

Como se describe aquí, los dominios de señalización de células T intracelulares de los CAR pueden incluir, por ejemplo, un dominio de señalización del receptor de células T, un dominio de señalización coestimulador de células T, o ambos. El dominio de señalización del receptor de células T se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de un receptor de células T, tal como, por ejemplo, y sin limitación, la porción intracelular de la proteína CD3 zeta. El dominio de señalización coestimulador se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora, que es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de los linfocitos contra el antígeno.

#### **1. Dominio extracelular**

En un aspecto, el CAR comprende un elemento de unión específico de la diana, también denominado dominio o resto de unión al antígeno. La elección del dominio depende del tipo y número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede escogerse para reconocer un ligando que actúa como marcador de superficie celular en células diana asociadas con un estado patológico particular. Por tanto, los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión al antígeno

en el CAR incluyen aquellos asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias y células cancerosas.

En un aspecto, el CAR puede diseñarse para dirigirse contra un antígeno tumoral de interés mediante el diseño de un dominio de unión al antígeno deseado que se une específicamente a un antígeno en una célula tumoral. Los antígenos tumorales son proteínas producidas por células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria, en particular respuestas inmunitarias mediadas por células T. La selección del dominio de unión al antígeno dependerá del tipo particular de cáncer a tratar. Los antígenos tumorales incluyen, por ejemplo, un antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), beta-gonadotropina coriónica humana, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa de la telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno específico de la próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteína, PSMA, Her2/neu, survivina y telomerasa, antígeno tumoral 1 del carcinoma de próstata (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrinaB2, CD19, factor de crecimiento insulínico (IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I, y CD22. Los antígenos tumorales descritos aquí se incluyen simplemente a modo de ejemplo. La lista no pretende ser exclusiva, y otros ejemplos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

En un aspecto, el antígeno tumoral comprende uno o más epítopos antigenéticos de cáncer asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunológico. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos de tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma, y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno específico de la próstata (PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, tal como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo más de antígenos diana son los antígenos oncofetales tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de células B, la inmunoglobulina idiotípica específica del tumor constituye un antígeno de inmunoglobulina verdaderamente específico del tumor que es exclusivo de cada tumor individual. Los antígenos de diferenciación de células B, tales como CD19, CD20, CD22, BCMA, ROR1, y CD37, son otros candidatos para antígenos diana en el linfoma de células B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, CD22, idiotípico) se han usado como dianas para inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

En un aspecto, el antígeno tumoral es CD22, y los tumores asociados con la expresión de CD22 comprenden cánceres de mesotelioma de pulmón, de ovario y de páncreas que expresan altos niveles de la proteína extracelular CD22, o cualquier combinación de los mismos.

El tipo de antígeno tumoral también puede ser un antígeno específico de tumor (TSA) o un antígeno asociado a tumor (TAA). Un TSA es exclusivo de las células tumorales, y no aparece en otras células del cuerpo. Un TAA no es exclusivo de una célula tumoral, sino que también se expresa en una célula normal en condiciones que no logran inducir un estado de tolerancia inmunológica al antígeno. La expresión del antígeno en el tumor puede ocurrir en condiciones que permitan que el sistema inmune responda al antígeno. Los TAA pueden ser antígenos que se expresan en células normales durante el desarrollo fetal cuando el sistema inmune está inmaduro y no puede responder, o pueden ser antígenos que normalmente están presentes en niveles extremadamente bajos en células normales pero que se expresan en niveles mucho más altos en células tumorales.

Ejemplos no limitativos de TSA o TAA incluyen los siguientes: Antígenos de diferenciación tales como MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), tirosinasa, TRP-1, TRP-2, y antígenos multilinaje específicos de tumores tales como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; antígenos embrionarios sobreexpresados tales como CEA; oncogenes sobreexpresados y genes supresores de tumores mutados tales como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorales únicos resultantes de translocaciones cromosómicas; tales como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; y antígenos virales, tales como los antígenos del virus de Epstein Barr EBVA y los antígenos del virus del papiloma humano (VPH) E6 y E7. Otros antígenos grandes basados en proteínas incluyen TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-Catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, alfa-fetoproteína, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP, y TPS.

En un aspecto, la porción del dominio de unión al antígeno del CAR se dirige contra un antígeno que incluye, pero no se limita a, CD19, CD20, CD22, ROR1, CD33, CD38, CD123, CD138, BCMA, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, FGFR4, TSLPR, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, y similares.

En el CAR, la porción del dominio de unión al antígeno del CAR se dirige contra el antígeno CD22 extracelular.

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el dominio de unión al antígeno scFv1 CD22 extracelular comprende una secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma. En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en la que el dominio de unión al antígeno CD22 extracelular codificado comprende una secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos con un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el dominio de unión al antígeno ScFv17 CD22 extracelular comprende una secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 161. En una realización, el dominio de unión al antígeno ScFv17 CD22 extracelular codificado comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 162.

- 5 En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el dominio de unión al antígeno ScFv18 CD22 extracelular comprende una secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 171. En una realización, el dominio de unión al antígeno ScFv18 CD22 extracelular codificado comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172.
- 10 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 7, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv1 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv1 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, en una única secuencia de aminoácidos de ScFv.
- 15 20 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, y SEQ ID NO: 20, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv2 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv2 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, y SEQ ID NO: 20, en una única secuencia de aminoácidos.
- 25 30 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, y SEQ ID NO: 27, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 30, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv3 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv3 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 30, en una única secuencia de aminoácidos.
- 35 40 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, y SEQ ID NO: 37, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, y SEQ ID NO: 40, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv4 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv4 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, y SEQ ID NO: 40, en una única secuencia de aminoácidos.
- 45 50 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, y SEQ ID NO: 47, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, y SEQ ID NO: 50, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv5 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv5 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, y SEQ ID NO: 50, en una única secuencia de aminoácidos.
- 55 60 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, y SEQ ID NO: 57, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena

pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, y SEQ ID NO: 60, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv6 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2

5 HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv6 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, y SEQ ID NO: 60, en una única secuencia de aminoácidos.

10 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, y SEQ ID NO: 67, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv7 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv7 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70, en una única secuencia de aminoácidos.

20 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera  
aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, y SEQ ID NO: 77,  
respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena  
pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, y SEQ ID NO: 80,  
respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv8 específico  
de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2  
más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más  
HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de  
unión del scFv8 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77,  
SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, y SEQ ID NO: 80, en una única secuencia de aminoácidos.

30 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, y SEQ ID NO: 87, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, y SEQ ID NO: 90, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv9 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv9 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, y SEQ ID NO: 90, en una única secuencia de aminoácidos.

En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, y SEQ ID NO: 97, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, y SEQ ID NO: 100, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv10 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv10 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, y SEQ ID NO: 100, en una única secuencia de aminoácidos.

55 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, y SEQ ID NO: 107, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, y SEQ ID NO: 110, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv11 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv11 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, y SEQ ID NO: 110, en una única secuencia de aminoácidos.

60

65 En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera aisladas (LCDR1, LCDR2, LCDR2, identificadas como SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, y SEQ ID NO: 117, respectivamente) y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de la cadena



pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3, identificadas como SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, y SEQ ID NO: 180, respectivamente) que contribuyen cada una individualmente a crear las características de unión del scFv18 específico de CD22, como una agrupación para crear la característica de unión de cadena ligera del scFv (LCDR1 más LCDR2 más LCDR3), como una agrupación para crear la característica de unión de cadena pesada del scFv (HCDR1 más

5 HCDR2 más HCDR3), y como una agrupación de seis SEQ ID que juntas como un grupo crean las características de unión del scFv18 específico de CD22 mediante la coexpresión de SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, y SEQ ID NO: 180, en una única secuencia de aminoácidos.

10 En las diversas realizaciones de los CAR específicos de CD22 descritos aquí, el esquema general se establece en la FIGURA 1 e incluye, desde el extremo N al extremo C, un péptido señal o líder, ScFv anti-CD22, un enlazador extracelular, CD8 transmembrana, 4-1BB, CD3zeta, en la que el texto en negrita representa los sitios de clonación para los dominios de enlace.

15 En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 4 [secuencia de aminoácidos de LTG 2202 LP-16P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2A)].

20 En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3, o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 4 o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma, secuencia de aminoácidos de LTG 2202 LP-16P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2A)].

25 En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 14 [secuencia de aminoácidos de LTG 2246 LP-24P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2B)].

30 En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13, o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 14 o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma, secuencia de aminoácidos de LTG 2246 LP-24P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2B)].

35 En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 23, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 24 [secuencia de aminoácidos de CAR LTG 2247 LP-25P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2C)].

40 En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 23, o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 24 o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma, secuencia de aminoácidos de CAR LTG 2247 LP-25P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2C)].

45 En aún otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 33, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 34 [secuencia de aminoácidos de LTG2248 LP-11S-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2D)].

50 En aún otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 33, o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 34 o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma [secuencia de aminoácidos de LTG2248 LP-11S-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2D)].

55 En aún otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 43, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 44 [secuencia de aminoácidos de LTG2249 LP-12S-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2E)].

60 En aún otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 43, o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 44 o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma [secuencia de aminoácidos de LTG2249 LP-12S-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2E)].

En aún otra realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 53, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 54 [secuencia de aminoácidos de LTG2203 LP-16P3-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2F)].



En aún otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 173, o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma, y codifica el CAR que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 174 o una secuencia con 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la misma [secuencia de aminoácidos de LTG2220 LP-16P15-CD8 TM-41BB-CD3zeta (como se representa en la Figura 2R)].

La expresión superficial de CAR anti-CD22 que incorporan secuencias del fragmento variable monocatenario (ScFv) reactivas con el antígeno CD22 se muestra en el Ejemplo 2, más abajo, y se resume en la Tabla 2, Tabla 3, y Figura 6. El nivel de expresión para cada CAR que contiene ScFv se determinó mediante análisis de citometría de flujo de células T transducidas con LV de donantes sanos usando un péptido CD22-Fc recombinante, seguido de un fragmento F(ab')2 anti-Fc humano conjugado con PE, y se detectó por citometría de flujo (véase la Figura 6). Los constructos de CAR anti-CD22 basados en ScFv, LTG2202, LTG2216, LTG2217, LTG2218, LTG2208, LTG2219, LTG2220 y LTG2209, se expresaron altamente en células T primarias humanas (como lo indica la población encerrada) en comparación con controles de células T no transducidas (población de células no encerradas, UTD). Se muestran resultados representativos de un donante.

Como se muestra en el Ejemplo 2 y la Figura 4, 7A y 7B, se demostró una alta actividad citolítica de los CAR anti-CD22 cuando se crearon vectores lentivirales (LV) que expresaban los siguientes CAR y se ensayaron para determinar su actividad antileucémica. Cada CAR experimental contiene el motivo de señalización de la cadena 4-1BB/CD3-zeta y el motivo/dominio de unión anti-CD22 específico anotado en el mismo. Se usaron líneas diana de leucemia con expresión superficial de CD22 variable: Raji y Reh; y K562 y 293T CD19 negativas. Los constructos de CAR anti-CD22 basados en ScFv, LTG2202, LTG2216, LTG2217, LTG2218, LTG2208, LTG2219, LTG2220 y LTG2209, que expresan scFv1 (16P), ScFv2 (16P1), scFv3 (16P3v2), scFv3 (16P3v2), scFv4 (16P8), scFv5 (16P10), scFv6 (16P13), scFv7 (16P15), scFv8 (16P17), respectivamente, fueron capaces de lisar eficazmente las líneas tumorales Raji y Reh con alto contenido de CD22, mientras que tenían poca o ninguna actividad lítica específica contra K562 o 293T (véase, Figura 4, 7A, 7B). Estos resultados demuestran la eficiencia y especificidad de los constructos de CAR generados.

Entonces se evaluó la capacidad de las células CAR T anti-CD22 para la secreción de citocinas. Las células tumorales se incubaron conjuntamente con células CAR T o células T de control a una relación efecto-diana de 10: 1 durante la noche, y los sobrenadantes de los cultivos se analizaron mediante ELISA para determinar IFN gamma, TNF alfa e IL-2 (véase la Figura 8). Es de destacar que las células CAR T transducidas con LTG2202, LTG2216, LTG2217, LTG2218, LTG2208, LTG2219, LTG2220 y LTG2209, que expresan scFv1 (16P), ScFv2 (16P1), scFv3 (16P3v2), scFv3 (16P3v2), scFv4 (16P8), scFv5 (16P10), scFv6 (16P13), scFv7 (16P15), scFv8 (16P17), respectivamente, elaboraron niveles elevados de IFN gamma, mientras que el control negativo (no transducido, utd) no produjo una inducción apreciable de citocinas. Sin embargo, se observaron diferencias claras en la producción de TNF-alfa e IL-2. Sorprendentemente, CD22 CAR LTG2202 produjo niveles significativamente más bajos de TNF-alfa e IL-2 contra la línea tumoral Reh, y cada vector tenía una capacidad diferencial para producir IL-2 y TNF-alfa con respecto a las dianas de la línea tumoral analizadas. Estas diferencias darán como resultado diferentes perfiles antitumorales y de toxicidad, y se implementarán individualmente de acuerdo con la carga de morbilidad, en entornos de enfermedad específicos. El CAR usado como control positivo, m971, se usó para comparar los resultados, ya que actualmente se encuentra en ensayos clínicos y, hasta ahora, es seguro para uso en entornos de enfermedades avanzadas.

Sin pretender limitarse a ningún mecanismo de acción particular, se cree que las posibles razones para la función terapéutica mejorada asociada con los CAR ejemplares incluyen, por ejemplo, y sin limitación, a) movimiento lateral mejorado dentro de la membrana plasmática que permite una transducción de señales más eficiente, b) ubicación superior dentro de los microdominios de la membrana plasmática, tales como balsas de lípidos, y mayor capacidad para interactuar con las cascadas de señalización transmembrana asociadas con la activación de las células T, c) ubicación superior dentro de la membrana plasmática mediante un movimiento preferencial lejos de la amortiguación o interacciones de modulación negativa, tales como menor proximidad o interacción con fosfatases tal como CD45, y d) ensamblaje superior en complejos de señalización del receptor de células T (es decir, la sinapsis inmune), o cualquier combinación de los mismos.

Si bien la descripción se ha ilustrado con una cadena pesada variable CD22 extracelular ejemplar solamente y dominios de unión al antígeno ScFv, se pueden usar otras variantes nucleotídicas y/o de aminoácidos dentro de la cadena pesada variable CD22 solamente y dominios de unión al antígeno ScFv para derivar los dominios de unión al antígeno CD22 para uso en los CAR descritos aquí.

Dependiendo del antígeno deseado al que se dirigirá, el CAR se puede diseñar adicionalmente para incluir el dominio de unión al antígeno apropiado que sea específico para la diana antigenética deseada. Por ejemplo, si CD22 es el antígeno deseado al que se dirige, se puede usar un anticuerpo para CD22 como la incorporación del dominio de unión al antígeno en el CAR.

En una realización ejemplar, la porción del dominio de unión al antígeno del CAR se dirige adicionalmente contra CD33. Preferiblemente, el dominio de unión al antígeno en el CAR es el aglutinante de solamente cadena pesada anti-CD33 VH-4, en el que la secuencia de ácido nucleico del aglutinante de solamente cadena pesada anti-CD33 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 202. En una realización, el aglutinante únicamente de cadena

pesada anti-CD33 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 202. En otra realización, la porción de solamente cadena pesada anti-CD33 del CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 203. En otra realización ejemplar, la secuencia de ácido nucleico del CAR que expresa el aglutinante de solamente cadena pesada anti-CD33, LTG1906, está compuesta por SEQ ID: 204. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del aglutinante de solamente cadena pesada anti-CD33 que expresa CAR, LTG1906, está compuesta por SEQ ID NO: 205.

En una realización ejemplar, la porción del dominio de unión al antígeno del CAR se dirige adicionalmente contra la mesotelina. Preferiblemente, el dominio de unión al antígeno en el CAR es ScFv anti-mesotelina, en el que la secuencia de ácido nucleico del ScFv anti-mesotelina comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 198. En una realización, el ScFv anti-mesotelina comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 199. En otra realización, la porción ScFv anti-mesotelina del CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 199. En otra realización ejemplar, la secuencia de ácido nucleico del CAR que expresa el scFv anti-mesotelina está compuesta por SEQ ID: 200. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del CAR antimesotelina LTG1904 se establece en SEQ ID NO: 201

En un aspecto, se describe un CAR capaz de unirse a un antígeno no TSA o no TAA que incluye, por ejemplo y sin limitación, un antígeno derivado de Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana tales como VIH-1 y VIH-LP), Picornaviridae (por ejemplo, poliovirus, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus coxsackie humano, rinovirus, y echovirus), virus de la rubéola, coronavirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus del ébola, virus de la parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, virus de la gripe, virus de la hepatitis B, parvovirus, Adenoviridae, Herpesviridae [por ejemplo, virus del herpes simple (VHS) tipo 1 y tipo 2, virus varicela-zóster, citomegalovirus (CMV), y virus del herpes], Poxviridae (por ejemplo, virus de la viruela, virus de la vacuna, y poxvirus), o virus de la hepatitis C, o cualquier combinación de los mismos.

En otro aspecto, se describe un CAR capaz de unirse a un antígeno derivado de una cepa bacteriana de *Staphylococci*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, o *Salmonella*. En particular, se proporciona un CAR capaz de unirse a un antígeno derivado de una bacteria infecciosa, por ejemplo *Helicobacter pyloris*, *Legionella pneumophilia*, una cepa bacteriana de *Mycobacteria* spp. (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, o *M. gordonea*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* del Grupo A, *Streptococcus* del Grupo B (*Streptococcus agalactiae*), *Streptococcus pneumoniae*, o *Clostridium tetani*, o una combinación de los mismos.

## 2. Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, el CAR comprende uno o más dominios transmembrana fusionados al dominio de unión al antígeno CD22 extracelular del CAR.

El dominio transmembrana puede derivar de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína transmembrana o unida a membrana.

Las regiones transmembrana de uso particular en los CAR descritos aquí pueden derivar de (es decir, comprenden al menos la o las regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, mesotelina, CD33, CD37, CD64, CD80, CD83, CD86, CD134, CD137, CD154, TNFRSF16, o TNFRSF19. Alternativamente, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. Preferiblemente, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, un enlazador oligo- o polipeptídico corto, preferiblemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmático del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

En una realización, además de los dominios transmembrana descritos más arriba, se usa el dominio transmembrana que está asociado naturalmente con uno de los dominios en el CAR.

En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

En una realización, el dominio transmembrana en el CAR es el dominio transmembrana CD8. En una realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 181. En una realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 182. En otra realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 182.

En una realización, el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por

ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO: 182, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 182.

5 En algunos casos, el dominio transmembrana del CAR comprende el dominio bisagra CD8.alfa. En una realización, el dominio bisagra CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 183. En una realización, el dominio bisagra CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184. En otra realización, el dominio bisagra CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184, o una secuencia con 95-99% de identidad de la misma.

10 En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en la que el dominio enlazador codificado deriva del dominio extracelular de CD8 y está unido al dominio transmembrana CD8, al dominio transmembrana CD28, o una combinación de los mismos.

### 3. Dominio espaciador

15 En el CAR, se puede disponer un dominio espaciador entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana, o entre el dominio intracelular y el dominio transmembrana. El dominio espaciador significa cualquier oligopéptido o polipéptido que sirve para unir el dominio transmembrana con el dominio extracelular, y/o el dominio transmembrana con el dominio intracelular. El dominio espaciador comprende hasta 300 aminoácidos, preferiblemente 10 a 100 aminoácidos, y lo más preferible 25 a 50 aminoácidos.

20 En varias realizaciones, el enlazador puede incluir un elemento espaciador que, cuando está presente, aumenta el tamaño del enlazador de manera que aumenta la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. El experto conoce ejemplos de espaciadores, e incluyen los enumerados en las Patentes de EE.UU. Nos. 7.964.566, 7.498.298, 6.884.869, 6.323.315, 6.239.104, 6.034.065, 5.780.588, 5.665.860, 5.663.149, 5.635.483, 5.599.902, 5.554.725, 5.530.097, 5.521.284, 5.504.191, 5.410.024, 5.138.036, 5.076.973, 4.986.988, 4.978.744, 4.879.278, 4.816.444, and 4.486.414, como así como la Publicaciones de Patentes de EE.UU. Pub. Nos. 20110212088 y 20110070248.

25 30 El dominio espaciador tiene preferiblemente una secuencia que promueve la unión de un CAR con un antígeno y mejora la señalización en una célula. Ejemplos de un aminoácido que se espera que promueva la unión incluyen cisteína, un aminoácido cargado, y serina y treonina en un sitio potencial de glicosilación, y estos aminoácidos pueden usarse como un aminoácido que constituye el dominio espaciador.

35 40 Como dominio espaciador, se puede usar la totalidad o una parte de los aminoácidos números 137-206 (SEQ ID NO: 39) que es una región bisagra de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3), aminoácidos números 135 a 195 de CD8.beta. (GenBank: AAA35664.1), aminoácidos números 315 a 396 de CD4 (NCBI RefSeq: NP.sub.--000607.1), o los aminoácidos números 137 a 152 de CD28 (NCBI RefSeq: NP.sub.--006130.1). Además, como dominio espaciador, se puede usar una parte de una región constante de una cadena H o cadena L de un anticuerpo. Además, el dominio espaciador puede ser una secuencia sintetizada artificialmente.

45 50 Además, en el CAR, se puede unir una secuencia de péptido señal al extremo N-terminal. La secuencia del péptido señal existe en el extremo N de muchas proteínas secretoras y proteínas de membrana, y tiene una longitud de 15 a 30 aminoácidos. Dado que muchas de las moléculas proteicas mencionadas anteriormente como dominio intracelular tienen secuencias de péptidos señal, los péptidos señal pueden usarse como péptido señal para el CAR. En una realización, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 191.

### 4. Dominio intracelular

55 60 El dominio citoplasmático o de otro modo el dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmune en la que se ha colocado el CAR. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o una actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas. Por tanto, la expresión "dominio de señalización intracelular" se refiere a 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 normalmente 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. Se pretende así que la expresión dominio de señalización intracelular incluya cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

65 Los ejemplos preferidos de dominios de señalización intracelular para uso en el CAR incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T (TCR) y los correceptores que actúan en concreto para iniciar la transducción de señales después de la interacción con el receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa de la célula T, y que también se requiere una señal secundaria 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 citoplasmáticas: aquellas que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y aquellas que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias).

Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias regulan la activación primaria del complejo de TCR de forma estimuladora, o de forma inhibidora. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o ITAM.

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

En una realización preferida, el dominio intracelular del CAR puede diseñarse para que comprenda el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio o dominios citoplasmáticos deseados útiles en el contexto del CAR. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR puede comprender una porción de la cadena de CD3 zeta y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno, o sus ligandos, que se requiere para una respuesta eficaz de los linfocitos frente a un antígeno. Ejemplos de tales moléculas coestimuladoras incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares. Ejemplos específicos, no limitativos, de tales moléculas coestimuladoras incluyen péptidos que tienen secuencias de aminoácidos con números 236 a 351 de CD2 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001758.2), aminoácidos números 421 a 458 de CD4 (NCBI RefSeq: NP.sub.--000607.1), aminoácidos números 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2), aminoácidos números 207 a 235 de CD8.alpha. (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3), aminoácidos números 196 a 210 de CD83 (GenBank: AAA35664.1), aminoácidos números 181 a 220 de CD28 (NCBI RefSeq: NP.sub.--006130.1), aminoácidos números 214 a 255 de CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP.sub.--001552.2), aminoácidos números 241 a 277 de CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP.sub.--003318.1), y aminoácidos números 166 a 199 de ICOS (NCBI RefSeq: NP.sub.--036224.1), y sus variantes que tienen la misma función que estos péptidos. Por lo tanto, si bien la descripción aquí se exemplifica principalmente con 4-1BB como elemento de señalización coestimulador, otros elementos coestimuladores están dentro del alcance de la descripción.

Las secuencias de señalización citoplasmáticas dentro de la porción de señalización citoplasmática del CAR pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o específico. Opcionalmente, un enlazador oligo- o polipeptídico corto, preferiblemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

En una realización, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otra realización, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En aún otra realización, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y 4-1BB.

En una realización, el dominio intracelular en el CAR está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 186, y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 188.

En una realización, el dominio intracelular en el CAR está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 187, y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 189.

5 En una realización, el dominio intracelular en el CAR está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 187, y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 189.

10 **5. Descripción adicional de los CAR**

15 También se describen aquí partes funcionales de los CAR descritos aquí. La expresión "porción funcional", cuando se usa con referencia a un CAR, se refiere a cualquier parte o fragmento de uno o más de los CAR descritos aquí, parte o fragmento el cual conserva la actividad biológica del CAR del que forma parte (el CAR original). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un CAR que conservan la capacidad de reconocer células diana, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, en un grado similar, igual o mayor que el CAR original. En referencia al CAR principal, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, alrededor de 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95%, o más, del CAR principal.

20 La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi de la porción, o en ambos extremos, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del CAR original. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo reconocer células diana, detectar cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales mejoran la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del CAR original.

25 Incluidas en el alcance de la descripción se encuentran variantes funcionales de los CAR descritos aquí. La expresión "variante funcional", como se usa aquí, se refiere a un CAR, polipéptido o proteína que tiene una identidad o similitud de secuencia sustancial o significativa con un CAR original, variante funcional la cual conserva la actividad biológica del CAR del que es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del CAR descrito aquí (el CAR original) que conservan la capacidad de reconocer células diana en un grado similar, igual o mayor que el CAR original. En referencia al CAR original, la variante funcional puede ser, por ejemplo, al menos alrededor de 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 98% o más idéntica en secuencia de aminoácidos al CAR original.

30 35 Una variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del CAR original con al menos una sustitución de aminoácidos conservativa. Alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del CAR original con al menos una sustitución de aminoácidos no conservativa. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácidos no conservativa no interfiera ni inhiba la actividad biológica de la variante funcional. La sustitución de aminoácidos no conservativa puede mejorar la actividad biológica de la variante funcional, de modo que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con el CAR original.

40 45 50 55 Las sustituciones de aminoácidos de los CAR son preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son conocidas en la técnica, e incluyen sustituciones de aminoácidos en las que un aminoácido que tiene ciertas propiedades físicas y/o químicas se intercambia por otro aminoácido que tiene propiedades químicas o físicas iguales o similares. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos conservativa puede ser un aminoácido polar ácido/negativamente cargado sustituido por otro aminoácido polar ácido/cargado negativamente (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, He, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val, etc.), un aminoácido polar básico/cargado positivamente sustituido por otro aminoácido polar básico/cargado positivamente (por ejemplo, Lys, His, Arg, etc.), un aminoácido no cargado con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido no cargado con una cadena lateral polar (por ejemplo, Asn, Gin, Ser, Thr, Tyr, etc., un aminoácido con una cadena lateral ramificada beta sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral ramificada beta (por ejemplo, He, Thr y Val), un aminoácido con una cadena lateral aromática sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral aromática (por ejemplo, His, Phe, Trp y Tyr), etc.

60 65 El CAR puede consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas aquí, de modo que otros componentes, por ejemplo otros aminoácidos, no cambian materialmente la actividad biológica de la variante funcional.

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

5 Los CAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Dichos aminoácidos sintéticos son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexanocarboxílico, norleucina, ácido -amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometilcisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina,  $\beta$ -fenilserina  $\beta$ -hidroxifenilalanina, fenilglicina, a-naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, omitina, ácido -aminociclopentanocarboxílico, ácido a-aminociclohexanocarboxílico, ácido a-aminocicloheptanocarboxílico, ácido a-(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido  $\gamma$ -diaminobutírico, ácido  $\beta$ -diaminopropiónico, homofenilalanina, y a-terc-butilglicina.

10 15 Los CAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) pueden glicosilarse, amidarse, carboxilarse, fosforilarse, esterificarse, N-acilarse, ciclarse mediante, por ejemplo, un puente de disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácidos, y/u opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

20 25 30 Los CAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden obtener mediante métodos conocidos en la técnica. Los CAR se pueden preparar mediante cualquier método adecuado para producir polipéptidos o proteínas. Los métodos adecuados de síntesis *de novo* de polipéptidos y proteínas se describen en referencias, tales como Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2001; y la Patente de EE.UU. 5.449.752. Además, se pueden producir polipéptidos y proteínas de forma recombinante usando los ácidos nucleicos descritos aquí usando métodos recombinantes estándar. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. Además, algunos de los CAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) pueden aislarse y/o purificarse a partir de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, por ejemplo una rata, un ser humano, etc. Los métodos de aislamiento y purificación son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, las compañías pueden sintetizar comercialmente los CAR descritos aquí (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos). En este sentido, los CAR pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados, y/o purificados.

#### B. Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno

35 40 45 50 55 60 Un aspecto describe además un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o un dominio de unión a antígeno o una porción del mismo, que se une específicamente a uno o más de los antígenos descritos aquí. Como se usa aquí, una "célula T que expresa un CAR" o una "célula T con CAR" significa una célula T que expresa un CAR y tiene una especificidad para el antígeno determinada, por ejemplo, mediante el dominio de direccionamiento del CAR derivado de anticuerpos. Como se usa aquí, un "dominio de unión a antígeno" puede incluir un anticuerpo y fragmentos de unión a antígeno del mismo. El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio, y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, siempre que exhiban la actividad de unión al antígeno deseada. Los ejemplos no limitativos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas y variantes y fragmentos de las mismas conocidos en la técnica que conservan afinidad de unión por el antígeno. Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, y se dirigen contra un único epítopo antigénico. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. En algunos ejemplos, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se ha transfectado ácido nucleico que codifica las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo de un único anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo), o una progenie del mismo. En algunos ejemplos, se aíslan anticuerpos monoclonales de un sujeto. Los anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas que sustancialmente no tienen ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de las inmunoglobulinas. Se conocen métodos ejemplares de producción de anticuerpos monoclonales; por ejemplo, véase Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (2013).

65 Normalmente, una inmunoglobulina tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Los genes de inmunoglobulina incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes del dominio variable de la inmunoglobulina. Hay dos tipos de cadena

ligera, lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Hay cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

- 5 Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante (o dominio constante) y una región variable (o dominio variable; véase, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6<sup>a</sup> ed., WH Freeman and Co., página 91 (2007).) En varias realizaciones, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se combinan para unirse específicamente al antígeno. En realizaciones adicionales, sólo se requiere la región variable de la cadena pesada. Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten únicamente en una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de una cadena ligera (véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature*, 363:446-448, 1993; 10 Sheriff et al., *Nat. Struct. Biol.*, 3:733-736, 1996). Las referencias a "VH" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena pesada de anticuerpo, incluida la de un fragmento de unión a antígeno, tal como Fv, ScFv, dsFv o Fab. Las referencias a "VL" o "VL" se refieren al dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo, incluido el de un Fv, ScFv, 15 dsFv o Fab.
- 15 Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región de "estructura" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" (véase, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región estructural de un anticuerpo, es decir, las regiones estructurales combinadas de las 20 cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en un espacio tridimensional.
- 25 Las CDR son las principales responsables de la unión a un epítopo de un antígeno. Los límites de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar fácilmente usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluidos los descritos por Kabat et al. ("Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991; esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (JMB 273:927-948, 1997; esquema de numeración "Chothia"), y Lefranc et al. ("IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev. Comp. Immunol., 27:55-77, 2003; esquema de numeración "IMGT"). Las CDR de cada cadena normalmente se denominan CDR1, CDR2 y 30 CDR3 (desde el extremo N al extremo C), y también se identifican normalmente por la cadena en la que se encuentra la CDR particular. Así, una CDR3 de VH es la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de VL es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Las CDR de cadena ligera a veces se denominan LCDR1, LCDR2, y LCDR3. Las CDR de cadena pesada a veces se denominan HCDR1, HCDR2, y HCDR3.
- 35 Un "fragmento de unión a antígeno" es una porción de un anticuerpo de longitud completa que conserva la capacidad de reconocer específicamente el antígeno afín, así como diversas combinaciones de tales porciones. Los ejemplos no limitativos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, ScFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno 40 producidos mediante la modificación de anticuerpos completos, o aquellos sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Kontermann y Dubel (Ed), *Antibody Engineering*, Vols. 1-2, 2<sup>a</sup> Ed., Springer Press, 2010).
- 45 Un anticuerpo monocatenario (ScFv) es una molécula modificada genéticamente que contiene los dominios VH y VL de uno o más anticuerpos unidos por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente fusionada (véase, por ejemplo, Bird et al., *Science*, 242:423 426, 1988; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:5879 5883, 1988; Ahmad et al., *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, doi:10.1155/2012/980250; Marbry, IDrugs, 13:543-549, 2010). La orientación intramolecular del dominio VH y del dominio VL en un ScFv normalmente no es decisiva para los ScFv. Por lo tanto, se pueden usar ScFv con ambas disposiciones posibles (dominio VH-dominio enlazador-dominio VL; dominio VL-dominio enlazador-dominio VH).
- 55 En un dsFv, las cadenas variables de las cadenas pesada y ligera se han mutado para introducir un enlace de disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. También se incluyen diacuerpos, que son anticuerpos bivalentes y biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:6444 6448, 1993; Poljak et al., *Structure*, 2:1121 1123, 1994).
- 60 Los anticuerpos también incluyen formas genéticamente modificadas tales como anticuerpos químéricos (tales como anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., *Immunology*, 3<sup>a</sup> ed., WH Freeman & Co., Nueva York, 1997.
- 65 Los anticuerpos no naturales se pueden construir usando síntesis peptídica en fase sólida, se pueden producir de forma recombinante, o se pueden obtener, por ejemplo, seleccionando bibliotecas combinatorias que consisten en

cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables, como describen Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989). Estos y otros métodos para preparar, por ejemplo, anticuerpos químéricos, humanizados, injertados con CDR, monocatenarios, y bifuncionales, son bien conocidos por los expertos en la técnica (Winter y Harris, *Immunol. Today* 14:243-246 (1993); Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989); Harlow y Lane, más arriba, 1988; Hilyard et al., *Protein*

5 *Engineering: A practical approach* (IRL Press 1992); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2<sup>a</sup> ed. (Oxford University Press 1995).

10 Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50% o más, y a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50% o más. Se conocen ensayos de competición de anticuerpos, y se proporciona aquí un ensayo de competición ejemplar.

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

20 25 Un "anticuerpo químérico" es un anticuerpo que incluye secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, que normalmente son de especies diferentes. En algunos ejemplos, un anticuerpo químérico incluye una o más CDR y/o regiones estructurales de un anticuerpo humano, y CDR y/o regiones estructurales de otro anticuerpo humano.

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

40 45 Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo monocatenario o un fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo biespecífico o bifuncional tiene dos sitios de unión diferentes.

50 Además, un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se puede modificar para que comprenda un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante), y partículas de elementos (p. ej., partículas de oro).

### C. Conjugados

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

60 Un experto en la técnica apreciará que se pueden usar diversas moléculas efectoras y marcadores detectables, incluyendo (pero sin limitarse a) agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, toxinas, agentes radiactivos tales como <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H y <sup>35</sup>S y otras etiquetas, restos diana y ligandos, etc.

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

El procedimiento para unir una molécula efectora o marcador detectable a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno varía según la estructura química del efecto. Los polipéptidos suelen contener una variedad de grupos funcionales; tales como grupos ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH<sub>2</sub>) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para reaccionar con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para dar como resultado la unión del molécula efectora o marcador detectable. Alternativamente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se derivatiza para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas enlazadoras conocidas, tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL. El enlazador puede ser cualquier molécula usada para unir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a la molécula efectora o marcador detectable. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como con la molécula efectora o marcador detectable. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, peor no se limitan a, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos, o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y la molécula efectora o marcador detectable son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (tal como a través de un enlace de disulfuro a cisteína) o a los grupos amino y carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En varias realizaciones, el enlazador puede incluir un elemento espaciador que, cuando está presente, aumenta el tamaño del enlazador de manera que aumenta la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. El experto conoce ejemplos de espaciadores, e incluyen los enumerados en las Patentes de EE.UU. Nos. 7.964.566, 7.498.298, 6.884.869, 6.323.315, 6.239.104, 6.034.065, 5.780.588, 5.665.860, 5.663.149, 5.635.483, 5.599.902, 5.554.725, 5.530.097, 5.521.284, 5.504.191, 5.410.024, 5.138.036, 5.076.973, 4.986.988, 4.978.744, 4.879.278, 4.816.444, and 4.486.414, como así como la Publicaciones de Patentes de EE.UU. Pub. Nos. 20110212088 y 20110070248.

En algunos aspectos, el enlazador se puede escindir en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del enlazador libera la molécula efectora o el marcador detectable del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en el entorno intracelular. En aún otros aspectos, el enlazador no es escindible, y la molécula efectora o marcador detectable se libera, por ejemplo, mediante degradación del anticuerpo. En algunos aspectos, el enlazador se puede escindir mediante un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador peptídico que se escinde mediante una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, pero sin limitarse a, una proteasa lisosomal o endosomal. En algunos aspectos, el enlazador peptídico tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Sin embargo, el enlazador puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud, tal como 1-2, 1-3, 2-5, 3-10, 3-15, 1-5, 1-10, 1-15 aminoácidos de longitud. Las proteasas pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármacos dipéptidos dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Por ejemplo, se puede usar un enlazador peptídico que sea escindible mediante la proteasa catepsina-B dependiente de tiol (por ejemplo, un enlazador de fenilalanina-leucina o un enlazador de glicina-fenilalanina-leucina-glicina). Otros ejemplos de tales enlazadores se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N° 6.214.345. En un aspecto específico, el enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular es un enlazador de valina-citrulina o un enlazador fenilalanina-lisina (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador de valina-citrulina).

En otros aspectos, el enlazador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Normalmente, el enlazador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede usar un enlazador labil a ácidos que sea hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-acóntica, ortoéster, acetal, cetal, o similares). (Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Nos. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661.) Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tal como las de la sangre, pero son inestables por debajo de 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertos aspectos, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico mediante un enlace de acilhidrazona (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 5.622.929).

En otros aspectos, el enlazador es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador de disulfuro). Se conocen en la técnica una variedad de enlazadores de disulfuro, incluidos, por ejemplo, aquellos que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno)-, SPDB y SMPT. (Véase, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., En Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987); Phillips et al., Cancer Res. 68:92809290, 2008). Véase también la Patente de EE. UU. N° 4.880.935.)

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

En aún otros aspectos, el enlazador no es escindible, y la molécula efectora o marcador detectable se libera mediante degradación del anticuerpo. (Véase la Publicación de EE. UU. No. 2005/0238649).

- 5 En varios aspectos, el enlazador es resistente a la escisión en un entorno extracelular. Por ejemplo, no más de alrededor de 20 %, no más de alrededor de 15%, no más de alrededor de 10%, no más de alrededor de 5%, no más de alrededor de 3%, o no más de alrededor de 1% de los enlazadores, en una muestra de conjugado, se escinden cuando el conjugado está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Se puede determinar si un enlazador es resistente o no a la escisión en un entorno extracelular, por ejemplo, incubando el conjugado que contiene el enlazador de interés con plasma durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16, o 24 horas), y cuantificando después la cantidad de molécula efectora libre o marcador detectable presente en el plasma. En los documentos WO 2004-010957, Publicación de EE. UU. No. 2006/0074008, Publicación de EE. UU. No. 20050238649 y Publicación de EE. UU. No. 2006/0024317 se describe una variedad de enlazadores ejemplares que se pueden usar en conjugados.
- 10 15 En varios aspectos, se describen conjugados de un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.
- 20 25 30 Los compuestos de maitansina adecuados para uso como restos de toxina maitansinoide son bien conocidos en la técnica, y pueden aislarse de fuentes naturales según métodos conocidos, producirse usando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973), o maitansinol y análogos de maitansinol preparados sintéticamente según métodos conocidos. Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (Patente de EE. UU. Nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de EE. UU. Nº 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533. Los conjugados que contienen maitansinoides, los métodos para prepararlos, y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. Nos. 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163, y la Patente Europea EP 0 425 235 B1.
- 35 40 45 Se pueden emplear toxinas adicionales con un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo. Las toxinas ejemplares incluyen exotoxina de *Pseudomonas* (PE), ricina, abrina, toxina diftérica y subunidades de las mismas, ribotoxina, ribonucleasa, saporina, y caliqueamicina, así como toxinas botulínicas A a F. Estas toxinas son bien conocidas en la técnica, y muchas están fácilmente disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Las toxinas contempladas también incluyen variantes de las toxinas (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Nos. 5.079.163 y 4.689.401).
- 50 55 60 La saporina es una toxina derivada de *Saponaria officinalis* que altera la síntesis de proteínas al inactivar la porción 60S del complejo ribosomal (Stirpe et al., Bio/Technology, 10:405-412, 1992). Sin embargo, la toxina no tiene ningún mecanismo para ingresar específicamente a las células, y por lo tanto requiere conjugación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconozca una proteína de la superficie celular que se internaliza para que las células la absorban de manera eficiente.
- 65 La toxina diftérica se aísla de *Corynebacterium diphtheriae*. Normalmente, la toxina diftérica para uso en inmunotoxinas está mutada para reducir o eliminar la toxicidad no específica. Desde la década de 1970 se conoce un mutante conocido como CRM107, que tiene actividad enzimática completa pero una toxicidad no específica notablemente reducida (Laird y Groman, J. Virol. 19:220, 1976), y se ha usado en ensayos clínicos en seres humanos. Véanse la patente de EE. UU. No. 5.792.458 y la patente de EE. UU. No. 5.208.021.
- 70 75 80 La ricina es la lectina RCA60 de *Ricinus communis* (ricino). Para ejemplos de ricina, véanse la patente de EE. UU. No. 5.079.163 y la patente de EE. UU. No. 4.689.401. La aglutinina de *Ricinus communis* (RCA) se presenta en dos formas denominadas RCA<sub>60</sub> y RCA<sub>120</sub> según sus pesos moleculares de aproximadamente 65 y 120 kD, respectivamente (Nicholson y Blaustein, J. Biochim. Biophys. Acta 266:543, 1972). La cadena A es responsable de inactivar la síntesis de proteínas y matar células. La cadena B une la ricina a los residuos de galactosa de la superficie celular y facilita el transporte de la cadena A al citosol (Olsnes et al., Nature 249:627-631, 1974, y patente de EE. UU. No. 3.060.165).
- 85 90 95 También se han conjugado ribonucleasas con moléculas de direccionamiento para uso como inmunotoxinas (véase Suzuki et al., Nat. Biotech. 17:265-70, 1999). Se analizan ribotoxinas ejemplares, tales como α-sarcina y restrictocina, por ejemplo, en Rathore et al., Gene 190:31-5, 1997; y Goyal y Batra, Biochem. 345 Parte 2:247-54, 2000. Las caliqueamicinas se aislaron por primera vez de *Micromonospora echinospora*, y son miembros de la familia de antibióticos antitumorales enediinos que provocan roturas de doble cadena en el ADN que conducen a la apoptosis (véase, por ejemplo, Lee et al., J. Antibiot. 42:1070-87, 1989). El fármaco es la fracción tóxica de una inmunotoxina en ensayos clínicos (véase, por ejemplo, Gillespie et al., Ann. Oncol. 11:735-41, 2000).

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

- 5 Un CAR, una célula T que expresa un CAR, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, específicos para uno o más de los antígenos descritos aquí, también se pueden conjugar con un marcador detectable; por ejemplo, un marcador detectable capaz de detección mediante ELISA, espectrofotometría, citometría de flujo, microscopía o técnicas de diagnóstico por imágenes (tales como tomografía computarizada (CT), tomografía axial computarizada (CAT), imágenes por resonancia magnética (MRI), imágenes por resonancia magnética nuclear RMNI), tomografía por resonancia magnética (MTR), ecografía, examen con fibra óptica, y examen laparoscópico). Ejemplos específicos, no limitativos, de marcadores detectables incluyen fluoróforos, agentes químluminiscentes, enlaces enzimáticos, isótopos radiactivos y metales o compuestos pesados (por ejemplo, nanocristales de óxido de hierro superparamagnéticos para detección mediante MRI). Por ejemplo, marcadores detectables útiles incluyen compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares. También son útiles los marcadores bioluminiscentes, tales como la luciferasa, la proteína fluorescente verde (GFP), y la proteína fluorescente amarilla (YFP). Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, también se pueden conjugar con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se conjuga con una enzima detectable, se puede detectar añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que se puede discernir. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable visualmente. Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, también puede conjugarse con biotina y detectarse mediante medida indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Cabe señalar que la propia avidina se puede conjugar con una enzima o un marcador fluorescente.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede conjugararse con un agente paramagnético, tal como gadolinio. Los agentes paramagnéticos tales como el óxido de hierro superparamagnético también son útiles como marcadores. Los anticuerpos también se pueden conjugar con lantánidos (tales como europio y disposio), y manganeso. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede marcarse con epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (tales como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos).
- Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, también se puede conjugar con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede usarse tanto con fines diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador puede usarse para detectar uno o más de los antígenos descritos aquí, y células que expresan抗原s, mediante rayos X, espectros de emisión, u otras técnicas de diagnóstico. Además, el radiomarcador puede usarse terapéuticamente como una toxina para el tratamiento de tumores en un sujeto, por ejemplo para el tratamiento de un neuroblastoma. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ .
- Los expertos en la técnica conocen bien los medios para detectar tales marcadores detectables. Así, por ejemplo, los radiomarcadores se pueden detectar usando películas fotográficas o contadores de centelleo, y los marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos normalmente se detectan proporcionando a la enzima un sustrato, y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

#### D. Nucleótidos, expresión, vectores, y células hospedantes

- Además se describe aquí un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cualquiera de los CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, descritos aquí (incluidas porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos). Los ácidos nucleicos pueden comprender una secuencia nucleotídica que codifica cualquiera de las secuencias líder, dominios transmembrana, y/o dominios de señalización de células T intracelulares descritos aquí.
- En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica puede modificarse con codones. Sin estar limitados a una teoría particular, se cree que la optimización de codones de la secuencia nucleotídica aumenta la eficiencia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización de codones de la secuencia nucleotídica puede implicar la sustitución de un codón nativo por otro codón que codifica el mismo aminoácido, pero puede traducirse mediante ARNt que está más fácilmente disponible dentro de una célula, aumentando así la eficiencia de la traducción. La optimización de la secuencia nucleotídica también puede reducir las estructuras secundarias de ARNm que interferirían con la traducción, aumentando así la eficiencia de la traducción.

En un ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica modificada con codones que codifica el dominio de unión al antígeno del CAR.

- 5 "Ácido nucleico", como se usa aquí, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace internucleótido natural, no natural o alterado, tal como un enlace de fosforoamidato o un enlace de fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico no comprende inserciones, eliminaciones, inversiones, y/o sustituciones. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, como se analiza aquí, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, eliminaciones, inversiones, y/o sustituciones.
- 10 Un ácido nucleico recombinante puede ser aquel que tiene una secuencia que no se produce naturalmente, o que tiene una secuencia que se produce mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otro modo estarían separados. Esta combinación artificial a menudo se logra mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo mediante técnicas de ingeniería genética, tales como las descritas en Sambrook *et al.*, más arriba. Los ácidos nucleicos se pueden construir basándose en síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, más arriba, y Ausubel *et al.*, más arriba. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de diversas formas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato, y nucleótidos sustituidos con acridina). Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina sustituida en N6, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos se pueden comprar en compañías, tal como Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EE. UU.).
- 15 30 35 40 45 50 55 60 65
- También se describe un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia nucleotídica que es complementaria a la secuencia nucleotídica de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí, o una secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia nucleotídica de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí.
- La secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas puede hibridarse en condiciones muy rigurosas. Por "condiciones de alta rigurosidad" se entiende que la secuencia nucleotídica se hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia nucleotídica de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o aquel que contiene sólo unos pocos desajustes dispersos de una secuencia aleatoria que casualmente tenía unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que coincidían con la secuencia nucleotídica. Estas pequeñas regiones de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y una hibridación de alta rigurosidad las hace fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente alta incluirían, por ejemplo, condiciones de baja sal y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por alrededor de NaCl 0,02-0,1 M o su equivalente, a temperaturas de alrededor de 50-70°C. Estas condiciones de alta rigurosidad toleran poco o ningún desajuste entre la secuencia nucleotídica y la plantilla o cadena diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los CAR. Generalmente se aprecia que las condiciones pueden hacerse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.
- También se describe un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos alrededor de 70% o más, por ejemplo alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 91%, alrededor de 92%, alrededor de 93%, alrededor de 94%, alrededor de 95%, alrededor de 96%, alrededor de 97%, alrededor de 98%, o alrededor de 99% idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí.
- En una realización, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector de expresión recombinante. Para los fines aquí, la expresión "vector de expresión recombinante" significa un constructo oligonucleotídico o polinucleotídico genéticamente modificado que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido, o péptido por una célula hospedante, cuando el constructo comprende una secuencia nucleotídica que codifica el ARNm, proteína, polipéptido, o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para que el ARNm, proteína, polipéptido, o péptido se exprese dentro de la célula. Los vectores no se producen de forma natural en su conjunto.

- Sin embargo, partes de los vectores pueden existir de forma natural. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluidos, pero no limitados a, ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, sintetizados u obtenidos en parte a partir de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleotídicos naturales o no naturales, o ambos tipos de enlaces. Preferiblemente, los nucleótidos o enlaces internucleotídicos no naturales o alterados no obstaculizan la transcripción o replicación del vector.
- 5 En una realización, el vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier célula hospedante adecuada. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para propagación y expansión o la para expresión, o ambas, tales como plásmidos y virus. El vector se puede seleccionar del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA).
- 10 15 También se pueden usar vectores bacteriófagos, tales como  $\lambda$   $\lambda'$
- 20 TIO,  $\lambda$ UTI 1,  $\lambda$ ZapII (Stratagene), EMBL4, y  $\lambda$ NMI 149. Ejemplos de vectores de expresión vegetales incluyen pBIO1, pB101.2, pBHO1.3, pBI121 y pBN19 (Clontech). Ejemplos de vectores de expresión animales incluyen pEUK-Cl, pMAM, y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector viral, por ejemplo un vector retroviral o un vector lentiviral. Un vector lentiviral es un vector derivado de al menos una porción de un genoma de lentivirus, incluyendo especialmente un vector lentiviral autoinactivante como se proporciona en Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores lentivirales que se pueden usar en la clínica incluyen, por ejemplo, y sin carácter limitativo, tecnología de administración de genes LENTIVECTOR.RTM. de Oxford BioMedica plc, sistema vectorial LENTIMAX.TM. de Lentigen, y similares. También están disponibles tipos no clínicos de vectores lentivirales, y serían conocidos por un experto en la técnica.
- 25 30 En la técnica se conocen generalmente varias técnicas de transfección (véanse, por ejemplo, Graham et al., Virology, 52: 456-467 (1973); Sambrook et al., más arriba; Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986); y Chu et al., Gene, 13: 97 (1981).
- 35 Los métodos de transfección incluyen coprecipitación con fosfato cálcico (véase, por ejemplo, Graham et al., más arriba), microinyección directa en células cultivadas (véase, por ejemplo, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980)), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa et al., BioTechniques, 6: 742-751 (1988)), transferencia de genes mediada por liposomas (véase, por ejemplo, Mannino et al., BioTechniques, 6: 682-690 (1988)), transducción mediada por lípidos (véase, por ejemplo, Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987)), y administración de ácido nucleico usando microproyectiles de alta velocidad (véase, por ejemplo, Klein et al., Nature, 327: 70-73 (1987)).
- 40 45 50 En una realización, los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante estándar, descritas, por ejemplo, en Sambrook et al., más arriba, y Ausubel et al., más arriba. Se pueden preparar constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, para contener un sistema de replicación funcional en una célula hospedante procariótica o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivar, por ejemplo, de ColE1, plásmido 2  $\mu$ ,  $\lambda$ , SV40, virus del papiloma bovino, y similares.
- 55 El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos del tipo de célula hospedante (por ejemplo, bacteria, hongo, planta, o animal) en la que se va a introducir el vector, según sea apropiado, y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN. El vector de expresión recombinante puede comprender sitios de restricción para facilitar la clonación.
- 60 65 El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de células hospedantes transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un hospedante auxotrófico para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina, y genes de resistencia a ampicilina.
- El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o normativo unido operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica el CAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), o a la secuencia nucleotídica que es complementaria o que se hibrida con la secuencia nucleotídica que codifica el CAR. La selección de promotores, por ejemplo fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido, y específicos del desarrollo, está dentro de la habilidad habitual del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia nucleotídica con un promotor también está dentro de la habilidad del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV, o un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas.

Los vectores de expresión recombinantes pueden diseñarse para expresión transitoria, para expresión estable, o para ambas. Además, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse para expresión constitutiva o para expresión inducible.

- 5 Además, se puede hacer que los vectores de expresión recombinantes incluyan un gen suicida. Como se usa aquí, la expresión "gen suicida" se refiere a un gen que hace que muera la célula que expresa el gen suicida. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo un fármaco, a la célula en la que se expresa el gen, y hace que la célula muera cuando la célula entra en contacto con el agente o se expone a él. Los genes suicidas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews*, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004), e incluyen, por ejemplo, la timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), citosina daminasa, purina nucleósido fosforilasa, y nitrorreductasa.
- 10 15 Una realización proporciona además una célula hospedante que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos aquí. Como se usa aquí, la expresión "célula hospedante" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante. La célula hospedante puede ser una célula eucariota, por ejemplo una planta, un animal, un hongo, o un alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo una bacteria o un protozoo. La célula hospedante puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo un ser humano. La célula hospedante puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células hospedantes adecuadas se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, células DH5a de *E. coli*, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293, y similares. Para los fines de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula hospedante puede ser una célula procariótica, por ejemplo una célula DH5a. Con el fin de producir un CAR recombinante, la célula hospedante puede ser una célula de mamífero. La célula hospedante puede ser una célula humana. Si bien la célula hospedante puede ser de cualquier tipo celular, puede originarse a partir de cualquier tipo de tejido, y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, la célula hospedante puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). La célula hospedante puede ser una célula T.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- Para los fines aquí, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivadas, por ejemplo Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, incluidas, pero sin limitarse a, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, timo, u otros tejidos o fluidos. Las células T también pueden enriquecerse o purificarse. La célula T puede ser una célula T humana. La célula T puede ser una célula T aislada de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T, y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, incluyendo, pero sin limitarse a, células T CD4+/CD8+ doblemente positivas, células T auxiliares CD4+, por ejemplo células Th1 y Th2, células T CD8+ (por ejemplo, células T citotóxicas), células infiltrantes de tumores, células T de memoria, células madre de memoria, es decir, Tscm, células T vírgenes, y similares. La célula T puede ser una célula T CD8+ o una célula T CD4+.
- En una realización, los CAR como se describen aquí se pueden usar en células no T adecuadas. Estas células son aquellas con una función efectora inmune, tales como, por ejemplo, las células NK, y las células tipo T generadas a partir de células madre pluripotentes.
- También se proporciona mediante una realización una población de células que comprende al menos una célula hospedante descrita aquí. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula hospedante que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo una célula hospedante (por ejemplo, una célula T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes, o una célula distinta de una célula T, por ejemplo una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células hospedantes (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una única célula hospedante que comprende un vector de expresión recombinante, de modo que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización, la población de células es una población clonal que comprende células hospedantes que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe aquí.
- Se pueden aislar y/o purificar CAR (incluidas porciones funcionales y variantes de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedantes (incluidas poblaciones de las mismas), y anticuerpos (incluidas porciones de unión a antígeno de los mismos). Por ejemplo, una preparación de células hospedantes purificadas (o aisladas) es aquella en la que la célula hospedante es más pura que las células en su entorno natural dentro del cuerpo. Dichas células hospedantes pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas de purificación estándar. En algunas realizaciones, una preparación de una célula hospedante se purifica de manera que la célula hospedante represente al menos alrededor de 50%, por ejemplo al menos alrededor de 70%, del contenido celular

total de la preparación. Por ejemplo, la pureza puede ser al menos alrededor de 50%, puede ser mayor que alrededor de 60%, alrededor de 70% o alrededor de 80%, o puede ser alrededor de 100%.

#### E. Métodos de tratamiento

- 5 Se contempla que los CAR descritos aquí se puedan usar en métodos para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero. En este sentido, se describe una composición farmacéutica para uso en el método de tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedantes, la población de células, la anticuerpos y/o sus porciones de unión a antígeno, y/o las composiciones farmacéuticas, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.
- 10 Un aspecto comprende además agotar los linfocitos del mamífero antes de administrar los CAR descritos aquí. Los ejemplos de linfodeplección incluyen, pero pueden no limitarse a, quimioterapia linfodelectora no mieloablativa, quimioterapia linfodelectora mieloablativa, irradiación corporal total, etc.
- 15 Para los fines de los métodos, en los que se administran células hospedantes o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas del mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas del mamífero. Como se usa aquí, alogénico significa cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se le 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 algunas realizaciones, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser lo suficientemente diferente genéticamente como para interactuar antigénicamente. Como se usa aquí, "autólogo" significa cualquier material derivado del mismo individuo al que posteriormente se le reintroducirá en el individuo.
- 20 25 El mamífero al que se hace referencia aquí puede ser cualquier mamífero. Como se usa aquí, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluidos, pero sin limitarse a, mamíferos del orden Rodentia, tales como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden Logomorpha, tales como conejos. Los mamíferos pueden ser del orden Carnivora, incluidos félidos (gatos) y cánidos (perros). Los mamíferos pueden ser del orden Artiodactyla, incluidos los bóvidos (vacas) y los cerdos (cerdos), o del orden Perssodactyla, incluidos los équidos (caballos). Los mamíferos pueden ser del orden Primates, Ceboides o Simoides (monos), o del orden Antropoides (humanos y simios). Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.
- 30 35 Con respecto a los métodos, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de ALL, AML, rhabdomiosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de vejiga), cáncer de huesos, cáncer de cerebro (por ejemplo, meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal o anorrecto, cáncer de ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de articulaciones, cáncer del cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de la nariz, cavidad nasal, u oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica (CLL), cáncer mieloide crónico (CML), cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico y adenocarcinoma de pulmón), linfoma, mesotelioma, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, NHL, leucemia linfocítica crónica B, leucemia de células pilosas, linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de peritoneo, epiplón, y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, sarcoma sinovial, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer de tiroides, y cáncer de uréter.
- 40 45 50 Los términos "tratar" y "prevenir", así como las palabras que derivan de ellos, como se usan aquí, no implican necesariamente un tratamiento o prevención al 100% o completo. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención que un experto en la técnica reconoce que tiene un beneficio o efecto terapéutico potencial. A este respecto, los métodos pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero.
- 55 Además, el tratamiento o prevención proporcionado por el método puede incluir el tratamiento o prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, por ejemplo cáncer, que se está tratando o previniendo. Además, para los fines aquí, "prevención" puede abarcar retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o afección de la misma.
- 60 Otro aspecto describe un método para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedantes, la población de células, los anticuerpos, y/o las porciones de unión a antígeno de los mismos, o las composiciones farmacéuticas, formando así un complejo, (b) y detectar el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.
- 65 La muestra puede obtenerse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo biopsia o necropsia. Una biopsia es la extracción de tejido y/o células de un individuo. Dicha eliminación puede consistir en recolectar tejido y/o células del

individuo para realizar experimentación con el tejido y/o células retirados. Esta experimentación puede incluir experimentos para determinar si el individuo tiene y/o sufre una determinada afección o estado mórbido. La afección o enfermedad puede ser, por ejemplo, cáncer.

- 5 Con respecto a un aspecto del método para detectar la presencia de un trastorno proliferativo, por ejemplo cáncer, en un mamífero, la muestra que comprende células del mamífero puede ser una muestra que comprende células completas, lisados de las mismas, o una fracción de los lisados de la célula completa, por ejemplo una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción de proteína completa, o una fracción de ácido nucleico. Si la muestra comprende células completas, las células pueden ser cualquier célula del mamífero, por ejemplo las células de cualquier órgano o tejido, incluidas las células sanguíneas o las células endoteliales.

10 El contacto puede tener lugar *in vitro* o *in vivo* con respecto al mamífero. Preferiblemente, el contacto es *in vitro*.

15 Además, la detección del complejo puede ocurrir mediante varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los CAR descritos aquí, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedantes, poblaciones de células, o anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, descritos aquí, se pueden marcar con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isoftiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante), y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro), como se describe más arriba.

20 En la técnica se conocen métodos para evaluar un CAR para determinar la capacidad de reconocer células diana y la especificidad del antígeno. Por ejemplo, Clay et al., J. Immunol, 163: 507-513 (1999), enseñan métodos para medir la liberación de citocinas (por ejemplo, interferón-γ, factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), factor a de necrosis tumoral (TNF-α) o interleucina 2 (IL-2)). Además, la función de CAR puede evaluarse midiendo la 25 citotoxicidad celular, como se describe en Zhao et al, J. Immunol, 174: 4415-4423 (2005).

30 Otro aspecto describe el uso de los CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedantes, poblaciones de células, anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, y/o composiciones farmacéuticas descritas aquí, para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo, por ejemplo cáncer, en un mamífero. El cáncer puede ser cualquiera de los cánceres descritos aquí.

35 Puede usarse cualquier método de administración para los agentes terapéuticos descritos, incluida la administración local y sistémica. Por ejemplo, se puede usar administración tópica, oral, intravascular, tal como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intradérmica, intratecal y subcutánea. El médico tratante seleccionará el modo particular de administración y el régimen de dosificación, teniendo en cuenta los detalles del caso (por ejemplo, el sujeto, la enfermedad, el estado patológico involucrado, y si el tratamiento es profiláctico). En los casos en los que se esté administrando más de un agente o composición, se pueden usar una o más vías de administración; por ejemplo, un agente quimioterapéutico se puede administrar por vía oral, y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, conjugado o composición se puede administrar por vía intravenosa. Los métodos de administración incluyen 40 inyección para la cual el CAR, la célula CAR T, conjugados, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, o composiciones se proporcionan en un vehículo no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como agua, disolución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, seroalbúmina humana al 5%, aceites fijos, oleato de etilo, o liposomas. En algunos aspectos, se puede usar la administración local de los compuestos descritos, por ejemplo aplicando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a una región de tejido de la que se ha extirpado un tumor, o 45 a una región que se sospecha que es propensa al desarrollo de tumores. En algunos aspectos, puede ser beneficiosa la liberación intratumoral (o casi tumoral) sostenida de la preparación farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En otros ejemplos, el conjugado se aplica como un colirio por vía tópica en la córnea, o por vía intravítreo en el ojo.

50 Los agentes terapéuticos descritos se pueden formular en forma de dosificación unitaria, adecuada para la administración individual de dosis precisas. Además, los agentes terapéuticos descritos pueden administrarse en una dosis única o en un programa de dosis múltiples. Un programa de dosis múltiples es aquel en el que un ciclo primario de tratamiento puede ser con más de una dosis separada, por ejemplo 1-10 dosis, seguida de otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores según sea necesario para mantener o reforzar la acción de las 55 composiciones. El tratamiento puede implicar dosis diarias o varias diarias de compuesto o compuestos durante un período de unos pocos días a meses, o incluso años. Por lo tanto, el régimen de dosificación también se determinará, al menos en parte, basándose en las necesidades particulares del sujeto a tratar, y dependerá del criterio del médico que lo administre.

60 Las dosis típicas de los anticuerpos o conjugados pueden oscilar de alrededor de 0,01 a alrededor de 30 mg/kg, tal como de alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mg/kg.

65 En ejemplos particulares, al sujeto se le administra una composición terapéutica que incluye uno o más de los conjugados, anticuerpos, composiciones, CAR, células CAR T o agentes adicionales, en un programa de dosificación diaria múltiple, tal como al menos dos días consecutivos, 10 días consecutivos, etc., por ejemplo durante un período de semanas, meses, o años. En un ejemplo, al sujeto se le administran los conjugados, anticuerpos, composiciones o

agentes adicionales durante un período de al menos 30 días, tal como al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 24 meses, o al menos 36 meses.

En algunos aspectos, los métodos descritos incluyen proporcionar cirugía, radioterapia, y/o quimioterapia al sujeto en combinación con un anticuerpo descrito, fragmento de unión a antígeno, conjugado, CAR o célula T que expresa un CAR (por ejemplo, de forma secuencial, sustancialmente simultánea, o simultáneamente). Los expertos en la técnica conocen los métodos y las dosis terapéuticas de tales agentes y tratamientos, y se pueden determinar por un médico experto. Los programas de preparación y dosificación para el agente adicional se pueden usar según las instrucciones del fabricante o según lo determine empíricamente el profesional experto. Los programas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service*, (1992) Ed., MC Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

En algunos aspectos, la terapia de combinación puede incluir la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del cáncer adicional. Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar con la terapia de combinación incluyen agentes de unión a microtúbulos, intercaladores o reticuladores de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores de enzimas, reguladores de genes, e inhibidores de la angiogénesis. Estos agentes (que se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz) y tratamientos se pueden usar solos o en combinación. Por ejemplo, cualquier agente anticancerígeno o antiangiogénico adecuado se puede administrar en combinación con los CAR, células CAR-T, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, o conjugados descritos aquí. Los expertos en la técnica conocen los métodos y las dosis terapéuticas de tales agentes, y se pueden determinar por un médico experto.

Los agentes quimioterapéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas (por ejemplo, clorambucilo, clormetina, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalán), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, fotemustina, lomustina, y estreptozocina), compuestos de platino (por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, y BBR3464), busulfán, dacarbazina, mecloretamina, procarbazina, temozolomida, tiotepa, y uramustina; antimetabolitos, tales como ácido fólico (por ejemplo, metotrexato, pemetrexed, y raltitrexed), purina (por ejemplo, cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, y tioguanina), pirimidina (por ejemplo, capecitabina), citarabina, fluorouracilo, y gencitabina; alcaloides vegetales, tales como podophyllum (por ejemplo, etopósido, y tenipósido), taxano (por ejemplo, docetaxel y paclitaxel), vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, y vinorelbina); antibióticos citotóxicos/antitumorales, tales como miembros de la familia de las antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, y valrubicina), bleomicina, rifampicina, hidroxiurea, y mitomicina; inhibidores de la topoisomerasa, tales como topotecán e irinotecán; anticuerpos monoclonales, tales como alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, rituximab, panitumumab, pertuzumab, y trastuzumab; fotosensibilizadores, tales como ácido aminolevulínico, aminolevulinato de metilo, porfímero sódico, y verteporfina; y otros agentes, tales como altretamina, amsacrina, anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa, axitinib, bexaroteno, bevacizumab, bortezomib, celecoxib, denileucina diftitox, erlotinib, estramustina, gefitinib, hidroxicarbamida, imatinib, lapatinib, pazopanib, pentostatina, masoprolol, mitotano, pegaspargasa, tamoxifeno, sorafenib, sunitinib, vemurafenib, vandetanib, y tretinoína. Los expertos en la técnica conocen la selección y las dosis terapéuticas de tales agentes, y se pueden determinar por un médico experto.

La terapia combinada puede proporcionar sinergia y resultar sinérgica, es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos son: (1) coformulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se administran alternativamente, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la alternancia, se administra secuencialmente una dosis eficaz de cada ingrediente activo, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, se administran juntas dosis eficaces de dos o más ingredientes activos.

En un aspecto, una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a uno o más de los antígenos descritos aquí, o un conjugado de los mismos, se administra a un sujeto que tiene un tumor después del tratamiento contra el cáncer. Después de que haya transcurrido una cantidad de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno o conjugado administrado forme un complejo inmunológico con el antígeno expreso en la célula cancerosa respectiva, se detecta el complejo inmune. La presencia (o ausencia) del complejo inmune indica la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, un aumento del complejo inmunitario en comparación con un control tomado antes del tratamiento indica que el tratamiento no es eficaz, mientras que una disminución del complejo inmunitario en comparación con un control tomado antes del tratamiento indica que el tratamiento es eficaz.

#### **F. Composiciones biofarmacéuticas**

Se describen aquí composiciones biofarmacéuticas o biológicas (en adelante, "composiciones") para uso en terapia génica, inmunoterapia y/o terapia celular, que incluyen uno o más de los CAR descritos, o células T que expresan un

CAR, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, CAR o células T que expresan un CAR que se unen específicamente a uno o más antígenos descritos aquí, en un vehículo (tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable). Las composiciones se pueden preparar en formas de dosificación unitaria para administración a un sujeto. La cantidad y el momento de la administración quedan a criterio del médico tratante para lograr el resultado deseado.

- 5 Las composiciones pueden formularse para administración sistémica (tal como intravenosa) o local (tal como intratumoral). En un ejemplo, un CAR descrito, o células T que expresan un CAR, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado, se formula para administración parenteral, tal como administración intravenosa. Las 10 composiciones que incluyen un CAR, o célula T que expresa un CAR, un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe aquí son de uso, por ejemplo, para el tratamiento y detección de un tumor, por ejemplo, y no a modo de limitación, un neuroblastoma. En algunos ejemplos, las composiciones son útiles para el tratamiento 15 o detección de un carcinoma. Las composiciones que incluyen un CAR, o célula T que expresa un CAR, un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe aquí también son útiles, por ejemplo, para la detección de angiogénesis patológica.
- 15 Las composiciones para administración pueden incluir una disolución del CAR, o célula T que expresa un CAR, conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno disueltos en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Se pueden usar diversos vehículos acuosos, por ejemplo disolución salina amortiguada y similares. Estas disoluciones son estériles, y generalmente están libres de materias indeseables. Estas composiciones 20 pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes reguladores y amortiguadores del pH, agentes reguladores de la toxicidad, agentes adyuvantes, y similares, por ejemplo acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, y similares. La concentración de un CAR, o célula T que expresa un CAR, anticuerpo o fragmento o conjugado de unión a antígeno en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará 25 principalmente basándose en los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal, y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionada y las necesidades del sujeto. Los métodos reales para preparar dichas formas de dosificación para uso en terapia génica, inmunoterapia y/o terapia celular son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en la técnica.
- 30 Una composición típica para administración intravenosa incluye alrededor de 0,01 a alrededor de 30 mg/kg de anticuerpo o fragmento o conjugado de unión a antígeno por sujeto por día (o la dosis correspondiente de un CAR, o célula T que expresa un CAR, conjugado que incluye el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno). Los métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica, y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 19<sup>a</sup> ed., Mack Publishing 35 Company, Easton, PA (1995).

Un CAR, o célula T que expresa un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, o conjugados, se pueden proporcionar en forma liofilizada y rehidratar con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en disoluciones estériles de concentración conocida. La disolución de los CAR, o células T que expresan un CAR, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado, se añade después a una bolsa de infusión que contiene cloruro de sodio al 0,9%, USP, y en algunos casos se administra en una dosis de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal. Se dispone de una experiencia considerable en la técnica en la administración de fármacos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos y de conjugados; por ejemplo, los medicamentos de anticuerpos se han comercializado en los EE. UU. desde la aprobación de RITUXAN® en 1997. Un CAR, o célula T que expresa un CAR, 40 anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, y conjugados de los mismos, se pueden administrar mediante infusión lenta, en lugar de una inyección intravenosa o un bolo. En un ejemplo, se administra una dosis de carga más alta, administrándose dosis de mantenimiento posteriores a un nivel más bajo. Por ejemplo, se puede infundir una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (o la dosis correspondiente de un conjugado que incluya el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) durante un período de unos 90 minutos, seguido de dosis 45 de mantenimiento semanales durante 4-8 semanas de 2 mg/kg infundidas durante un período de 30 minutos si la dosis anterior fue bien tolerada.

50 Las formulaciones parenterales de liberación controlada se pueden preparar como implantes, inyecciones oleosas, o como sistemas de partículas. Para obtener un resumen amplio de los sistemas de administración de proteínas, véase, 55 Banga, A.J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas, y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, tal como una citotoxina o un fármaco, como núcleo central. En las microesferas, la sustancia terapéutica se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas de menos de alrededor de 1 µm se denominan 60 generalmente nanopartículas, nanoesferas, y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm, por lo que sólo se administran nanopartículas por vía intravenosa. Las micropartículas suelen tener alrededor de 100 µm de diámetro, y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véanse, por ejemplo, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, pág. 219-342 (1994); y Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, pág. 65 315-339, (1992).

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

## 20 G. Kits

En una realización, también se describen kits que emplean los CAR descritos aquí. Por ejemplo, kits para tratar un tumor en un sujeto, o producir una célula CAR T que exprese uno o más de los CAR descritos aquí. Los kits normalmente incluirán un anticuerpo descrito, un fragmento de unión a antígeno, un conjugado, una molécula de ácido nucleico, un CAR o una célula T que expresa un CAR como se describe aquí. Se puede incluir en el kit más de uno de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, moléculas de ácido nucleico, CAR o células T que expresan un CAR descritos.

30 El kit puede incluir un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con él. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente normalmente contiene una composición que incluye uno o más de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, moléculas de ácido nucleico, CAR o células T que expresan un CAR. En varios aspectos, el recipiente puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Una etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección particular.

40 La etiqueta o prospecto normalmente incluirá además instrucciones para el uso de anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, moléculas de ácido nucleico, CAR o células T que expresan un CAR descritos, por ejemplo en un método para tratar o prevenir un tumor o para obtener una célula CAR T. El prospecto normalmente incluye instrucciones habitualmente incluidas en paquetes comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos. Los materiales de instrucción pueden estar escritos, en formato electrónico (como un disquete de computadora o un disco compacto) o pueden ser visuales (como archivos de video). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la cual está diseñado el kit. Así, por ejemplo, el kit 45 puede contener adicionalmente medios para detectar un marcador (tales como sustratos enzimáticos para marcadores enzimáticos, conjuntos de filtros para detectar marcadores fluorescentes, marcadores secundarios apropiados tales como un anticuerpo secundario, o similares). Los kits pueden incluir adicionalmente amortiguadores y otros reactivos usados habitualmente para la práctica de un método particular. Dichos kits y contenidos apropiados son bien conocidos por los expertos en la técnica.

## 50 EJEMPLOS

55 Esta invención se ilustra mejor con los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse de ningún modo como que imponen limitaciones al alcance de la misma.

### EJEMPLO 1

**Aislamiento de anticuerpos específicos de CD22 a partir de una biblioteca de ScFv completamente humana y presentada en levadura y en fagos**

### 60 MATERIALES Y MÉTODOS:

#### a) Producción de anticuerpos humanos ScFv y específicos de CD22

65 Una biblioteca de presentación de fagos de ScFv humano sin tratamiento previo (fragmento monocatenario recombinante variable de inmunoglobulina) (diversidad aproximada,  $10^{10}$  especificidades únicas), construida a partir

de células B de sangre periférica de 50 donantes sanos (Z. Y. Zhu y D. S. Dimitrov, datos no publicados), se usó para la selección de los ScFv para la proteína CD19 humana recombinante (Miltenyi Biotec, no publicado). Se incubaron bibliotecas amplificadas de  $10^{12}$  ScFv presentados en fagos con 5, 3 y 1  $\mu$ g de CD22 recubierto en un volumen de 5 x 100  $\mu$ l, distribuidos equitativamente en 5 pocillos de una placa de 96 pocillos durante 2 h a temperatura ambiente 5 durante la primera, segunda y tercera rondas de ciclos de selección, respectivamente. Después de cada ronda de incubación, los pocillos se lavaron 5 veces para la primera ronda y 10 veces para las rondas posteriores con disolución salina amortiguada con fosfato que contenía Tween 20 (PBST) al 0,05%, para eliminar los fagos unidos de forma no específica; los fagos unidos se mezclaron con células competentes TG1 durante 1 hora a 37°C, y el fago se amplificó 10 a partir de las células infectadas y se usó en la siguiente ronda del ciclo de selección. Después de la tercera ronda del ciclo de selección, se seleccionaron aleatoriamente 380 clones de las células TG1 infectadas, y cada uno de ellos se 15 inoculó en 150  $\mu$ l de medio 2YT que contenía 100  $\mu$ g/ml de carbenicilina y 0,2% de glucosa en placas de 96 pocillos usando el sistema automatizado de selección de colonias BioRobotics BioPick (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI). 20 Después de que los cultivos bacterianos alcanzaron una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0,5, se añadieron al medio el fago auxiliar M13K07 con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y kanamicina a 50  $\mu$ g/ml (concentración final), y las placas se incubaron adicionalmente a 30°C durante la noche en un agitador a 250 rpm. Los sobrenadantes 25 de fagos se mezclaron con leche desnatada al 3% en PBS en una relación de volumen de 4:1, y se usaron para un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para identificar clones de fagos que presentan ScFv o VH con alta afinidad de unión a CD22. Los sobrenadantes se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con CD22 humano recombinante recubierto a 50 ng por pocillo en placas de 96 pocillos, y se lavaron cinco veces con PBST (después de la incubación durante la noche a 4°C, se bloqueó con leche desnatada al 3% en PBS, y se lavó tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%). Los fagos unidos a CD22 se detectaron usando anticuerpo anti-M13 de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después de la incubación con el anticuerpo, el anticuerpo unido no específicamente se eliminó lavando los pocillos, se añadió el sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), y se midió la absorbancia de la disolución a 450 nm (A450). Para una caracterización adicional, se seleccionaron clones que se unieron a CD22 con A450 de >1,0.

**b) Expresión y purificación de los ScFv solubles seleccionados**

30 Se secuenciaron el ADN de VH y VL de los clones seleccionados, y los ScFv codificados por clones con secuencias únicas se expresaron y purificaron como se describe a continuación. Para la transformación de células HB2151, se usaron plásmidos extraídos de estos clones. Se tomó una única colonia de la placa que contenía células recién transformadas, se inoculó en 200 ml de medio 2YT que contenía ampicilina 100  $\mu$ g/ml y glucosa al 0,2%, y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm. Cuando la OD del cultivo a 600 nm alcanzó 0,90, se añadió isopropil- $\beta$ -D-35 thiogalactopiranósido a una concentración final de 0,5 mM, y el cultivo se incubó adicionalmente durante la noche a 30°C. El pelete bacteriano se recogió después de la centrifugación a 8000 x g durante 20 minutos, y se resuspendió en amortiguador de PBS que contenía 0,5 mU de polimixina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Después de 30 minutos de incubación con rotación a 50 rpm a temperatura ambiente, el pelete resuspendido se centrifugó a 25 000 x g durante 25 minutos a 4°C, y el sobrenadante se usó para la purificación de ScFv usando la resina Ni-NTA siguiendo el protocolo 40 del proveedor (Qiagen).

**c) Ensayo de unión ELISA**

Para el análisis ELISA, 50  $\mu$ l del CD22 humano recombinante diluido en PBS a 2  $\mu$ g/ml se recubrieron en una placa de 96 pocillos a 4°C durante la noche. Los ScFv purificados con etiquetas His y Flag se diluyeron en serie, y se añadieron a los pocillos recubiertos con la proteína diana. Después de lavar, se añadió durante 1 hora a TA un anticuerpo anti-Flag conjugado con HRP diluido 1:3000. Después de lavar, se añadió sustrato 3, 3, 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB), se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N para detener la reacción después de la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos, y la OD se leyó a 450 nm para cuantificar la capacidad relativa de ScFv para unirse a CD22. 50

**d) Visualización en levadura de la biblioteca de scFv**

El mismo material de partida de ScFv que para la presentación en fagos también se incorporó en un sistema de presentación de ScFv en levadura. Para complementar el análisis de scFv basado en fagos, también se examinaron 55 bibliotecas de levadura que expresaban la biblioteca de scFv humano. Para enriquecer la levadura que expresa los scFv que se unen tanto al CD22-Fc recombinante como al CD19 expresado en la superficie celular de las células CHOK1, se llevó a cabo un ciclo de selección celular en CHOK1 transfectadas con células CD22. Para la primera ronda del ciclo de selección en la superficie celular, dos días antes del ciclo de selección, las células CHOK1-CD22 60 se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta un 50% de confluencia en medio F12 K. Después, se lavaron 5 x 10<sup>7</sup> células de levadura 2 veces con amortiguador de PBSA, y se resuspendieron en 3 ml de medio F12 K, y entonces se añadieron suavemente gota a gota a las células CHOK1-CD22. Después de balancear suavemente sobre hielo durante 2 horas, las células CHOK1-CD22 se lavaron 3 veces con PBSA enfriado con hielo, para eliminar las células de levadura que no se unieron a CHOK1-CD22, y entonces se usó tripsina-EDTA al 0,05% (Gibco) para disociar de la placa las células CHOK1-CD22 y las células de levadura unidas. La mezcla de células que contenía tanto la levadura como las células CHOK1 se inoculó entonces en 10 ml de medio SDCAA, y se amplificó durante la noche a 30°C, y después se indujo en medio SGCAA a 30°C durante 16 horas. Para la segunda ronda de ciclo de 65

selección celular, se llevó a cabo un protocolo similar al anterior, pero se usaron condiciones de lavado más rigurosas. Este método de ciclo de selección produjo los aglutinantes 16P, 24P, 25P, 11S y 12S. Las secuencias de los aglutinantes se incorporaron en constructos de CART como se describe en el Ejemplo 2, más abajo, en una serie de ensayos funcionales de CART *in vitro*. La caracterización de estos aglutinantes a partir de la presentación en fagos en

5 formato de CART reveló que solo el aglutinante 16P tenía actividad lítica tumoral específica *in vitro*, pero era baja en comparación con el control positivo de CAR. Además, cuando se evaluaron células CART basadas en 16P en un modelo de xenoinjerto *in vivo*, su función antitumoral fue muy débil (Ejemplo 2, más abajo). En conjunto, estos resultados indicaron que se requería la maduración de la afinidad de los aglutinantes ScFv anti-CD22, ya que las 10 características biológicas del CAR creado a partir de este conjunto de aglutinantes aún no eran óptimas.

10 Para aumentar la afinidad de 16P, se creó una biblioteca de scFv mutante con presentación en levadura mediante el uso de PCR propensa a errores, para crear mutaciones puntuales aleatorias en secuencias del gen scFv. Después de la electroporación, la biblioteca de mutantes resultante se cultivó durante la noche a 30°C durante 16 horas en medio SDCAA, y después se cambió a medio SGCAA a 30°C durante otras 16 horas. Después, la biblioteca de mutantes se 15 clasificó a través de MACS (columna inmunomagnética, Miltenyi Biotec) con CD22-Fc como antígeno de captura, para reducir el tamaño de la biblioteca y aumentar la población de mutantes que podrían unirse a CD22-Fc. Los aglutinantes más fuertes se seleccionaron entonces mediante tinción doble de los grupos con Anti-c-Myc-Alexa 488 y CD19-Fc/Anti-Hu-Fc, y seleccionando los aglutinantes que tenían las afinidades de unión más altas, así como los niveles de 20 expresión de c-Myc. Este procedimiento se repitió entonces dos veces más, hasta que la citometría de flujo de partículas de levadura con antígeno marcado fluorescentemente produjo afinidades de unión promedio de los grupos de mutantes que aumentaron con respecto al constructo de partida. Las afinidades de unión se estimaron mediante citometría de flujo de conjuntos de levadura usando cantidades decrecientes de CD22 marcado. Este procedimiento dio como resultado un aumento de EC50 (concentración efectiva para el 50% de unión de CD19 marcado en levadura que presenta ScFv) para 16P de 0,5 ug/ml a una afinidad de <0,01 ug/ml para los aglutinantes madurados por afinidad 25 (16P1, 16P2, 16P3, 16P3v2, 16P6, 16P8, 16P10, 16P13, 16P15, 16P16, 16P17, 16P20, 16P20v2).

## RESULTADOS:

30 Debido a los retos únicos de la estructura de CD22, los candidatos a presentación en fagos no produjeron suficientes constructos de CAR funcionales con alta actividad biológica y especificidad. Por lo tanto, se generaron mediante presentación en levadura ScFv para aglutinantes biológicamente activos y altamente específicos. Según el análisis de citometría de flujo de ScFv presentado en levadura, se identificaron trece clones de ScFv específicos para CD22 humano recombinante, y se marcaron como aglutinantes de ScFv anti-CD22 humano 16P (LTG2202, clon fundador, 35 EC50 de 0,5 ug/ml), y los siguientes aglutinantes madurados por afinidad (EC50 <0,01 ug/ml): 16P1, 16P2, 16P3, 16P3v2, 16P6, 16P8, 16P10, 16P13, 16P15, 16P17, 16P20, y 16P20v2 respectivamente. La generación de los CAR que expresan los aglutinantes anti-CD22 humanos LTG2203, LTG2205, LTG2206, LTG2207, LTG2208, LTG2209, LTG2210, LTG2216, LTG2217, LTG2218, LTG2219, y LTG2220 se describe en el Ejemplo 2, más abajo.

## EJEMPLO 2

### 40 CAR que expresan secuencias de unión totalmente humanas anti-CD22.

CD22 de *Homo sapiens* (SIGLEC-2, Leu14) es una glicoproteína de la superficie celular bien investigada que se 45 expresa en leucemias y linfomas de células B. Al menos dos fármacos de anticuerpos anti-CD22 (Inotuzumab Ozogamicina) o conjugados de inmunotoxina (Moxetumomab Pasudotox) han sido objeto de ensayos clínicos (NCT02981628, NCT00659425). Estos enfoques han tenido cierto éxito, y todavía se están investigando, por ejemplo en combinación con otros agentes quimioterapéuticos (Muller F, Stookey S, Cunningham T, Pastan I, 2017, Paclitaxel synergizes with exposure time adjusted CD22-targeted immunotoxins against B-cell malignancies, *Oncotarget* 8:30644-30655). Sin embargo, dados los avances actuales en la terapia basada en células T con los CAR anti-CD19, 50 el mejor enfoque para atacar las neoplasias que expresan CD22 puede ser la inmunoterapia basada en células. La terapia con el CAR anti-CD22 basado en m971 se encuentra actualmente en ensayo clínico en el National Cancer Institute (NCT02315612, P.I.: Terry Fry, M.D.), aunque los resultados aún no se han publicado. Los constructos de CAR presentados aquí son un nuevo enfoque innovador para crear e implementar nuevos restos de unión a CD22 derivados de secuencias humanas, y dado el intervalo de citotoxicidad y capacidades de producción de citocinas de 55 cada constructo, se pueden observar *in vivo* perfiles de actividad muy diferentes.

60 Los nuevos constructos de CAR-T anti-CD22 descritos aquí tienen altos niveles de expresión en la superficie celular en células T humanas primarias, y funciones citotóxicas y de citocinas específicas y potentes contra células tumorales CD22 positivas. Los CAR anti-CD22 se diseñaron usando secuencias de unión a CD22 derivadas de candidatos de ScFv identificados inicialmente mediante presentación en fagos, como en el Ejemplo 1, y para la caracterización se 65 clonaron en vectores de expresión lentivirales que contenían dominios estructurales y de señalización seleccionados, bajo el control del promotor EF1a, y se evaluaron *in vitro* para determinar la eficiencia de la transducción, la función de destrucción y la producción de citocinas tanto en líneas celulares modelo como en células T humanas primarias. La Tabla 1 resume la nomenclatura usada. Constructo de CAR LTG1538, un CAR anti-CD19, sirve como control positivo y un comparador. El CAR m971 LTG2200 se usa como control positivo de CAR anti-CD22.

Tabla 1: Números de constructos LTG y designaciones de aglutinantes de ScFv correspondientes usados en el diseño de CAR anti-CD22 completamente humanos

Constructo de CAR LTG#	Designación de aglutinante de ScFv	Descripción del constructo del CAR
2200	m971	Control positivo CAR22
2202	16P	Nuevo constructo
2246	24P	Nuevo constructo
2247	25P	Nuevo constructo
2248	11S	Nuevo constructo
2249	12S	Nuevo constructo
2203	16P3	Nuevo constructo
2204	16P16	Nuevo constructo
2205	16P20	Nuevo constructo
2206	16P2	Nuevo constructo
2207	16P6	Nuevo constructo
2208	16P10	Nuevo constructo
2209	16P17	Nuevo constructo
2210	16P20v2	Nuevo constructo
2216	16P1	Nuevo constructo
2217	16P3v2	Nuevo constructo
2218	16P8	Nuevo constructo
2219	16P13	Nuevo constructo
2220	16P15	Nuevo constructo
1538	FMC63	CAR específico para CD19
UTD	N/A	Células T no transducidas

## MATERIALES Y MÉTODOS:

5 (a) Líneas celulares  
 La línea celular Raji de linfoma de Burkitt y la línea de leucemia mielógena crónica K562 se adquirieron de la American  
 10 Tissue Culture Collection (ATCC, Manassass, VA). Las líneas de leucemia REH y NALM-6 se adquirieron de DSMZ  
 (Leibniz Institute DSMZ, Braunschweig, Alemania). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con  
 suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (FBS, Hyclone, Logan, UT) y L-Glutamax 2 mM (Thermo Fisher Scientific,  
 15 Grand Island, NY). La línea de riñón embrionario humano 293T se adquirió de ATCC (Gibco/Thermo Fisher Scientific,  
 Grand Island, NY). Se generaron clones unicelulares de líneas celulares que expresan luciferasa mediante la  
 20 transducción estable de líneas tumorales de tipo salvaje con un vector lentiviral que codifica la luciferasa de luciérnaga  
 (Lentigen Technology, Inc., Gaithersburg, MD), seguido de la clonación y selección de clones positivos para luciferasa.  
 Se recogió sangre entera o capas leucocitarias de voluntarios sanos en el Oklahoma Blood Institute (OBI, Oklahoma  
 25 City, OK) con el autorización firmada de los donantes. Las células T humanas CD4 positivas y CD8 positivas se  
 purificaron de las capas leucocitarias mediante selección positiva usando una mezcla 1:1 de MicroPerlas CD4 y CD8  
 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) según el protocolo del fabricante.

20 (b) Creación de receptor de antígeno químérico (CAR) - vectores de expresión

25 Las secuencias de los dominios de unión al antígeno de CAR, ScFv, derivaron de ScFv anti-CD22 humano o de  
 fragmentos variables de cadena pesada. Los constructos de CAR T se generaron uniendo la secuencia del aglutinante  
 y después al dominio de señalización 4-1BB (CD137, aa 214-255, ID de secuencia de referencia UniProt Q07011) y al dominio de  
 30 señalización CD3 zeta (CD247, aa 52-163, ID de secuencia de referencia: NP\_000725.1). Las secuencias de  
 constructos de CAR se clonaron en un esqueleto de plásmido lentiviral de tercera generación (Lentigen Technology  
 Inc., Gaithersburg, MD). Los sobrenadantes que contenían vector lentiviral (LV) se generaron mediante transfección  
 transitoria de células HEK 293T, y los LV se sedimentaron mediante centrifugación de sobrenadantes que contenían  
 LV, y se almacenaron a -80°C.

**(c) Purificación y transducción de células T primarias**

Células T primarias humanas de voluntarios sanos se purificaron a partir de sangre completa o capas leucocitarias usando selección con perlas inmunomagnéticas de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania). Las células T se cultivaron en medio TexMACS suplementado con 200 UI/ml de IL-2 a una densidad de 0,3 a 2 x 10<sup>6</sup> células/ml, se activaron con reactivo CD3/CD28 MACS® GMP T Cell TransAct (Miltenyi Biotec), y se transdijeron el día 2 con vectores lentivirales que codifican constructos de CAR, en presencia de 10 ug/ml de sulfato de protamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante la noche, y el medio se intercambió el día 3. Los cultivos se propagaron en medio TexMACS suplementado con 200 UI/ml de IL-2 hasta la recolección el día 8-13.

**10 (d) Ensayos de efectores inmunes (CTL y citocinas)**

Para determinar la citotoxicidad mediada por células (ensayo de CTL), se combinaron 5.000 células diana transducidas de manera estable con luciferasa de luciérnaga con células CAR T en diversas relaciones efector-diana, y se incubaron durante la noche. Se añadió reactivo SteadyGlo (Promega, Madison WI) a cada pocillo, y la luminiscencia resultante se cuantificó como recuentos por segundo (CPS de la muestra). Se usaron pocillos con diana solamente (CPS máx.) y pocillos con diana solamente más Tween-20 al 1% (CPS mín.), para determinar el intervalo del ensayo. El porcentaje de lisis específica se calculó como: (1-(CPS de la muestra-CPS mín.)/(CPS máx.-CPS mín.)). Los sobrenadantes de los cocultivos en una relación E:T de 10:1 se retiraron y se analizaron mediante ELISA (eBioscience, San Diego, CA) para determinar la concentración de IFNy, TNF $\alpha$  e IL-2.

**20 (e) Análisis de citometría de flujo**

Para la tinción celular, se recogieron del cultivo medio millón de células transducidas con CAR T, se lavaron dos veces en amortiguador AutoMACS frío suplementado con seroalbúmina bovina al 0,5% (Miltenyi Biotec), y la expresión de la superficie del CAR se detectó mediante tinción con péptido CD22-Fc, seguido de conjugado anti Fc-PE (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se usó anticuerpo anti-CD4 conjugado con el fluoróforo VioBlue (Miltenyi Biotec) cuando se indicó, según el protocolo de los proveedores. Se usaron células no transducidas como controles negativos. Las células muertas en todos los estudios se excluyeron mediante tinción con 7AAD (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se lavaron dos veces, y se resuspendieron en 200 ul de amortiguador de tinción antes del análisis cuantitativo mediante citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó en un analizador MACSQuant® 10 (Miltenyi Biotec), y los gráficos de datos se generaron usando el software FlowJo (Ashland, OR).

**(f) Análisis *in vivo* de la función de CAR**

35 Todos los estudios en animales fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de MI Bioreserach (Ann Arbor, MI). Se inyectaron medio millón de células Raji-luc adaptadas a ratón en la vena de la cola de ratones NSG (*NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ*). El día 6 después de la inyección de Raji-luc, se midió el injerto tumoral mediante inyección *i.p.* de 150 mg/kg de luciferina y obtención de imágenes en un instrumento Xenogen IVIS-200 (Caliper Biosciences, ahora Perkin Elmer, Shelton, Connecticut). Las imágenes se analizaron usando el software Living Image, versión 4.1 (Perkin Elmer), y el flujo de señal bioluminiscente para cada ratón se expresó como radiancia promedio (fotones por segundo por cm<sup>2</sup> por estereorradián). Se administraron células CAR T a ratones mediante inyección en la vena de la cola el Día 7. La formación de imágenes se llevó a cabo en los días indicados después de la inyección de CAR T, para establecer la cinética del crecimiento del tumor y la erradicación por parte de las células CAR T.

**45 RESULTADOS:**

50 Para evaluar las nuevas secuencias de unión de ScFv totalmente humano anti-CD22, se diseñaron constructos de CAR en el Conjunto 1 que incorpora los constructos 2246-2249: Secuencias de ScFv derivadas de la biblioteca de presentación en fagos, Tabla 1, ScFv1 (16P), ScFv2 (24P), ScFv3 (25P), ScFv4 (11S), ScFv5 (12S), y constructo de CAR 2202 (control positivo m971), como dominio de unión al antígeno del tumor. En cada diseño de CAR, el dominio de direccionamiento tumoral fue seguido por un enlazador y dominios transmembrana derivados de la proteína CD8 humana, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización CD3 zeta (Tabla 2, más abajo).

55 Tabla 2: Lista de CD22 - constructos de CAR seleccionadores de dianas que incorporan secuencias ScFv

	<b>Constructo de CAR LTG#</b>	<b>Composición</b>
Conjunto 1	2202	ScFv1-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2246	ScFv2-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2247	ScFv3-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2248	ScFv4-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
Conjunto 2	2249	ScFv5-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2203	ScFv6-CD8 TM-41BB-CD3 zeta

	Constructo de CAR LTG#	Composición
	2204	ScFv7-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2205	ScFv8-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2206	ScFv9-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2207	ScFv10-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2208	ScFv11-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2209	ScFv12-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2210	ScFv13-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2216	ScFv14-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2217	ScFv15-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2218	ScFv16-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2219	ScFv17-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	2220	ScFv18-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
	1538	FMC63-CD8 TM-41BB-CD3 zeta
Controles	2200	m971-CD8 TM-41BB-CD3 zeta

Las células T transducidas con receptores de antígeno quiméricos anti-CD22 demuestran expresión de superficie y actividad citolítica.

5 a) Expresión de superficie de los CAR anti-CD22

Para evaluar los nuevos CAR anti-CD22, vectores lentivirales (LV) que codifican constructos de CAR bajo el control del promotor EF1a humano se generaron como se describe en *Materiales y Métodos*. Se transdijeron células T primarias humanas derivadas de donantes sanos con vectores lentivirales que codifican los CAR. Las células no transducidas del mismo donante (denominadas UTD o simuladas) o las células transducidas con GFP del mismo donante sirvieron como controles negativos. Los datos son representativos de los resultados de al menos 3 ensayos de diferentes donantes.

TABLA 3. Resumen de la función in vitro de los CAR dirigidos contra CD22

Med: medio, CTL: respuesta de linfocitos T citotóxicos (lisis de células diana), NA: datos no disponibles, no: sin lisis

	CAR LTG#	Composición	ScFv del aglutinante	CTL	Respuesta de citocinas	CTL independientes del ligando (K562, K562-19)	CAR sólo IL-2	CAR sólo TNFa	CAR sólo IFNg
Conjunto 1	2202	ScFv1-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P	med	med	bajo	bajo	bajo	bajo
	2246	ScFv2-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	24P	bajo	NA	NA	NA	NA	NA
	2247	ScFv3-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	25P	no	NA	NA	NA	NA	NA
	2248	ScFv4-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	11s	no	NA	NA	NA	NA	NA
	2249	ScFvs-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	12s	no	NA	NA	NA	NA	NA
Conjunto 2	2203	ScFv6-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P3	alto	alto	alto	bajo	med	alto
	2204	ScFv7-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P16	alto	alto	alto	bajo	med	alto
	2205	ScFv8-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P20	alto	alto	alto	bajo	med	alto
	2206	ScFv9-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P2	alto	alto	alto	bajo	med	alto
	2207	ScFv10-cD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P6	alto	alto	alto	bajo	med	alto

Med: medio, CTL: respuesta de linfocitos T citotóxicos (lisis de células diana), NA: datos no disponibles, no: sin lisis									
	CAR LTG#	Composición	ScFv del aglutinante	CTL	Respuesta de citocinas	CTL independientes del ligando (K562, K562-19)	CAR sólo IL-2	CAR sólo TNFa	CAR sólo IFNg
	2208	ScFv11-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P10	alto	alto	alto	bajo	med	alto
	2209	ScFv12-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P17	alto	alto	alto	bajo	bajo	bajo
	2210	ScFv13-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P20v1	alto	alto	alto	bajo	med	alto
	2216	ScFv14-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P1	alto	alto	alto	bajo	med	alto
	2217	ScFv15-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P3v2	alto	alto	alto	bajo	med	alto
	2218	ScFv16-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P8	alto	alto	alto	bajo	bajo	bajo
	2219	ScFv17-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P13	alto	alto	alto	bajo	med	med
	2220	ScFv18-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	16P15	alto	alto	alto	bajo	med	alto
Controles	2200	m971-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	m971	alto	alto	bajo	bajo	bajo	bajo
	1538	FMC63-CD8 TM-41BB-CD3 zeta	FMC63	alto	alto	bajo	bajo	bajo	bajo

Las células T se activaron el Día 0 del cultivo con el reactivo de células T TransAct (Miltenyi Biotec, Inc.) en presencia de IL-2 como se describe en *Materiales y Métodos*. En los días 8-10 de cultivo, la expresión de los CAR anti-CD22 en la superficie de las células T transducidas se detectó mediante proteína L conjugada con biotina, seguido de tinción con reactivo de estreptavidina-PE. Alternativamente, se usó el péptido CD22-Fc (R&D Systems, Inc.), seguido de tinción con anticuerpo anti-Fc-PE para la tinción de CART, y los datos se adquirieron mediante citometría de flujo (Figura 3). Excepto CAR 2247, que está compuesto por una cadena ligera lambda (y por lo tanto no reacciona con la proteína L), todos los constructos de CAR demostraron una expresión de CAR en la superficie por encima de 50-70%, según lo detectado mediante tinción con proteína L. Por el contrario, sólo CAR16P demostró expresión de CAR (~30%) cuando se usó la tinción del péptido CD22-Fc, que se asocia específicamente con el sitio de unión al antígeno ScFv anti-CD22 (no se muestra CAR 24P). Estos datos indican que mientras que la mayoría de los constructos de CAR se expresaron en la superficie de las células T, sólo el constructo de CAR16P había asumido una configuración de ScFv que mantenía la unión a la proteína CD22.

5 Las células T se activaron el Día 0 del cultivo con el reactivo de células T TransAct (Miltenyi Biotec, Inc.) en presencia de IL-2 como se describe en *Materiales y Métodos*. En los días 8-10 de cultivo, la expresión de los CAR anti-CD22 en la superficie de las células T transducidas se detectó mediante proteína L conjugada con biotina, seguido de tinción con reactivo de estreptavidina-PE. Alternativamente, se usó el péptido CD22-Fc (R&D Systems, Inc.), seguido de tinción con anticuerpo anti-Fc-PE para la tinción de CART, y los datos se adquirieron mediante citometría de flujo (Figura 3). Excepto CAR 2247, que está compuesto por una cadena ligera lambda (y por lo tanto no reacciona con la proteína L), todos los constructos de CAR demostraron una expresión de CAR en la superficie por encima de 50-70%, según lo detectado mediante tinción con proteína L. Por el contrario, sólo CAR16P demostró expresión de CAR (~30%) cuando se usó la tinción del péptido CD22-Fc, que se asocia específicamente con el sitio de unión al antígeno ScFv anti-CD22 (no se muestra CAR 24P). Estos datos indican que mientras que la mayoría de los constructos de CAR se expresaron en la superficie de las células T, sólo el constructo de CAR16P había asumido una configuración de ScFv que mantenía la unión a la proteína CD22.

### 10 15 b) Ensayo citolítico y ensayo de citocinas de los CAR anti-CD22

Para demostrar la función citolítica de las células CAR T generadas, se realizó un ensayo de muerte celular basado en luciferasa combinando CAR-T con células Raji-luc positivas para CD22, células Reh-luc positivas para CD22, células K562-luc negativas para CD22 en relaciones E:T de 20:1, 10:1, 5:1 o 2,5:1 en ensayos de muerte celular 20 durante la noche como se describe en *Materiales y Métodos* (Figura 4). Como control positivo, se utilizó el constructo de CAR anti CD19 1538, que previamente se demostró que reaccionaba con las líneas Raji y Reh (CD19<sup>+</sup>) pero no con K562 (CD19<sup>-</sup>). Sólo CAR2202 (aglutinante 16P) mostró una destrucción de tumores específica de CD22 dependiente de la dosis, mientras que los CAR 2247 (25P), 2248 (11S) y 2249 (12S) no tuvieron actividad específica de tumores.

25 30 Después de determinar que el nuevo constructo humano CAR2202 (16P) es funcional *in vitro*, se evaluó su actividad antitumoral *in vivo*, en un modelo de xenoinjerto de ratón NSG establecido de linfoma de Burkitt Raji, como se describe en *Material y métodos*. Los tumores se implantaron a través de la vena de la cola el día 0, la estadificación se realizó el día 6, y los ratones se trataron con  $4 \times 10^6$  células CART *i.v.* el día 7. Los grupos de tratamiento fueron CAR16P (2202), control positivo CAR19 (1538), control positivo CAR22 (2200 m971) y control negativo UTD (células T no transducidas). Como se muestra en la Figura 5, las preparaciones de CART de control positivo, CAR22 (2200 m971) y CAR19 (1538), inhibieron eficazmente el crecimiento del tumor desde el día 18 del estudio en adelante, mientras que el constructo de ensayo CAR 2202 (16P) sólo ralentizó levemente la progresión del tumor, y su efecto ya no fue discernible a partir del tratamiento de control negativo (UTD) después del día 32 del estudio. Por lo tanto, el aglutinante

de ScFv 2202 (16P) tuvo sólo una débil actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*, y existía la necesidad de generar constructos de CAR adicionales que incorporaran secuencias de aglutinante de ScFv mejoradas.

Un conjunto 2 de constructos de CAR (números LTG 2203-2220), que incorporan secuencias de aglutinantes de ScFv con afinidad mejorada por CD22 (Tabla 1, más abajo, Conjunto 2), se construyó como se describe en *Materiales y métodos*. La derivación de los aglutinantes de ScFv de afinidad mejorada se describe en el Ejemplo 1. Se generaron constructos de CAR del Conjunto 2 que codifican LV bajo el control del promotor EF1a humano, y se evaluaron *in vitro* para determinar su expresión y función como se describió anteriormente. Brevemente, las células T se activaron el Día 0 del cultivo con reactivo de células T TransAct (acoplamiento activo de los antígenos CD3 y CD28, Miltenyi Biotec, Inc.) en presencia de IL-2 como se describe en *Materiales y métodos*. En los Días 8-10 del cultivo, se recolectaron células CAR T, y se evaluaron para determinar la expresión de la superficie de CAR mediante citometría de flujo. La actividad de CTL se evaluó mediante un ensayo de coincubación, y la secreción de citocinas inflamatorias se evaluó mediante ELISA. En la Tabla 3 se proporciona un resumen comparativo de los resultados funcionales de todos los constructos de CAR22. Los constructos de CAR de control positivo, así como los nuevos candidatos CAR22 con el perfil funcional más favorable, se indican en negrita.

El conjunto 2 de constructos de CAR (números LTG 2203-2220) se evaluaron transducido secuencias de CAR codificadas por LV en células de donantes independientes, en al menos tres experimentos separados. La transducción de constructos de CART del Conjunto 2 en células donantes normalmente produjo una expresión de CAR que oscilaba entre el 20% y el 80%, según se detectó mediante el método de tinción de CD22-Fc, y consistió principalmente en células T CD4+ (Figura 6, constructos seleccionados).

La actividad de CTL de CAR se determinó en un ensayo durante toda la noche co-incubando células CART con células tumorales que expresan luciferasa en relaciones E:T que oscilan de 10:1 a 2,5:1 (Figura 7). Se determinó la actividad de luciferasa residual que se origina en la porción superviviente de la población de células tumorales al final del período de cultivo, y se calculó el % de lisis como se describe en *Materiales y métodos*. Las nuevas células CAR dirigidas contra CD22 demostraron una fuerte actividad letal en el linfoma Raji CD22+ y en las líneas de leucemia Reh, mientras que los grupos de control negativo GFP y UTD no causaron lisis (Figura 7A). La excepción a esta regla fue el constructo 2202 (16P), que produjo una destrucción relativamente modesta de líneas tumorales. El control 1538 dirigido contra CAR19 y el control 2200 (m971) dirigido contra CD22 eliminaron los tumores de Raji y Reh, como se esperaba. La línea K562, que es CD22- y CD19-, mostró actividad de destrucción de fondo para los constructos de control positivo 2202 y 1538, que lisaron 40% y 60% de células tumorales en una relación E:T de 10:1, respectivamente. Esta actividad puede deberse al efecto indirecto de las citocinas inflamatorias segregadas por las células CART, o a la actividad contaminante de NK/NKT. La actividad letal de los constructos de CAR22 de ensayo frente a K56 fue comparable en magnitud al control 2200 (m971), o ligeramente mayor. Para delinear aún más la especificidad de los nuevos constructos de CAR22, empleamos células K562 diseñadas para expresar de manera estable CD22 o CD19 (Figura 7B).

En la línea K562-CD19, el control positivo CAR19 (1538) produjo -70% de lisis para E:T 10:1, mientras que la actividad de destrucción de fondo del control CAR22 2200 (m971) fue de sólo -20% para la relación E:T de 10:1. Por el contrario, el % de lisis producido por la mayoría de los constructos de CAR22 de ensayo bajo la misma relación E:T estuvo entre 20% y 60%.

En comparación, en la línea K562-CD22, la actividad de CTL específica del control CAR CD22 CAR22 2200 (m971) y la mayoría de los nuevos constructos de CAR22 fue del 80%, mientras que la actividad de destrucción no específica del control CAR19 1538 fue sólo del 20%. Por lo tanto, a pesar de la sensibilidad de la línea K562 a los constructos de CAR, todos los nuevos CAR CD22 ensayados demostraron actividad lítica específica contra dianas que expresan CD22.

Después, se midió la concentración de citocinas inflamatorias IFN-gamma, TNF-alfa e IL-2 segregadas por células CAR T transducidas con constructos de CAR22, cuando se expusieron a líneas celulares CD22 positivas Raji y REH (Figura 8). Se incluyeron controles de células CAR T solas para cada constructo, con el fin de evaluar los niveles basales de producción de citocinas. Los niveles de TNF-alfa, IFN-gamma e IL-2 fueron fuertemente inducidos por células T expuestas a células Raji CD22+; sin embargo, para la mayoría de los constructos de CAR22, los tumores de Reh mediaron la inducción de IFNg y TNFa solamente, pero no IL-2. Para un subconjunto de constructos, los grupos de control de solamente células T también mostraron inducción de citocinas, lo que plantea la posibilidad de que estos constructos se activen en ausencia de ligandos específicos. Por lo tanto, el diseño del CAR y la elección del aglutinante no son triviales, ya que algunos aglutinantes activos en un formato de IgG o ScFv soluble y susceptibles de expresión en la superficie de las células T en un formato CAR T, son, sin embargo, ineficientes para destruir o producir citocinas cuando se co-incuban con tumores CD22-positivos. En el caso de LTG2217 (aglutinante de 16P3v2) y LTG 2220 (16P15), por ejemplo, el constructo produjo tópicamente IL-2 y TNF-alfa, lo que indica la autoactivación de la célula T en ausencia de una diana tumoral. Es probable que esto resulte tóxico para uso clínico, y por lo tanto LTG2217 y LTG2220 están descalificados como candidatos terapéuticos.

Para evitar la posibilidad de activación no específica de las células CAR22, hemos identificado constructos con secreción mínima o nula de citocinas inflamatorias en ausencia de tumores específicos: LTG2209 (16P17), LTG2218 (16P8) y LTG2219 (16P13).

- 5 A continuación, se probaron los nuevos constructos de CAR22 2219 y 2209 en el modelo de tumor de xenoinjerto NSG Raji. Los constructos 2200 (m971) y 1538 (FMC63) sirvieron como controles positivos, y el tumor solo (TA) y las células T no transducidas (UTD) sirvieron como controles negativos. Los procedimientos experimentales se realizaron como se detalla en *Materiales y métodos*. Se implantaron en ratones células tumorales que expresaban Raji-luciferasa el día 0, seguido del tratamiento con CART el día 7. La progresión del tumor y la actividad de CART se determinaron mediante medidas semanales de bioluminiscencia a partir del día 6 del estudio (Figura 9). En comparación con los grupos de control negativo, TA y UTD, en los que el crecimiento del tumor continuó sin disminuir desde el día 6 en adelante, los constructos de CAR de ensayo 2209 y 2209 inhibieron la progresión del tumor, y hacia el día 21 redujeron la bioluminiscencia del tumor al valor inicial al inicio del tratamiento (día 6). El efecto antitumoral de los constructos de ensayo 2209 y 2209 fue igual o mayor que el producido por el constructo de CAR anti-CD22 de control positivo 2200 (m971).

10 En resumen, se demostró la alta funcionalidad de los nuevos constructos de CAR anti-CD22 totalmente humanos y de afinidad mejorada derivados de la biblioteca de detección de levaduras, números LTG 2203 a 2220 (Tabla 2, más abajo). En particular, los constructos de CAR, 2209, 2219, 2218, fueron superiores o mostraron un perfil de actividad 15 diferente al control positivo, LTG2220 (m971), y por lo tanto se espera que tengan una potente actividad terapéutica.

## SECUENCIAS DE LA DESCRIPCIÓN

20 Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos que se enumeran a continuación se muestran usando abreviaturas de letras estándar para bases nucleotídicas, y códigos de tres letras para aminoácidos, como se define 25 en 37 C.F.R. 1.822. Sólo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida por cualquier referencia a la hebra presentada. En el listado de secuencia adjunto:

30 **SEQ ID NO: 1** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv1) 16P:

CAAGTACAACCTCCAGCAAAGCGGGCTGGTCTGGTGAAGCCGTACAGAC  
GCTTCACTTACGTGCGATCTCCGTGACTCCGTGAGTTCTAATAGCGC  
GGCTTGGAACTGGATTAGGCAGTCTCCATCCGAGGATTGGAATGGCTCG  
GCAGGACTTATTATAGAAGTAAGTGGTACAACGATTATGCAGTCTCTGTG  
AAATCTCGCATCACCATTAAACCCAGACACGTCTAAGAATCAGITCAGTCTT  
CAACTCAACTCTGTAACCCCCGAAGATAACAGCGGTCTACTACTGTGCTCA  
GGAGGTGCAACCCCCACGATGCTTTGATATCTGGGGCCAGGGTACCATGG  
TTACGGTGTCTTCTGGGGGAGGGGGGTCCGGTGGGGGAGGGATCAGGGGGT  
GGGGGCAGCGACATAAAATGACGCAATCCCCGTCTTCTGTTCTGCGTCT  
GTCGGAGATAAAAGTAAACAATAACCTGTCGAGCGTCACAGGACGTTAGTGG  
CTGGCTTGCCTGGTATCAGCAAAAACCGGGGCTGCCCGCAATTGCTTA  
TATTGGAGCGAGTACTCTTCAGGGCGAGGTACCTAGCAGATTTCTGGGT  
CCGGCTCAGGTACGGACTTCACCCCTGACCATACTAGCTTGCAGCCTGAA  
GATTTCGCCACCTACTATTGTCAACAGGCGAAGAACTTCCATATACGTTC  
GGCAGGGTACGAAATTGGAGATAAAA

35 **SEQ ID NO: 2** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv1) 16P:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
TYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVTQ  
PHDAFDIWQQGTMVTVSSGGGSGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDK  
VTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLIFGASTLQGEVPSRFSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFATYYCQQAKNPYTFGQGKLEIKR

40 **SEQ ID NO: 3** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2202 (LP-scFv1-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCA  
TTCCTCCTGATCCCACAAGTACAACCTCCAGCAAAGCGGGCTGGTCTGGT  
GAAGCCGTACAGACGCTTCACTTACGTGCGATCTCCGGTACTCCGT  
GAGTTCTAATAGCGCGGCTTGGAACTGGATTAGGCAGTCTCCATCCCGAG

GATTGGAATGGCTCGGCAGGACTTATTATAGAAGTAAGTGGTACAACGAT  
 TATGCAGTCTCTGTGAAATCTGCATCACCATAACCCAGACACGTCTAAG  
 AATCACTTCAGTCTCACTCACTCTGAACCCCCGAAGATAACACGGT  
 CTACTACTGTGCTCAGGAGGTGCAACCCCACGATGCTTGATATCTGGG  
 CCAGGGTACCATGGTTACGGTGTCTCTGGGGAGGGGGTCCGGTGGG  
 GAGGATCAGGGGTGGGGCAGCGACATAAAATGACGCAATCCCCGTC  
 TTCTGTTCTCGCTGTGGAGATAAAGTAACAATAACCTGTCGAGCGTC  
 ACAGGACGTTAGTGGCTGGCTGCGTGGTATCAGCAAAACCGGGCTCG  
 CCCCAGAATTGCTTATATTGGAGCGAGTACTCTCAGGGCGAGGTACCTA  
 GCAGATTTCTGGTCCGGCTCAGGTACGGACTTCACCCGACCATATCTA  
 GCTGAGCCTGAAGATTGCCCACCTACTATTGCAACAGGCGAAGAAC  
 TTTCATATACGTTGGCAGGGTACGAAATTGGAGATAAAAGCGGCCGC  
 AACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCGACTCCGGCCCCAACATCGCAA  
 GCCAACCCCTCTCCTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCGGCGGGTGG  
 GCCGTGCATACCCGGGGCTGGAECTTGCGTGCATATCTACATTGGCC  
 CCGCTGGCCGGCACTTGCCTGCTGCTGCGTGGCATCACCTT  
 TACTGCAAGAGGGGCCGAAGAACGCTGCTTACATCTCAAGCAGCGTT  
 CATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTGTCAGA  
 TTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCAG  
 GTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTAACAG  
 AGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACCTGCTGGACAAGCGACG  
 CGGACGCGACCCGGAGATGGGGGAAACCACGGCGAAAAACCCCTAG  
 GAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACT  
 CAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGAAAGGGTACGACG  
 GGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCCTG  
 CATATGCAAGCACTCCCACCCCG

**SEQ ID NO: 4** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2202 (LP-scFv 1-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLSNVPEDTAVYYCAQEVPQPHDAFDIWIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGG  
 GGSIDIQMTQSPSSVSASVGDKVITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLIF  
 GASTLQGEVPSRFSGSQSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFQGQT  
 KLEIKAATTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLYIFKQPFMRPVQTTQEE  
 DGCSCRFPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE  
 NLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY  
 SEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5

**SEQ ID NO: 5** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 (16P) LCDR1:

QDV SGW

10

**SEQ ID NO: 6** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 (16P) LCDR2:

GAS

15

**SEQ ID NO: 7** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 (16P) LCDR3:

QQAKNFPYT

20

**SEQ ID NO: 8** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 (16P) HCDR1:

GDSVSSNSAA

25

**SEQ ID NO: 9** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 (16P) HCDR2:

TYYRSKWYN

**SEQ ID NO: 10** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 (16P) HCDR3:

AQEVPQPHDAFDI

**SEQ ID NO: 11** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv2) 24P:

CAAGTACAGCTGCAACAACTCTGGCCCTGGCTTGTGAAACCCCTCTCAGAC  
 TTTGTCTTGACGTGCGCGATAAGTGGCGATTAGCTAGTTCTAACAGCGC  
 CGCTTGGAACTGGATTAGACAGAGCCCCAGTCGGGGACTCGAATGGCTTG  
 GCCGGACTTATTATCGCAGTAAATGGTATAATGATTATGCTGTGAGTGTGA  
 AAAGTAGGATCACAACTCAACCCCGATACGAGCAAGAATCAATTCTCATTG  
 CAACTGAACACAGCGTCACTCCCGAGGATACAGCTGTATATTATTGTGCAAG  
 AGAAGGTGGGTGGTATGGCGAGATGGATGTATGGGGAAAGGAACATACG  
 GTAACACTGTGTCAGTGGCGGAGGCCTCAGGTGGCTGGAGGCTCTGGAGG  
 AGGAGGGTCCGAAATCGTGTCTTACCCAGTCTCCGGCTACTCTGAGCGTTA  
 GTCCGGGTGAAAGGGCCTCACTCTTGTGAGCTTCACAGTCAGTCTCTT  
 CCTACTTGGCTTGGTATCAGCAGAACGCCAGGTCAAGCGCCCCGTTGCTC  
 ATTACGACGCAAGCACACGAGCGACAGGCATTCCAGACAGACAGATTTCTGG  
 TTCTGGTTCTGGCACGGACTTACTCTTACTATAAACTCAACTGAGGCAGA  
 GGATGCTGCGACTTACTATTGTCACCAATCAAGCTCTGCCTTACACCTT  
 TGGGCAAGGCACCAAACTCGAAATCAAG

5

**SEQ ID NO: 12** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv2) 24P:

QVQLQQSGPGLVKPSQLSLTC AISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 TYYRSK WYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFLQLNSVTPEDTAVYYCAREGG  
 WYGE MDVWKGKTVTVSSGGGSGGGGGGGSEI VLTQSPATLSVSPGER  
 ASLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASTRATGIPDRFSGS GTDF  
 TLTINSLEAEDAATYYCHQSSLPYTFQGQTKLEIKR

10

**SEQ ID NO: 13** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2246 (LP-scFv2-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTGCTGTTGGT GACATCAC TCTGCTCTGTGAACTCCCCATCCAGCC  
 TTCTGCTTATACCGCAAGTACAGCTGCAACAACTCTGGCCCTGGCTTGTG  
 AAACCCCTCTCAGACTTGTCTTGACGTGCGCGATAAGTGGCGATTAGTT  
 AGTTCTAACAGCGCCGCTTGGAACTGGATTAGACAGAGCCCCAGTCGGGG  
 ACTCGAATGGCTGGCCGGACTTATTATCGCAGTAAATGGTATAATGATTA  
 TGCTGTGAGTGTGAAAAGTAGGATCACAACTCAACCCCGATACGAGCAAGA  
 ATCAATTCTCATTGCAACTGAACAGCGTCACTCCCGAGGATACAGCTGTA  
 TATTATTGTGCAAGAGAAGGTGGGTGGTATGGCGAGATGGATGTATGGGG  
 GAAAGGAAC TACGGTAACTGTGTCCAGTGGCGGAGGCGGTTCAAGGTGGT  
 GAGGCTCTGGAGGAGGAGGGTCCGAAATCGTGTCTTACCCAGTCTCCGGCT  
 ACTCTGAGCGTTAGTCCGGGTGAAAGGGCCTCACTCTTGTGAGCITCA  
 CAGTCAGTCTCTTCACTTGGCTTGGTATCAGCAGAACGCCAGGTCAAGGC  
 GCCCGCTTGTCTATTACGACGCAAGCACAGAGCGACAGGCATTCCAG  
 ACAGATTITCTGGTTCTGGITCTGGCACGGACTTACTCTTACTATAAACT  
 CACTTGAGGCAGAGGATGCTGCGACTTACTATTGTCACCAATCAAGCTCT  
 CTGCCTTACACCTTGGCAAGGCACAAACTCGAAATCAAGGTTACGGT  
 ATCATCTGCGGCCGCAACTACCAACCCCTGCCCCCTGGCCGCCACTCCGG  
 CCCCCAACATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCAGGGGAAGCTTGGCC  
 CGGCCCGGGGTGGAGCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCCTGCGAT  
 ATCTACATTGGGCCCGCTGGCCGGCACTTGCAGCGTGTGCTCTGCTGCG  
 CTGGTCATCACCCCTTACTGCAAGAGGGGCCGGAGAAGCTGCTTACAT  
 CTTCAAGCAGCGITCATGCGGCCGTGCAAGACGACTCAGGAAGAGGACG  
 GATGCTCGTGCAGATCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAAGTGC  
 CGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGA  
 ATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGT  
 GCTGGACAAGCGACCGGGACCGCACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGG  
 CGGAAAAACCCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGA  
 TGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGG  
 AAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCACCAACTAAGGAT  
 ACCTACGATGCCTTGCAATGCAAGCACTCCCACCCCGG

15

**SEQ ID NO: 14** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2246 (LP-scFv2-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLLLCELPHP AFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSL  
 QLSNVTPEDTAVYYCAREGGWYGEVDVWGKGT TVSSGGGGSGGGSG  
 GGGSEIVLTQSPATLSVSPGERASLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY  
 DASTRATGIPDRFSGSGSTDFLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPYTFGQGTTK  
 LEIKVTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDF  
 ACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE  
 GCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLRREEYDVL  
 KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKERRRGK  
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5 **SEQ ID NO: 15** es la secuencia de aminoácidos del scFv2 (24P) LCDR1:

QSVSSY

10 **SEQ ID NO: 16** es la secuencia de aminoácidos del scFv2 (24P) LCDR2:

DAS

15 **SEQ ID NO: 17** es la secuencia de aminoácidos del scFv2 (24P) LCDR3:

HQSSSLPYT

20 **SEQ ID NO: 18** es la secuencia de aminoácidos del scFv2 (24P) HCDR1:

GDSVSSNSAA

25 **SEQ ID NO: 19** es la secuencia de aminoácidos del scFv2 (24P) HCDR2:

TYYRSK WYN

30 **SEQ ID NO: 20** es la secuencia de aminoácidos del scFv2 (24P) HCDR3:

AREGGWYGE MDV

**SEQ ID NO: 21** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv3) 25P:

CAAGTACAGCTCAACAGAGTGGACCTGGTCTCGTTAAGCCGTCCAAAC  
 ACTGTCTTGACGTGCGCTATTAGTGGCGACAGCGTATC ATCCAATTCTGC  
 TGCTTGGAACTGGATTAGACAGTCACCGTCCAGAGGCTTGAATGGCTGG  
 GCAGGACGTACTACCGCTAAAATGGTATAACGATTACGCCGTTAGTGT  
 AAATCCAGGATTACCATTAAACCTGACACAAGTAAGAATCAGTTCTCT  
 CAGCTGAATTCCCTGACTCCTGAGGATACGCCGTTACTACTGTGCCGA  
 GAACACCAGAATGAGGCGGCTTTGATATTGGGGCAAGGAACAATGGT  
 CACAGTTAGCAGTGGGGGGGGTGGCTCCGGGGAGGTGGTCCGGCGGC  
 GGTGGTTCTCAATCCGCTCTGACACAACCTCCCTAGCGAGCGGGACTCC  
 CGGTCAAAGGGTGACCATCTCTGTTCTGGGGAGGTAGTAACATCGGGA  
 CAAATACTCGTCTGGTATCAGCAACTCCCTGGGACCGCTCCAAAGTTGT  
 TGATATATCGCAATACGCAACGACCTAGTGGGATACCTGATAGATT CAGC  
 GGAAGCAAAGTGGTACGAGTGC GTCTTGGCAATATCTGGCCTCCAGTC  
 CGAGGACGAAGCGGATTACTATTGTGCGGGCTGGGATGACTCACTGAATG  
 GTTATGTGTTGGTGCAGGTACTCAACTCACCGTACTTGGT

**SEQ ID NO: 22** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv3) 25P:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 TYYRSK WYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSLTPEDTAVYYCAREHQ  
 NEAAFDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGSGGGSQVLTQPPSASGTPQRV  
 TISCSGGGSNIGTNTASWYQQLPGTAPKLLIYRNTQRPSGIPDRFSGSKSGTSA  
 SLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGAGTQLTVLG

**SEQ ID NO: 23** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2247 (LP-scFv3-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCA  
 TTCCTCCTGATCCCACAAGTACAGCTCAAACAGAGTGGACCTGGTCTCGTT  
 AAGCCGTCCTAAACACTGTCTTGACGTGCGCTATTAGTGGCGACAGCGT  
 ATCATCCAATTCTGCTGCTTGGAACTGGATTAGACAGTCACCGTCCAGAG  
 5  
 GCTTGGAAATGGCTGGGAGGACGTACTACCGCTAAAATGGTATAACGAT  
 TACGCGGTTAGTGTCAAATCCAGGATTACCATTAACCTGACACAAGTAA  
 GAATCAGTTTCTCTCAGCTGAATTCCCTGACTCCTGAGGATAACGGCGT  
 TTACTACTGTGCCCGAGAACACCAGAATGAGGCGGCTTTGATATTTGGG  
 GGCAGGAAACAATGGTCACAGTTAGCAGTGGGGGGGTGGCTCCGGGG  
 AGGTGGTTCCGGCGGCGGTGGTCTCAATCCGTCTGACACAACCTCCCTC  
 AGCGAGCAGGGACTCCGGTCAAAGGGTGACCATCTTGTCTGGGGAG  
 GTAGTAACATCGGGACAAATACTGCGTCTGGTATCAGCAACTCCCTGGG  
 ACCGCTCCCAAGTTGTGATATATCGCAATACGCAACGACACTAGTGGGAT  
 ACCTGATAGATTCAAGCGGAAGCAAAAGTGGTACCGAGTGGCTTTGGCAA  
 TATCTGGCCTCCAGTCCGAGGACGAAGCGGATTACTATTGTGCGGCCCTGG  
 GATGACTCACTGAATGGTTATGTGTCGGTGCAGGTACTCAACTCACCGTA  
 CTTGGTGCAGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCCTGGCCGCGACTCCGGC  
 CCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCCTGCAGCCCCGAAGCTTGCCGCC  
 GGCAGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCTGCGATA  
 TCTACATITGGCCCCGCTGGCCGGCATTGCGGCGTCTCTGCTGCG  
 TGGTCATCACCCCTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTACATC  
 TTCAAGCAGCCGTTATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGG  
 ATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGC  
 GTCAAGTTCTCACGGTCCGCCACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAA  
 TCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACGTG  
 CTGGACAAGCGACGCCAGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACACCGC  
 GGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGAT  
 GGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGA  
 AAGGGTCACGACGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATA  
 CCTACGATGCCTGCAATGCAAGCACTCCCACCCCGG

**SEQ ID NO: 24** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2247 (LP-scFv3-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSLPEDTAVYYCAREHQNEAAFIDIWQGQGTMVTVSSGGGSGGGGGG  
 GSQSVLTQPPSASGTPGQRTVTISCGGGSNIGNTNTASWYQQLPGTAPKLIYR  
 NTQRPSGIPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGA  
 GTQLTVLGAATTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDF  
 ACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQED  
 GCSRFPPEEEGGCELRVKFSRADAPAYQQQQNQLYNELNLGRREYDVLD  
 KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  
 10

**SEQ ID NO: 25** es la secuencia de aminoácidos del scFv3 (25P) LCDR1:

GSNIGTNT

**SEQ ID NO: 26** es la secuencia de aminoácidos del scFv3 (25P) LCDR2:

RNT

**SEQ ID NO: 27** es la secuencia de aminoácidos del scFv3 (25P) LCDR3:

AAWDDSLNGYV

**SEQ ID NO: 28** es la secuencia de aminoácidos del scFv3 (25P) HCDR1:

GDSVSSNSAA

**SEQ ID NO: 29** es la secuencia de aminoácidos del scFv3 (25P) HCDR2:

5 TYYRSKWYN

**SEQ ID NO: 30** es la secuencia de aminoácidos del scFv3 (25P) HCDR3:

10 AREHQNEAAFDI

**SEQ ID NO: 31** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv4) 11s:

20 CAAGTCCAGTTGCAACAGTCGGGCCAGGTCTGGTTAACCCATCCCAAAC  
TCTGAGTTGACGTGCGCTATTAGCGGAGATTCCGTGTCCAGCAATTCTGC  
AACCTGGAATTGGATCCGGCAGAGTCCGAGTGGCGGTTGGAATGGCTCG  
GACGCACTTACTACAGGAGCAAATGGTACGATGATTATGCTGTTCTGTG  
CGCTCTCGAATCACCATGAATCCTGATACTTCTAAGAACCAATTCTTTG  
CAGTTGAACCTCGTCACGCCTGAAGATACTGCGGTCTACTATTGCGCACG  
CGAAGGGTAGCCGCGATTTGATTACTGGGGCAAGGAACATTGGTCA  
CGGTCTCCTCTGGTGAGGAGGATCAGGAGGCGGGGTTAGGTGGAGGT  
GGGAGCGATATTCAACTTACCGAGTCTCGAGCAGTCTTCTGCTTCGTG  
GGAGACCGAGTGACGATTACTGTAGGGCATCTCAGTCAATAAGITCCTA  
TCTTAACCTGGTATCAGCAGAACGCTGGAAAGGCTCCAAAACCTTCTTATT  
TGCCGCATCCTCATTGCAATCCGGCGTGCCTCCGATTTCCGGATCTGG  
CTCAGGCACTGACITTAACCTTGACTATTAGITCCCTCAACCAGAAAGATT  
TGCTACCTATTACTGCCAACATCATACAGTACCCATATACATTGGCCA  
AGGCACGAAATTGGAGATTAAA

15 **SEQ ID NO: 32** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv4) 11s:

QVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSGGLEWLGR  
TYYRSKWYDDYAVSVRSRITMPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREG  
VAGDFDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDR  
VTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLIYAASSLQ\$GVPSRFSGSGSTDFT  
LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIKR

20 **SEQ ID NO: 33** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2248 (LP-scFv4-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCA  
TTCCTCCTGATCCCACAAGTCCAGTTGCAACAGTCCGGGCCAGGTCTGGTT  
AAGCCATCCCAAACCTCTGAGTTGACGTGCGCTATTAGCGGAGATTCCGT  
GTCCAGCAATTCTGCAACCTGGAATTGGATCCGGCAGAGTCCGAGTGGCG

GTTTGGAATGGCTGGACGCACTTACTACAGGAGCAAATGGTACGATGAT  
 TATGCTGTTCTGTGCGCTCTGAATCACCATGAATCCTGATACTTCTAAG  
 AACCAATTCTTCTTGCAGTTGAACCTCCGTACGCCCTGAAGATACTGCCGT  
 TACTATTGCGCACCGAAGGCGTAGCCGGCATTGATTACTGGGGCA  
 AGGAACATTGGTACCGTCTCTGGGAGGAGGATCAGGAGGCCGG  
 GGTACAGTGGAGGTGGAGCGATATTCAACTTACGCAGTCTCCGAGCAG  
 TCTTCTGCTTCCGTGGGAGACCGAGTACGATTACTGTAGGGCATCTCA  
 GTCAATAAGTTCCATCTTAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCTC  
 CAAAACCTCTTATTATGCCGCATCCTCATTGCAATCCGGCGTGCCTTCCC  
 GATTTCGCGATCTGGCTAGGCAGTACCTTACCTGACTATTAGTCCC  
 TTCAACCAGAAGATTGCTACCTATTACTGCCAACATACAGTACCC  
 CATATACATTGGCCAAGGCACGAAATTGGAGATTAAGCGGCCGCAACT  
 ACCACCCCTGCCCTGGCCGCCGACTCGGCCCAACCATCGCAAGCCA  
 ACCCCTCTCCTGCGCCCCGAAAGCTGCCGCCGGCGCGGGTGGAGCCG  
 TGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTGGCCCCGC  
 TGGCCGGCACTTGCAGCGTGCCTGCTGCGTGGTCATCACCCCTTACT  
 GCAAGAGGGGCCGAAAGAACGACTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTTCATG  
 CGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCC  
 TGAGGAGGAAGAGGGGGATCGAAGTGCCTGCGTCAGTTCAACGGTCC  
 GCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCAGAATCAGCTCTACAACGAGCT  
 GAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCCGA  
 CGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACACGGCGAAAACCTCAGGAAG  
 GACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGA  
 AATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGAAAGGGTCACGACGGGCT  
 GTACCAAGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTGCATA  
 TGCAAGCACTCCCACCCCG

**SEQ ID NO: 34** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2248 (LP-scFv4-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLCLELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSN  
 SATWNWIRQSPSGGLEWLGRYYRSKWYDDYAVSVRSRITMNPDTSKNQFS  
 LQLNSVTPEDTAVYYCAREGVAGDFDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGG  
 GGSDIQLTQSPSSLASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA  
 SSLQSGVPSRFSGSGSTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEI  
 KAAATTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIW  
 APLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSRFP  
 EEEEGGCELRVKFSRASADAPAYQQQNQLYNELNLRREEYDVLDRGRD  
 PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQG  
 LSTATKDTYDALHMQALPPR

5

**SEQ ID NO: 35** es la secuencia de aminoácidos del scFv4 (11s) LCDR1:

QSISSY

10

**SEQ ID NO: 36** es la secuencia de aminoácidos del scFv4 (11s) LCDR2:

AAS

15

**SEQ ID NO: 37** es la secuencia de aminoácidos del scFv4 (11s) LCDR3:

QQSYSTPYT

20

**SEQ ID NO: 38** es la secuencia de aminoácidos del scFv4 (11s) HCDR1:

GDSVSSNSAT

25

**SEQ ID NO: 39** es la secuencia de aminoácidos del scFv4 (11s) HCDR2:

TYYRSKWYD

25

**SEQ ID NO: 40** es la secuencia de aminoácidos del scFv4 (11s) HCDR3:

AREGVAGDFDY

**SEQ ID NO: 41** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv5) 12s:

CAAGITCAGITGCAGCAGAGTGGCCCTGGCTTGTAAACCACAGAC  
 GCTCTCACTGACCTGTGCCATCTCTGGAGACAGTGTAAAGTCTAACTCAGC  
 CGCGTGAATTGGATTAGACAATACCAAGCCGGGACTTGAATGGCTTG  
 GTCGGACGTACTATAGATCTAAGTGTATAATGACTACCCAGTGTCACTG  
 AAATCACGGATAACCATAAACCTGACACCAGCAAAACCAATTCTCT  
 TCAGCTTAATTCCGTACGCCAGAAGATACGGCCGTTACTACTGTGCGA  
 GGGAGGATGACGCCATTGGACATCTGGGTCAAGGGGACCATGGTGA  
 GTCTCTCCGGCGGGGGGTAGTGGAGGGGCTGGCTCAGGTGGTGGCGG  
 GTCAGATATAACAAATGACACAGAGCCCTAGTAGTGTAGTGTGGCTCAGTGG  
 GCGACCGCGTAACTATAACCTGTAGAGCATCCAAAGCATTCCCACTTC  
 CTTAATTGGTACCAAGCAGAAGCCGGCACAGCGCCAAACTCCTGATCAC  
 CACTGCGAGCGGACTGGTCAGGTGTTAGCCGGTTAGTGGTCAG  
 GTAGCGGTACAGATTCACTCTCACGATAAAACTCCCTCAGCCTGAGGAC  
 CTGGCGACATATTACTGTCAACAATCCTATACCACCCCCACTGACATTGGA  
 GGGGGCACAAAATGGAGATCAA

5

**SEQ ID NO: 42** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv5) 12s:

QVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCaisGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 TYYRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREGD  
 DALDIWQQGTMVTVSSGGGGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI  
 TCRASQSISHFLNWYQQKPGTAPKLLITTAASGLGSVPSPSGSGSGTDFTLTI  
 NSLPEDLATYYCQQSYTPTFGGGTKLEIKR

10

**SEQ ID NO: 43** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2249 (LP-scFv5-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCA  
 TTCCCTGATCCCACAAGTTCAGTGACAGAGTGGCCCTGGCTTGT  
 AAACCATCACAGACGCTCACTGACCTGTGCCATCTCTGGAGACAGTGT  
 AAGTTCTAACTCAGCCCGTGAATTGGATTAGACAATACCAAGCCGG  
 GACTTGAATGGCTTGGTCGGACGTACTATAGATCTAAGTGGTATAATGAC  
 TACGCAGTGTCACTGAAATCACGGATAACCATAAACCTGACACCAGCAA  
 AAACCAATTCTCTTCAGCTTAATTCCGTACGCCAGAAGATAAGGCCGT  
 TTACTACTGTGCGAGGGAAAGGTGATGACGCATTGGACATCTGGGTCA  
 GGACCATGGTGAATGTCTCTCCGGGGGGGGTAGTGGAGGGGGTGGC  
 TCAGGTGGTGGCGGGTCAGATATAACATGACACAGAGCCCTAGTAGTCT  
 GAGTGCTTCAGTGGCGACCGCGTAACTATAACCTGTAGAGCATCCAAA  
 GCATTCCCACCTCCTTAATTGGTACCAAGCAGAAGCCGGCACAGCGCC  
 AAACCTCTGATCACCACACTGCGAGCGGACTGGTCAGGTGTTCTAGCC  
 GTTAGTGGTCAGGTAGCGGTACAGATTCACTCTCACGATAAAACTCC  
 TCAGCCTGAGGACCTGGCGACATATTACTGTCAACAATCCTATACCACCC  
 CACTGACATTGGAGGGGGCACAAACTGGAGATCAAAGCGGCCGCAAC  
 TACCACCCCTGCCCCCTCGGCCCGACTCCGCCCAACCATCGCAAGCC  
 AACCCCTCTCTTGGCGCCCCGAAGCTTGGCGCCCCGGCGGGTGGAGCC  
 GTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTGGGCCCG  
 CTGGCCGGCACTTGCCTGCTCTGCTGCTGGTCATCACCCCTTAC  
 TGCAAGAGGGGCCGGAAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCGTTCAT  
 GCGGCCGTGAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCC  
 CTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGCTCAAGTCTCACGGTC  
 CGCCGACCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTACAACGAGC  
 TGAACCTGGGAAGGGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGG  
 ACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAACCCCTAGGAA  
 GGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAG  
 AAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGAGGGAAAGGGTCACGACGG  
 TGTACCAGGGACTGAGCACCCTCAACTAAGGATAACCTACGATGCCTTGCAT  
 ATGCAAGCACTCCCACCCCCGG

15

**SEQ ID NO: 44** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2249 (LP-scFv5-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLCELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSL  
 QLSNVTPEDEAVYYCAREGDDALDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGGGGGG  
 SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIHFLNWYQQKPGTAPKLLITASG  
 LGSGVPSRFSGSGTDFLTINSLQPEDLATYYCQQSYTTPLTFGGGTKLEIK  
 AAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAP  
 LAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE  
 EEEGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPE  
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGDGLYQGLS  
 TATKDTYDALHMQALPPR

5           **SEQ ID NO: 45** es la secuencia de aminoácidos del scFv5 (12s) LCDR1:

QSISHF

10           **SEQ ID NO: 46** es la secuencia de aminoácidos del scFv5 (12s) LCDR2:

TAS

15           **SEQ ID NO: 47** es la secuencia de aminoácidos del scFv5 (12s) LCDR3:

QQSYTTPLT

20           **SEQ ID NO: 48** es la secuencia de aminoácidos del scFv5 (12s) HCDR1:

GDSVSSNSAA

25           **SEQ ID NO: 49** es la secuencia de aminoácidos del scFv5 (12s) HCDR2:

TYYRSKWN

30           **SEQ ID NO: 50** es la secuencia de aminoácidos del scFv5 (12s) HCDR3:

AREGDDALDI

35           **SEQ ID NO: 51** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv6) 16P3:

CAGATACAGTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTAGTGAAGCCCTCGCAGAC  
 CCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGC  
 TGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTGAGTGGCTGG  
 GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGTATAATGATTATGCAGTATCTGTG  
 AAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAAGCAGTTCTCC  
 GCAGCTGAACCTGTGACTCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCC  
 AAAGAGGTACAACCTGATGATGCTTAGATATCTGGGCCAAGGGACAATG  
 GTCACCGTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGAGGTAGCGGTGG  
 TGGCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATC  
 TGTAGGAGACAAAGTCACCATCACTTGTGGCGAGTCAGGATGTTAGCG  
 GCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGGCTAGCCCCCTCAGCTCCTG  
 ATCTCTGGTGCATCCACTTGAAGGTGAAGTCCCATCAAGGTTCAGCGG  
 CAGTGGATCTGGGACAGATTACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG  
 AAGATTTCGCCACTTATTATTGTCACACAGGCTAAAAATTCCCTTACACTT  
 TTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAA

**SEQ ID NO: 52** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv6) 16P3:

QIQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 YYRSKWNNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDEAVYYCAQEVP  
 DDALDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDKV  
 TITCRASQDVSGWLAWYQQKPLAPQLLISGASTLQGEVPSRFSGSGSGTDF  
 LTISLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFGQGTKEIK

**SEQ ID NO: 53** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2203 (LP-scFv6-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGTTGTTGCTTGTACAAGCCTTCTTCTGTGAGCTCCGCACCCGGCTTCT  
5 GCTGATCCCGCAGATAACAGCTCAGCAGTCCGGCCCCGGTCTGGTAAAGCCGTCC  
CAAACGCTTCACTCACATGCCGATCTCTGGTGATTCTGTGTCACTCAACAGCG  
CAGCATGGAATTGGATCCGCCAATCACCCAGTAGAGGCTGGAGTGGTGGGCC  
GGACTTATTATCGAAGTAAGTGGTACAATGATTATGCAGTCTCAGTTAAATCCAG  
GATCACTATTAAACCCAGATAACAAGTAAAAACCAGTCTCATTGCAACTTAATTCC  
GTAACTCCGGAGGACACTGCAGTATATTACTGCCTCAGGAGGTGCAGCCTGAT  
GATGCTCTGGACATTGGGACAAGGCACGATGGTCACGGTTAGTCCGGGGGG  
GGAGGTTCTGGCGAGGTGGTAGTGGGGGGCGGCAGTGACATCCAGATGACA  
CAGAGTCCCAGCAGCGTCTCGCTCAGTCGGGATAAGGTAACAATTACGTGT  
AGAGCGAGGCCAGGACGTTCCGGTGGCTGGCTGGTACCAACAAAAACCCGGT  
CTCGCTCCGCAGTTGCTCATCTCTGGAGCGTCCACCCTCAGGGAGAGGTGCCTA  
GCAGATTCTGGGTCTGGATCCGGCACGGATTACACTTACGATTCTCTCTT  
CAACCCGAAGATTTGCTACTTACTATTGCCAGCAGGCCAAAACCTCCGTACA  
CGTTGGACAGGGCACAAAGTGGAAATTAAAGGCCGCCAACTACCACCCCTG  
CCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCG  
CCCCGAAGCTGCCGCCGCCGCGGGTGGAGCGTGCATACCCGGGGCTGGA  
CTTGCCTGCGATATCTACATTGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGC  
CTGCTGTCGCTGGTCATCACCCCTTACTGCAAGAGGGGGCGGAAGAAGCTGCTT  
ACATCTCAAGCAGCGTTCATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACG  
GATGCTCGTGCAGATCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCA  
AGTCTCACGGTCCGCCACGCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTA  
CAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGAC  
GCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAACCTCAGGAA  
GGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATC  
GGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAAGGG  
ACTGAGCACGCCACTAAGGATACCTACGATGCCITGCATATGCAAGCACTCCCA  
CCCCGG

**SEQ ID NO: 54** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2203 (LP-scFv6-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLLCELPHAFLLIPQIQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNS  
AAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRSITINPDTSKNQFSLQ  
LNSVTPEDTAVYYCAQEVPDDALDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGGGG  
GSDIQMTQSPSSVSASVGDKVITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISG  
ASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFGQGTKL  
EIKAAATTTPAPRPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRF  
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGR  
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER  
10 RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 55** es la secuencia de aminoácidos del scFv6 (16P3) LCDR1:

15 QDV SGW

**SEQ ID NO: 56** es la secuencia de aminoácidos del scFv6 (16P3) LCDR2:

GAS

**SEQ ID NO: 57** es la secuencia de aminoácidos del scFv6 (16P3) LCDR3:

QQAKNFPYT

**SEQ ID NO: 58** es la secuencia de aminoácidos del scFv6 (16P3) HCDR1:

25 GDSVSSNSAA

**SEQ ID NO: 59** es la secuencia de aminoácidos del scFv6 (16P3) HCDR2:

TYYRSKWYN

**SEQ ID NO: 60** es la secuencia de aminoácidos del scFv6 (16P3) HCDR3:

5

AQEVPQPDDALDI

**SEQ ID NO: 61** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv7) 16P16:

CAAGTACAGTTGCAGCAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAAACCATCCCAAAC  
TCTCAGCCTCACGTGTGCTATTCTGGTGAECTCAGTAAGTAGCAATAGCGC  
TGCTTGGAACTGGATCAGACAATCTCCCTCAGGGGTCTCGAATGGCTGG  
GGCGAACCTATTACCGATCTAAATGGTATAACGATTATGCAGTATCCGTG  
AAATCCAGGATTACAATCAACCCAGATACGTTCAAGAATCAATTCTCTCTT  
CAGCTCAACTCCGTAACCTCAAGAGGACACTGGGTATATTATGCCGCCA  
AGAAGTCGAGCCACACGATGCCCTCGATATCTGGGGTCAAGGTACCATGG  
TTACAGTTAGTAGTGGGGTGGGGAGCGGGGGCGGTGGTCCGGTGG  
CGGGGGTTCAGACATCAAGATGACCCAAATCCCCAAGCTCTGTTAGCAT  
CCGTGGCGATAAGGTAACCATTACATGCAGAGCGAGTCAGGACGTTCA  
GGGTGGCTGGCTTGGTACCAGCAAAACCGGGACTCGCACCGCAGCTGTT  
GATTTTCGGCGCCAGTACGCTTCAGGGGAAGTACCGTCCAGGTTAGTG  
GGTCAGGTTCTGGCACCGATTTACGCTCACGATATCCAGTCTCCAACCGG  
AGGATTTGCTACTTATTACTGCCAGCAGGCTAAGTATTTCCATACACAT  
TTGCCAGGGGACAAAGTTGGAGATCAA

10

**SEQ ID NO: 62** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv7) 16P16:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
TYYRSKWNDYAVSVKSRITINPDTFKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVE  
PHDALDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGGSDIKMTQSPSSVSASVGDK  
VTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLIFGASTLQGEVPSRFSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGKLEIK

15

**SEQ ID NO: 63** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2204 (LP-scFv7-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTGCTTTGGTAACCTCCCTCCTTGTGCGAGCTGCCCATCCAGCG  
TTCCTCCTCATCCCTCAAGTACAGTTGCAGCAGTCAGGACCTGGCCTTGTG  
AAACCATCCCAAACCTCTCAGCCTCACGTGTGCTATTCTGGTGAECTCAGTA  
AGTAGCAATAGCGCTGCTGGAACTGGATCAGACAATCTCCCTCAGGGG  
TCTCGAATGGCTGGGGCAACCTATTACCGATCTAAATGGTATAACGATT

20

ATGCAGTATCCGTGAAATCCAGGATTACAATCAACCCAGATACTCAAG  
AATCAATTCTCTTCACTCCGTAACCTCCAGAGGACACTGCGTA  
TATTATTGCGCCCAAGAAGTCGAGCCACACGATGCCCTCGATATCTGGG  
TCAAGGTACCATGGTTACAGTTAGTAGTGGGGTGGGGAAAGCGGGG  
GGTGGGTCCGGTGGGGGGTTCAGACATCAAGATGACCCAAATCCCAAG  
CTCTGTTCAAGCATCCGTGGCGATAAGGTAACTACATGCAGAGCGA  
GTCAGGACGTTTCAGGGTGGCTGGCTTGGTACAGCAGCAAAACCGGGACTC  
GCACCGCAGCTGTTGATTTCCGGCCAGTACGCTTCAGGGCGAAGTACC  
GTCCAGGTTCACTGGGTCAAGGTTCTGGCACCGATTTACGCTCACGATATC  
CAGTCTCCAACCAGGAGGATTGGCTACTTATTACTGCCAGCAGGCTAAGTA  
TTTCCATACACATTGCCAGGGACAAAGTTGGAGATCAAAGCGCCG  
CAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCA  
AGCCAACCCCTTCCTTGCGCCCGAACGCTTGCCTGCCGGCGCGGGTGG  
AGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTGGG  
CCCCGCTGGCCGGCACTTGCAGCGTGCCTGCTGCGTGGTCATCACCC  
TTTACTGCAAGAGGGCCGGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCG  
TTCATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTCA  
ATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGTCAAGTTCTCAC  
GGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAAGAACAGCTCTAAC  
GAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGAC  
GCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAAACCTCA  
GGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCTAC  
TCAGAAATCGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGAGGGAAAGGGTCACGAC  
GGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCCTT  
GCATATGCAAGCACTCCCACCCCG

**SEQ ID NO: 64** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2204 (LP-scFv7-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLLCLELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCAISGDSVSSN  
SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTFKNQFSL  
QLNSVPEDTAVYYCAQEVEPHDALDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGSGG  
GGSDIKMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQDVSGWAWYQQKPLAPQLLIF  
GASTLQGEVPSRFSGSQGTDFTLISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFQQT  
KLEKAAATTPAPRPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDI  
YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSC  
RFPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNENLGRREYDVLKRR  
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL  
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5

**SEQ ID NO: 65** es la secuencia de aminoácidos del scFv7 (16P16) LCDR1:

QDVSGW

10

**SEQ ID NO: 66** es la secuencia de aminoácidos del scFv7 (16P16) LCDR2:

GAS

15

**SEQ ID NO: 67** es la secuencia de aminoácidos del scFv7 (16P16) LCDR3:

QQAKYFPYT

20

**SEQ ID NO: 68** es la secuencia de aminoácidos del scFv7 (16P16) HCDR1:

GDSVSSNSAA

25

**SEQ ID NO: 69** es la secuencia de aminoácidos del scFv7 (16P16) HCDR2:

TYYRSKWWY

30

**SEQ ID NO: 70** es la secuencia de aminoácidos del scFv7 (16P16) HCDR3:

AQEVEPHDALDI

**SEQ ID NO: 71** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv8) 16P20:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGGCCCTCGCAGAC  
 CCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGC  
 TGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGGCCTGAGTGGCTGG  
 GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTG  
 AAAAGTCGAATAACCACATCAACCCAGACACATCCAAGAACAGTTCTCCCT  
 GCAGCTGAACCTGTGACTCCCGAGGAACCGCTGTGTATTACTGTGCC  
 AAGAGGTAGAACCTCATGATGCTCTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG  
 GTCACCGTCTCTCAGGAGGTGGCGGGCTGGCCGAGGCGGTAGCGGTGG  
 TGGCGGATCCGACATCCAGATGACGCAGTCTCCATCATCCGTGTGCATC  
 TGTAGGAGACAAAGTCACCATCACTTGTGCGGCGAGTCAGGATGTTAGCG  
 GCTGGTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCTAGCCCCCAGCTCCTG  
 ATCTTGGTGCATCCACTTGAAGGTGAAGTCCATCAAGGTTAGCGGC  
 AGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA  
 AGATTTCGCCACTTATTATTGTCAACAGGCTAAATATTCCCTTACACTTT  
 GCCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA

5 **SEQ ID NO: 72** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv8) 16P20:

QVQLQQSGPGLVKPSQLSLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 TYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVE  
 PHDALDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDK  
 VTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLIFGASTLQGEVPSRFSGSGSGTDF  
 TLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFQGQGTKLEIK

10 **SEQ ID NO: 73** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2205 (LP-scFv8-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTGCTCCTCGTAACCTCTTCTTGTGAGTTGCCACATCCAGCAT  
 TTCTTCTGATACCTCAAGTTCAACTCCAGCAGAGTGGTCCAGGTTGGTAA  
 AACCCAGCCAGACTCTCTCATGGACGTGTGCCATATCAGGTGATTCACTT  
 CCTCTAATAGCGCGGCATGGAATTGGATCAGGCAAAGCCTAGTCGCCGG  
 CTGGAGTGGCTCGGCCGGACATACTACCGCTCAAAGTGGTACAACGACTA  
 CGCCGTCAGCGTAAAATCTGGATTACCATTAACCCGGATACTTCCAAA  
 ACCAATTCTCCCTGCAAGCTAACAGTGTACGCCGGAAAGATAACGCCGTT  
 TATTACTGCGCACAAAGAGGTGGAACCGCACGCCCTCGATATCTGGGG  
 CCAAGGCACATGGTACCGTCAGTAGCGGAGGGGGGGTCCGGAGGA  
 GGGGGCTCTGGTGGCGGAGGATCTGATATCCAATGACCCAAATCACCCTC  
 TTCAGTATCAGCTCTGTTGGTGACAAAGTTACGATTACCTGTCAGCGTC  
 ACAGGACGTTCTGGTTGGCTTGGTATCAGCAAAACCAAGGGCTTG  
 CGCCTCAGTTGCTTATTTTGGGCATCTACTTGCAGGGAGAGGTGCCCT  
 CCCGGTTCTCCGGCAGTGGGAGCGGCACCGATTACACTACCATCTCTT  
 CCTGCAACCGAAGACTTGCACGTACTATTGCCAGCAGGCAAAGTAT  
 TTICCCCTACACTTGGACAAGGGACTAAACTTGAATCAAGGCCCGC  
 AACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCACTCCGGCCCCAACCATCGCAA  
 GCCAACCCCTCTCTGCGCCCCGAAGCTTGCCTGCCGGCGGGTGG  
 GCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTGGCC  
 CCGCTGGCCGGCACTTGCACCGTGCCTGCTGCGCTGGTCATACCCCTT  
 TACTGCAAGAGGGGGCGGAAGAACGACTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTT  
 CATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGAGCGGATGCTCGTGCAGA  
 TTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGTCAAGTCTCAG  
 GTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCAGAACATCAGCTCTAACAG  
 AGCTGAACCTGGGAGGGAGAGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACG  
 CGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAAACCCCTCAG  
 GAAGGACTGTACAACGAACACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACT  
 CAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGAGGGAAAGGGTCACGACG  
 GGTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCITG  
 CATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

15 **SEQ ID NO: 74** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2205 (LP-scFv8-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPHDALDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGSGG  
 GGSDIQMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQDVSGWLAZYQQKPGLAPQLLIF  
 GASTLQGEVPSRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGT  
 KLEIKAAATTTPAPRPTPAPTIAQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC  
 RFPEEEGGCELRVKFRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDR  
 GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

5 **SEQ ID NO: 75** es la secuencia de aminoácidos del scFv8 (16P20) LCDR1:

QDV SGW

10 **SEQ ID NO: 76** es la secuencia de aminoácidos del scFv8 (16P20) LCDR2:

GAS

15 **SEQ ID NO: 77** es la secuencia de aminoácidos del scFv8 (16P20) LCDR3:

QQAKYFPYT

20 **SEQ ID NO: 78** es la secuencia de aminoácidos del scFv8 (16P20) HCDR1:

GDSVSSNSAA

25 **SEQ ID NO: 79** es la secuencia de aminoácidos del scFv8 (16P20) HCDR2:

TYYRSKWWY

30 **SEQ ID NO: 80** es la secuencia de aminoácidos del scFv8 (16P20) HCDR3:

AQEVEPHDALDI

**SEQ ID NO: 81** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv9) 16P2:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGAC  
 CCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTCTAGAACAGTGC  
 TGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTGAGTGGCTGG  
 GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTG  
 AAAAGTCGAATAACCATAACCCAGACACATTCAAGAACCCAGTCTCCCT  
 GCAGCTGAACACTGTGACTCCGAGGACACGGCTGTGATTACTGTGCC  
 AAGAGGTAGAACCTCATGATGCTCTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG  
 GTCACCGTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGCCGTGGAGGTAGCGGTGG  
 TGGCGGATCCGACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTCTGCATC  
 TGTAGGAGACAAAGTCACCATCACTTGTGGGGAGTCAGGATGTTAGCG  
 GCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCTAGCCCCCTCAGCTCTG  
 ATCTTGGTGCATCCACTTGCAAGGTGAAGTCCCCTCAAGGTTAGCGGC  
 AGTGGATCTGGGACAGATTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA  
 AGATTTCGCCACTTATTATTGTCAACAGGCTAAATATTCCCTTACACTTT  
 GGCCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAA

35 **SEQ ID NO: 82** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv9) 16P2:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 TYYRSKWWYNDYAVSVKSRTINPDTFKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVE  
 PHDALDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGSDIKMTQSPSSVSASVGDK  
 VTITCRASQDVSGWLAZYQQKPGLAPQLLIFGASTLQGEVPSRSGSGSGTDF  
 TLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTKLEIK

**SEQ ID NO: 83** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2206 (LP-scFv9-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTTTGGTGAATTCCCTTGTGCGAGITGCCACACCCCGCCT  
TCCCTGCTTATTCCCCAAGTCCAGCTAACAAATCCGGACCCGGACTTGT  
AGCCGTCTCAGACGTTGTCACTCACATGCGCCATCAGTGGCGATAGCGTG  
TCCAGCAACAGTGGCGATGGAATTGGATACGACAGAGCCCTCCGAGG  
ATTGGAATGGCTGGGACGAACGTACTATAGGTCCAAGTGGTATAACGACT  
ACGGGTGTCAGTAAATCTGGATTACTATAAATCCGACACTTTAAGA  
ATCAGTTTCCCTGCAACTCAATTCAAGTCACACCGGAAGATACGGCAGTG  
TA  
CTATTGCGCTCAAGAAGTTGAGCCACATGATGCGCTGGATATTGGGG  
TCAGGGGACTATGGTGACGGTAAGCAGTGGGGGGGGGGAGTGGCGGA  
GGTGGCAGCGGGGGGGGGTGGAAAGCGACATTAAGATGACTCAGTCTCCGTC  
TTCAGTTCCGCCTCCGTAGGGACAAGGTTACAATTACTTGTGCGCGCATC  
TCAGGATGTCTCAGGTTGGCTGGCTGGTATCAACAGAAGCCTGGCCTCG  
CCCCTCAGCTTCTCATATTGGGCTAGTACCGCTGAAGGAGAAGTCCCG  
ACAGGTTTCCGGTCAAGGTCGGGACAGACTTACCTTGACCATCAG  
CTCCCTGCAACCGGAGGAACCGCAGCTACTATTGTCACAGGGGAAGT  
ACTTCCCCTACACGTTGGGCAAGGGACTAACGCTGAAATCAAGGGGGCC  
GCAACTACCACCCCTGCCCCCTGGCCGCGACTCCGGCCCCAACCATCGC  
AAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCGCCCGGCCGGGTG  
GAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTGG  
GCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGTGCTCCTGCTGCGCTGGTATCACC  
CTTACTGCAAGAGGGGGCGGAAGAAGCTGCTTACATCTAACAGCAGCC  
GTTCATGCGCCCGTGCAGACACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGA  
GATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAATGCGCGTCAAGTTCTCA  
CGTCCGCCGACCCCCGCATATCACAGGGCCAGAACATCAGCTACAA  
CGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGA  
CGCGGACCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAAACCTC  
AGGAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTA  
CTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAAAGGGTCACGAC  
GGGCTGTACCAGGGACTGAGCACGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTT  
GCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

5

**SEQ ID NO: 84** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2206 (LP-scFv9-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLLCLELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTC AISGDSVSSN  
SAAWNWRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTFKNQFSL  
QLNSVPEDTAVYYCAQEVEPHDALDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGG  
GGSDIKMTQSPSSVSASVGDKVITCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLIF  
GASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGT  
KLEKAAATTPAPRPPPTAPTLASQPLSLRPEACRPAAGGA  
VHTRGLDFACDI  
YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE  
DGSC  
RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLRREEYDVL  
DKRR  
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL  
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

**SEQ ID NO: 85** es la secuencia de aminoácidos del scFv9 (16P2) LCDR1:

QDV SGW

15

**SEQ ID NO: 86** es la secuencia de aminoácidos del scFv9 (16P2) LCDR2:

GAS

20

**SEQ ID NO: 87** es la secuencia de aminoácidos del scFv9 (16P2) LCDR3:

QQAKYFPYT

25

**SEQ ID NO: 88** es la secuencia de aminoácidos del scFv9 (16P2) HCDR1:

GDSVSSNSAA

**SEQ ID NO: 89** es la secuencia de aminoácidos del scFv9 (16P2) HCDR2:

TYYRSKWYN

**SEQ ID NO: 90** es la secuencia de aminoácidos del scFv9 (16P2) HCDR3:

5

AQEVEPHDALDI

**SEQ ID NO: 91** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv10) 16P6:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGAC  
CCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGAACAGTGC  
TGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTGAGTGGCTGG  
GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTG  
AAAAGTCGAATAACCATAACCCAGACACATCCAAGAACCAAGGACAGTCTCCCT  
GCAGCTGAACTCTGTGACTCCCAGGATACGGCTGTGTATTACTGTGCC  
AAGAGGTACAACCTGTGACTGCTTTGATATCTGGGCCAAGGGACAATG  
ATCACCGTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGAGGTAGCGGTGG  
TGGCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTGCATC  
TGTAGGAGACAAAGTCACCATCACTGTCTGGCCAGTCAGGATGTTAGCG  
GCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCTAGCCCCTCAGCTCCTG  
ATCTCTGGTGCATCCACTTTCAAGGTGGAGTCCCATCAAGGTTAGCGG  
CACTGGATCTGGACAGATTACTCTCACCATCAGCAGCCTGAGCCTG  
AAGATTTCGCCACTTATTATTGTCAACAGGCTAAAAATTCCCTTACACTT  
TTGGTCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAA

10

**SEQ ID NO: 92** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv10) 16P6:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
TYYRSKWNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVD  
PDDAFDIWGQGTMITVSSGGGGSGGGGGSDIQMTQSPPSSVSASVGDKV  
TITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISGASTLQGGVPSRFSGSGSTDF  
LTISSLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFGQGKLEIK

15

**SEQ ID NO: 93** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2207 (LP-scFv10-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTTTGGTACTTCCCTTTGCTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCCT  
TCCTGCTTATTCCCCAAGTACAACACTCCAGCAATCAGGGCCTGGCCTTGTCA  
AGCCGAGTCAAACCTTGAGTTGACGTGTGCCATCAGCGGTGACTCTGTC  
AGTTCAAACCTCGCAGCTGGAACTGGATTCCGCAGTCCCCCTCCAGGGG  
CCTCGAATGGCTGGACGGACGTACTACAGATAAAATGGTACAACGACT  
ACGCAGTCAGTGTAAAATCAAGGATTACGATAAACCTGATACGAGTAAA  
AACCAAGTTCTCTCCAACTGAACAGCGTCACACCGGAAGATACAGCCGT  
GTATTACTGTGCTCAGGAAGTGCAACCTGACGACGCATTGACATCTGGG

20

GTCAGGGCACGATGATCACCGTGAGTAGTGGAGGGAGGCAGTGGGG  
 AGCGGTTCTGGCGGGGTGGTCTGATATACAGATGACACAGAGTCCT  
 CCTCAGTTCCGCCTCTGGAGATAAGGTGACAATTACATGCAGGGCG  
 TCCAAGATGTTCTGGATGGCTCGCATGGTACCAACAGAAGCCAGGACT  
 CGCCCTCAGCTCTCATTAGCGGCCTAGCACTCTCCAAGGGGGAGTAC  
 CGAGCAGGTTCTGGTCCGAAGTGGGACGGACTTACCCGTACAATA  
 TCCTCCCTCAGCCAGAAGACTTCGCAACCTACTATTGCCAACAGGCAGA  
 AAATTTCCCTTACACGTTGCCAAGGAACCTAAACTTGAATCAAGGCAGG  
 CCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCCAACCATC  
 GCAAGCCAACCCCTCCCTGCGCCCGAAGCTTGCCTGCCCGCCGCCGG  
 TGGAGCGTGCATACCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTG  
 GGCCCCGCTGGCCGGCACTGCGCGTCTGCTGCTGGTCATCAC  
 CCTTACTGCAAGAGGGGCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGC  
 CGTTCATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
 AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGTCAAGTCTC  
 ACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAACATCAGCTCTACA  
 ACGAGCTGAACCTGGGAAGGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG  
 ACGCGGACCGCAGCCGGAGATGGGGGGAAACCAAGGCGGAAAAACCT  
 CAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCT  
 ACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGAAAGGGTCACG  
 ACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCC  
 TTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

**SEQ ID NO: 94** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2207 (LP-scFv10-CD8TM-41BB-CD3zeta):

5 MLLLVTSLLELPHPAFLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLSNVTPEDETAVYYCAQEVPDDAFDIWQQGTMITVSSGGGGSGGGGGGG  
 GSDIQMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISG  
 ASTLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFGQQGTTK  
 LEIKAAATTTPAPRPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCRRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
 PEEEggcelrvkfsrsADAPAYQQQQNQLYNELNLRREYDVLDRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 95** es la secuencia de aminoácidos del scFv10 (16P6) LCDR1:

10 QDV SGW

**SEQ ID NO: 96** es la secuencia de aminoácidos del scFv10 (16P6) LCDR2:

15 GAS

**SEQ ID NO: 97** es la secuencia de aminoácidos del scFv10 (16P6) LCDR3:

QQAKNFPYT

20 **SEQ ID NO: 98** es la secuencia de aminoácidos del scFv10 (16P6) HCDR1:

GDSVSSNSAA

25 **SEQ ID NO: 99** es la secuencia de aminoácidos del scFv10 (16P6) HCDR2:

TYYRSKWWY

**SEQ ID NO: 100** es la secuencia de aminoácidos del scFv10 (16P6) HCDR3:

30 AQEVQPDDAFDI

**SEQ ID NO: 101** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv11) 16P10:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGAC  
CCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCGGGGACAGTGTCTAGAACAGTGC  
TGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGG  
GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAAGTATCTGTG  
AAAAGTCGAATAACCATAACCCAGACACATCCAAGAACCAAGTCTCCCT  
GCAGCTGAACACTGTGACTCCGAGGACACGGCTGTGATTACTGTGCC  
AAGAGGTAGAACCTCAGGATGCTTTGATATCTGGGCCAAGGGACAATG  
GTCACCGTCTCTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGCGGTAGCGGTGG  
TGGCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTGTGCATC  
TGTAGGAGACAAAGTCACCATCACTTGTGCGGCCAGTCAGGATGTTAGCG  
GCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCTAGCCCTCAGCTCTG  
ATCTTGGTGCATCCACTCTGCAAGGTGAAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC  
AGTGGATCTGGACAGATTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA  
AGATTITGCCACTTATTATTGTCAACAGGCTAAATATITCCCTACACTTT  
GGCCCGGGGACCAAGCTGGAAATCAAA

**SEQ ID NO: 102** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv11) 16P10:

5 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
TYYRSKWYNDYAVSVKSRITNPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVE  
PQDAFDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDK  
VTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLIFGASTLQGEVPSRFSGSGSGTDF  
TLTSSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGPGTKLEIK

**SEQ ID NO: 103** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2208 (LP-scFv11-CD8TM-41BB-CD3zeta):

10 ATGCTTCTTTGGTGACTTCCCTTTGCTGTGCGAGITGCCACACCCCGCCT  
TCCCTGTTATTCCCCAAGTGCAGTTGCAACAGTCTGGACCAGGCCTCGTAA  
AACCTTCTCAAACCTTGTCACTCACTTGTGCCATCTCAGGGGACAGTGTCA  
GTTCCAACAGTGCAGGCATGGAATTGGATTAGGCAATCCCCCTCTCGAGGT  
CTGGAATGGCTTGGCGGACTTACTACCGAAGTAAGTGGTACAACGATTAA  
TGCAGTTCTGTAAAATCACGAATCACTATAAATCCGGACACTTCTAAGA  
ATCAGTTCTTTGCAAGCTTAACACTGTGTTACTCCTGAAGACACAGCCGTAT  
ATTACTGTGCTCAAGAGGTAGAGCCGCAAGATGCCCTCGACATCTGGGC  
CAAGGGACTATGGTACAGTAAGCTCCGGAGGTGGGGGATCAGGGGGAG  
GTGGGTCCGGTGGTGGCTCTGACATACAGATGACACAGTCCCCTAGC  
TCTGTGTCAGCAAGTGTGGTACAAGGTTACGATAACGTGCAGGGCCAG  
TCAAGATGTGTCAGGATGGTGGCGTGGTACCAACAGAAACCCGGCTTGG  
CACCGCAGCTTGTATTCGGCGCGTCCACACTCCAAGGCGAAGTGCCTT  
CTCGGTTCTGGAACGGCAGCAGGGACGGACTTTACTTGTACAATATCCT  
CCCTCCAACCCGAGGATTTCGCGACGTATTGCCAGCAAGCAAATAC  
TTCCCATACACCTTCGGGCCTGGGACCAAACGGAGATCAAAGCGGCCGC  
AACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAA  
GCCAACCCCTCTCCTTGCAGCCCGAAGCTTGCAGCCGGCGGGTGG  
GCCGTGCATACCCGGGGCTGGACCTTGCCTGCGATATCTACATTGGGCC  
CCGCTGGCCGGCACTTGCAGCCGACTCCGGCTCTGCTGCGTGGTACCT  
TACTGCAAGAGGGGGCGGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTT  
CATGCGCCCCGTGCAAGCAGACTAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGA  
TTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGTCAAGTTCTCAG  
GTCCGCGACGCCCCCGATACAAACAGGGCAGAATCAGCTCTAACAG  
AGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACG  
CGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCAAGGCGGAAAAACCCCTCAG  
GAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACT  
CAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGAAAGGGTCACGACG  
GGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCC  
CATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

**SEQ ID NO: 104** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2208 (LP-scFv11-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPQDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGSGGG  
 GSDIQMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLIFG  
 ASTLQGEVPSRFSRGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGPGTKL  
 EIKAAATTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
 PEEEggcelrvkfsrsADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 105** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 1 (16P10) LCDR1:

5 QDV SGW

**SEQ ID NO: 106** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 1 (16P10) LCDR2:

10 GAS

**SEQ ID NO: 107** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 1 (16P10) LCDR3:

15 QQAKYFPYT

**SEQ ID NO: 108** es la secuencia de aminoácidos del scFv11 (16P10) HCDR1:

20 GDSVSSNSAA

**SEQ ID NO: 109** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 1 (16P10) HCDR2:

25 TYYRSKWN

**SEQ ID NO: 110** es la secuencia de aminoácidos del scFv1 1 (16P10) HCDR3:

25 AQEVEPQDAFDI

**SEQ ID NO: 111** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv12) 16P17:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCACTCGCAGAC  
 CCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCGGGGACAGTGTCTCTAGAACAGTGC  
 TGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGG  
 GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTG  
 AAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAAGCAGTTCTCC  
 GCAGTTGAACCTGTGACTCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCC  
 AAGAGGTAGAACCTCATGATGCTTTGATATCTGGGCCAAGGGACAATG  
 GTCACCGTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGAGGTAGCGTGG  
 TGGCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTATGCATC  
 TGTAGGAGACAAAGTCACCATCACTTGTGGGGAGTCAGGATGTTAGCG  
 GCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCTAGCCCCCTCAGCTCCTG  
 ATCTCTGGTGCATCCACTTGCAGGTGAAGTCCCATCAAGGTTAGCGG  
 CAGTGGATCTGGACAGATTACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG  
 AAGATTTCGCCACTTATTATTGTCAACAGGCTAAATATTCCCTTACACTTT  
 TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAA

30

**SEQ ID NO: 112** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv12) 16P17:

QVQLQQSGPGLVKHSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 TYYRSKWNNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVE  
 PHDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVYASVGDK  
 VTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISGASTLQGEVPSRFSRGSGSGTDF  
 TLTSSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTKLEIK

35

**SEQ ID NO: 113** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2209 (LP-scFv12-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTTTGGTGAATTCCCTTGTGCTGTGCGAGITGCCACACCCCGCCT  
 TCCTGCTTATTCCCCAGGTACAGCTCAACAGAGTGGGCCGGACTGGT  
 AAACACTCCAAACACTTCTGTGCGCTATACAGGTGACTCTGTT  
 TCATCTAATTCTGTGCGTGGAACTGGATTGACAATCTCCAGTCGCGGG  
 TTGGAATGGCTGGACGAACATATTATCGGTCTAAGTGGTATAACGATTA  
 TGCTGTATCTGTTAAATCTGAATTACGATTAATCCTGACACCTCAAGAA  
 CCAGTTCTCCCTCCAGTGAACACTAGTCACACCGAAGACACTGCGGTCT  
 ACTATTGCGCTCAAGAAGTCGAGCCACATGATGCATTGACATCTGGGGC  
 CAGGGAACGATGGTACCGTCAGCAGTGGCGGCGGCGGATCTGGGGTG  
 CGGGTTCTGGCGGTGGAGGATCAGACATACAAATGACGCAGAGTCCCTCA  
 AGTGTGTACCGAGTGTGGGGATAAGGTAACATTACGTGAGAGCGTC  
 ACAGGATGTTAGTGGATGGCTTGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCCTG  
 CTCCACAGCTCCTATCAGTGGTCTTACACTCAGGGGAGGGTCCGA  
 GTAGATTCTGGTTCTGGATCTGGTACTGACTTACTCTTACAATTCTTC  
 TTGCAACCAGAAGACTTGCACATTACTGCCAACAGGCCAAATACTT  
 CCCTTATACATTGGCAAGGTACCAAGTGGAGATAAAGGCGGCCAA  
 CTACCAACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCCAACATCGCAAGC  
 CAACCCCTCTCCTTGCAGCCCGAAGCTTGCAGCCGGCGCGGGTGGAGC  
 CGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTGGCCCC  
 GCTGGCCGGCACTTGCAGCCGTCTGCTGCGTGGTATCACCCTTA  
 CTGCAAGAGGGGCCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTTCA  
 TGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATT  
 CCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGTCAAGTCTCACGGT  
 CCGCCGACCCCCCGCATATCAACAGGCCAGAACATCAGCTCTAACAGAG  
 CTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCG  
 GACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAAACCTCAGGA  
 AGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGAAGCCTACTCA  
 GAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGAAAGGGTCACGACGGG  
 CTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTGCA  
 TATGCAAGCACTCCCACCCCGG

5 **SEQ ID NO: 114** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2209 (LP-scFv12-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLLCLELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKHSQTLSTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSL  
 QLSNVPEDTAVYYCAQEVEPHDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGGGG  
 GSIDIQMTQSPSSVYASVGDKVTITCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLISG  
 ASTLQGEVPSRFSGSQGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTKL  
 EIKAAATTTPAPRPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSR  
 PEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNLQYNENLGRREYDVLDKRRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

10 **SEQ ID NO: 115** es la secuencia de aminoácidos del scFv12 (16P17) LCDR1:

QDV SGW

15 **SEQ ID NO: 116** es la secuencia de aminoácidos del scFv12 (16P17) LCDR2:

GAS

20 **SEQ ID NO: 117** es la secuencia de aminoácidos del scFv12 (16P17) LCDR3:

QQAKYFPYT

25 **SEQ ID NO: 118** es la secuencia de aminoácidos del scFv12 (16P17) HCDR1:

GDSVSSNSAA

**SEQ ID NO: 119** es la secuencia de aminoácidos del scFv12 (16P17) HCDR2:

TYYRSKWYN

**SEQ ID NO: 120** es la secuencia de aminoácidos del scFv12 (16P17) HCDR3:

5

AQEVEPHDAFDI

**SEQ ID NO: 121** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv13) 16P20v2:

CAAGTACAACCTCAACAGTCTGGGCTGGCTTGTAAAACCTAGCCAAAC  
TCTGTCCCTCACGTGCGCGATTCAAGGGACAGTGTAAAGTCCAACTCAGC  
CGCATGGAACCTGGATCAGGCAGTCACCTCAAGGGGCTGAATGGCTTG  
GCCGAACGTAACAGGAGTAAGTGGTACAACGATTATGCAGTGCTGTG  
AAATCACGGATTACTATCAATCCGACACGTCCAAGAACCAAGTCTCTCT  
GCAACTCAACTCAGTGACACCAAGAGGATACGGCCGTTACTATTGTGCAC  
AGGAAGTGAACCTGATGATGCCCTTGACATTGGGGTCAGGGCACGATG  
GTTACGGTAAGCTCTGGGGAGGGCGCAGTGGAGGGGGAGGTAGTGGG  
GAGGGGGATCTGATATACAGATGACACAAAGCCGTATCCGTCACTGCT  
TCAGTTGGTATAAAGTAACCATTACGTGCCGCCCTCCAAAGACGTTAG  
CGGATGGTTGGCTTGGTATCACAAAACCGGGGTTGGCTCCGCAACTCC  
TCATATCCGGTGCAGTACGCTCCAAGGCAGTCAGCTCTAGCAGATTTC  
GGGAGCGGTTCCGGTACAGATTACGTTGACCATTAGCTCTCCAGCCC  
GAAGATTGCAACCTACTATTGCCAACAGGCCAAAATTTCATATAC  
ATTGGTCAAGGCACTAAGCTGAAATCAA

10

**SEQ ID NO: 122** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv13) 16P20v2:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
TYYRSKWNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVD  
PDDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDK  
VTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISGASTLQGEVPSRFSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFGQGKLEIK

15

**SEQ ID NO: 123** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2210 (LP-scFv13-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTTTGGTACTTCCCTTTGCTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCCT  
TCCTGCTTATTCCCCAAGTACAACACTCAACAGTCTGGGCTGGCTTGTAA  
AACCTAGCCAAACTCTGCTTCACTGCGCGATTCAAGGGACAGTGTAA  
AGTTCCAACCTAGCCGATGGAACGTGGATCAGGCAGTCACCTCAAGGGG  
GCTCGAATGGCTGGCGAACGTACTACAGGAGTAAGTGGTACAACGATT  
ATGCAGTGCTGTGAAATCAGGATTACTATCAATCCGACACGTCCAAG  
AACCAAGTTCTCTGCAACTCAACTCAGTGACACCAGAGGATACGGCGT  
TTACTATTGTGACAGGAAGTGAACCTGATGATGCCCTTGACATTGGGG  
TCAGGGCACGATGGTTACGGTAAGCTCTGGGGAGGCAGTGGAGGG  
GGAGGTAGGGGGAGGGGATCTGATATACAGATGACACAAAGCCGT  
CATCCGTCACTGCTTCAGTTGGTATAAAGTAACCATTACGTGCCCGCTT

20

CCCAAGACGTAGCGGATGGTTGGCTTGGTATCAACAAAAACCGGGGTG  
GCTCCGCAACTCCTCATATCCGGTGCAGTACGCTCAAGCGAAGTCCC  
TAGCAGATTTCGGGGAGCGGGTCCGGTACAGATTCACGTTGACCATTAG  
CTCTCTCCAGCCGAAGATTTCAGAACCTACTATTGCCAACAGGCCAAA  
ATTTCATACATTGGTCAAGGCACTAAGCTCGAAATCAAAGCGGCC  
GCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGACTCCGGCCCAACCATCGC  
AAGCCAACCCCTCTCTGCGCCCGAAGCTGCGCCCGGCCGCGGGT  
GAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTGG  
GCCCGCTGGCCGGACTTGCGGCGTGCCTGCTGTCGCTGGTATCACC  
CTTACTGCAAGAGGGGCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCC  
GTTCATGCGCCCGTGCAGACACTAGGAAGAGGACGGATGCTCGTCA  
GATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAATGCGCGTCAAGTCTCA  
CGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCAGAATCAGCTTACAA  
CGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGA  
CGCGGACCGCACCCGGAGATGGGGGGAAACACGGCGGAAAAACCTC  
AGGAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTA  
CTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGAAAGGGTACGAC  
GGGCTGTACCAGGACTGAGCACGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTT  
GCATATGCAAGCACTCCCACCCCG

**SEQ ID NO: 124** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2210 (LP-scFv13-CD8TM-41BB-CD3zeta):

5 MLLLVTSLLCLELPHPAFLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTC AISGDSVSSN  
SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
QLNSVTPEDTAVYYCAQEVPDDAFDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGSGG  
GGSDIQMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQDVSGWLAQYQQKPGLAPQLLIS  
GASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFQQT  
KLEIKAAATTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCGRGRKKLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSC  
RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLKRR  
GRDPEMGGPKRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL  
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 125** es la secuencia de aminoácidos del scFv13 (16P20v2) LCDR1:

10 QDV SGW

**SEQ ID NO: 126** es la secuencia de aminoácidos del scFv13 (16P20v2) LCDR2:

15 GAS

**SEQ ID NO: 127** es la secuencia de aminoácidos del scFv13 (16P20v2) LCDR3:

QQAKNFPYT

20 **SEQ ID NO: 128** es la secuencia de aminoácidos del scFv13 (16P20v2) HCDR1:

GDSVSSNSAA

25 **SEQ ID NO: 129** es la secuencia de aminoácidos del scFv13 (16P20v2) HCDR2:

TYYRSKWN

30 **SEQ ID NO: 130** es la secuencia de aminoácidos del scFv13 (16P20v2) HCDR3:

AQEVPDDAFDI

**SEQ ID NO: 131** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv14) 16P1:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGAC  
 CCTCTCACTCACCTGTGACATCTCCGGGACAGTGTCTAGAACAGTGC  
 TGCTTGGAACTGGATCAGGAGTCCCCATCGAGAGGGCTTGAGTGGCTGG  
 GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTG  
 AAAAGTCGAATAACCACATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAAGTCTCC  
 GCAGCTGAACCTGTGACTCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCC  
 AAGAGATAGAACCTCATGATGCTTTGATATCTGGGACCAAGGGACAATG  
 GTCACCGTCTCTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGAGGTAGCGTGG  
 TGGCGGATCCGTATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTCTGCATC  
 TGTAGGAGACAAAGTCACCATCACTTGTGGCGAGTCAGGATGTTAGCG  
 GCTGGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCTAGCCCCCAGCTCTG  
 ATCTCTGGTGCATCCTCTTCAAGGTGGAGTCCCATCAAGGTTCAGCGGC  
 AGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA  
 AGATTTCGCACTTATTATTGTCAACAGGCTAAATATTCCCTTACACTTT  
 GCCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAA

**SEQ ID NO: 132** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv14) 16P1:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCDISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 TYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAQEIEP  
 HDAFDIWDQGTMVTVSSGGGGGGGGGGGGSVIQMTQSPSSVSASVGDKV  
 TITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISGASSLQGGVPSRFSGSQGTDFT  
 LTISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGKLEIK

5

**SEQ ID NO: 133** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2216 (LP-scFv14-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGTTGCTGCTCGTGACCTCGCTCCTTCTGTGCGAGCTGCCCATCCGGCT  
 TTTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTCGGTCTGGACTGGTC  
 AAGCCGTCCCAGACTCTGAGCCTGACTTGCATATTAGCGGGACTCAGT  
 CTCGCTCAATTGGCTGGCGACTTACTACCGGTCAAATGGTATAACGAC  
 GCCTGGAATGGCTGGCGCAGTGGATCCGGCAGTCACCATCAAGGG  
 TACGCCGTGTCGTGAAGTCCGGATCACCATTAAACCCGACACCTCGAA  
 GAACCAAGTCTCACTCCAAGTGAACAGCGTGACCCCCGAGGATACCGCGG  
 TGTACTACTGCGCACAAAGAAATCGAACCCGACGACGCCCTGACATTGG  
 GACCAGGGAACGATGGTCACAGTGTGTCGGTGGAGGAGGTTCCGGAG  
 GCGGTGGATCTGGAGGCGAGGTTGGATCCAGATGACCCAGAGCCCC  
 TCCTCGGTGTCGCATCCGTGGCGATAAGGTACCATTACCTGTAGAGC  
 GTCCCAAGGACGTGTCGGATGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGCT

10

TGGCTCCTCAACTGCTGATCTCCGGGCCAGCTCACTTCAGGGGGGGGTG  
 CCATCACGCTTCTCCGGATCCGGTCCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATC  
 AGCAGCCTCCAGCCTGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAACAGGCCAA  
 GTACTTCCCTATACCTTCGGACAAGGCACTAACGCTGGAAATCAAGGCCG  
 CCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCCAACCATC  
 GCAAGCCAACCCCTCCCTGCCCGGGAAAGCTTGGCCCGCCGCCGG  
 TGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGGCTCTGCGATATCTACATTG  
 GGGCCCGCTGGCGGGCACTTGGCGTGTCTGCTGCTGGTACAC  
 CCTTACTGCAAGAGGGCCGAAGAACGACTGCTTACATCTCAAGCAGC  
 CGTTCATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGGACGGATGCTCGTGC  
 AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTC  
 ACGGTCCGCCACGCCCGCATATCAACAGGGCAGAACAGCTCTACA  
 ACGAGCTGAACCTGGGAAGGGAGAGGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG  
 ACGCGGACGCCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCC  
 CAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAAGATGGCGGAAGCCT  
 ACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGGAAAGGGTCACG  
 ACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACC GCCACTAAGGATAACCTACGATGCC  
 TTGCAATGCAAGCACTCCCACCCCGG

**SEQ ID NO: 134** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2216 (LP-scFv14-CD8TM-41BB-CD3zeta):

15

MLLLVTSLLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCDISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSL  
 QLSNVTPEDETAVYYCAQEIEPHDAFDIWDQGTMVTVSSGGGSGGGGSGGG  
 GSVIQMTQSPSSVSASVGDKVITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISG  
 ASSLQGGVPSRFSGSQTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQQGK  
 LEIKAAATTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRF  
 PEEEggcelrvkfsrsADAPAYQQGQNQLYNELNLRREYDVLDRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 135** es la secuencia de aminoácidos del scFv14 (16P1) LCDR1:

5 QDV SGW

**SEQ ID NO: 136** es la secuencia de aminoácidos del scFv14 (16P1) LCDR2:

10 GAS

**SEQ ID NO: 137** es la secuencia de aminoácidos del scFv14 (16P1) LCDR3:

15 QQAKYFPYT

**SEQ ID NO: 138** es la secuencia de aminoácidos del scFv14 (16P1) HCDR1:

GDSVSSNSAA

**SEQ ID NO: 139** es la secuencia de aminoácidos del scFv14 (16P1) HCDR2:

20 YYRSKWN

**SEQ ID NO: 140** es la secuencia de aminoácidos del scFv14 (16P1) HCDR3:

25 AQEIEPHDAFDI

**SEQ ID NO: 141** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv15) 16P3v3:

CAAGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCTGGACTGGTCAAGCACTCCCAGAC  
 TCTGAGCCTGGCTGCGCGATTAGCGGGACTCAGTCTCGTCCAATTGG  
 CGGCCTGGAACTGGATCCGGCAGTCACCATCAAGGGGCCTGGAATGGCTC  
 GGGCGCACTTAACCGTCCAAATGGTATAACGACTACGCCGTGTCCGT  
 GAAGTCCCGATCACCATTACCCCGACACCTCGAAGAACCAAGTTCTCAC  
 TCCAACTAACAGCGTACCCCCGAGGATACCGCGGTGTACTACTGCGCA  
 CAAGAACTGCAGCCGAGGACGCCCTGGACATTGGGGCAGGGAACGA  
 TGGTCACAGTGTCTCGGTGGAGGAGGTTCCGGAGGCAGGTGGATCTGGA  
 GCGGAGGTTGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCCTCGTGTCCGC  
 ATCCGTGGCGATAAGGTATTACCTGTAGAGCGTCCCAGGACGTGT  
 CCGGATGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGCTTGGCTCCTCAACTG  
 CTGATCTCCGGCGCCAGCACTCTCAGGGGGAAAGTGCACAGCTCTCC  
 GGATCCGGTTCCGGCACCGACTTACCCCTGACCATCAGCAGCCTCCAGCC  
 TGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAACAGGCCAGTACTTCCCCTATAC  
 CTTGGACAAGGCACTAAGCTGGAAATCAAG

30

**SEQ ID NO: 142** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv15) 16P3v2:

QVQLQQSGPGLVKHSQTLSLACAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 YYRSKWNNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDETAVYYCAQEYQ  
 PQDALDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGSDIQMTQSPSFVSASVGDK  
 VIITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISGASTLQGEVPSRFSGSQGTDF  
 TLTSSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTKLEIK

35

**SEQ ID NO: 143** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2217 (LP-scFv15-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGTTGCTGCTCGTGANCTCGCTCCTCTGTGCGAGCTGCCCATCCGGCT  
TTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTCGGCTGGACTGGTC  
AAGCACTCCCAGACTCTGAGCCTGGCCTGCGCATTAGCGGGACTCAGT  
CTCGTCCAATTGGCGGCCTGGAACTGGATCCGGCAGTCACCATCAAGGG  
GCCTGGAATGGCTGGCGCACTTAACCGGTCAAATGGTATAACGAC  
TACGCCGTGTCGTGAAGTCCCAGTCACCATTAACCCGACACCTCGAA  
GAACCAAGTCTCACTCCAACCTGAACAGCGTGACCCCCGAGGATAACCGCG  
TGTACTACTGCGACAAGAAGTGCAGCCGAGGACGCCCTGGACATTGG  
GGCAGGGAACGATGGTCACAGTGTGTCGGTGGAGGAGGTTCCGGAG  
GCGGTGGATCTGGAGGCGGAGGTTGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCC  
TCCTCGTGTCCGATCCGTGGCGATAAGGTCAATTATTACCTGTAGAGCG  
TCCCAGGACGTGTCCGGATGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGCTT  
GGCTCCTCAACTGCTGATCTCCGGGCCAGCACTCTCAGGGGAAAGTGC  
CATCACGCTCTCCGATCCGGTCCGGCACCGACTCACCTGACCATCA  
GCAGCCTCAGCCTGAGGACTCGCCACTTACTACTGCCAACAGGCCAAG  
TACTTCCCCTATACCTCGGACAAGGCACTAACAGCTGAAATCAAGGCCGC  
CGCAACTACCACCCCTCGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCCAACATCG  
CAAGCCAACCCCTCTCCCTGCGCCCCGAAGCTTGGCCGCCGGCGCGGT  
GGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTG  
GGCCCCGCTGGCCGCACCTGCGCGTGCCTGCTGCGTGGTCATCAC  
CCTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAACGCTGCTTACATCTCAAGCAGC  
CGTTCATGCGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAATGCGCGTCAAGTCTC  
ACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAACATCAGCTACA  
ACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACGCTGCTGGACAAGCG  
ACGGCGACCGCAGCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCT  
CAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCT  
ACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGAAAGGGTCACG  
ACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCC  
TTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

5 **SEQ ID NO: 144** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2217 (LP-scFv15-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKHSQTLSLACAISGDSVSSN  
SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSL  
QLNSVPEDTAVYYCAQEVPQPDALDIWQQGTMVTSSGGGSGGGSGG  
GGSDIQMTQSPSFVSAVGDKVIITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISG  
ASTLQGEVPSRFSGSGSTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTKL  
EIKAAATTTPAPRPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSR  
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGR  
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ  
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

10 **SEQ ID NO: 145** es la secuencia de aminoácidos del scFv15 (16P3v2) LCDR1:

QDV SGW

15 **SEQ ID NO: 146** es la secuencia de aminoácidos del scFv15 (16P3v2) LCDR2:

GAS

20 **SEQ ID NO: 147** es la secuencia de aminoácidos del scFv15 (16P3v2) LCDR3:

QQAKYFPYT

25 **SEQ ID NO: 148** es la secuencia de aminoácidos del scFv15 (16P3v2) HCDR1:

GDSVSSNSAA

**SEQ ID NO: 149** es la secuencia de aminoácidos del scFv15 (16P3v2) HCDR2:

TYYRSKWYN

**SEQ ID NO: 150** es la secuencia de aminoácidos del scFv15 (16P3v2) HCDR3:

5  
AQEVQPQDALDI

**SEQ ID NO: 151** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv16) 16P8:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGGCCCTCGCAGAC  
CCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGC  
TGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTGAGTGGCTGG  
GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATACTGATTATGCAGTATCTGTG  
AAAAATCGAATAACCATAACCCAGACACATCCAAGAACATCAGTTCTCCCT  
GCAGCTGAACCTGTGACTCCCCAGGCACAGGCTGTGTATTACTGTGCC  
AAGAGGTAGAACCTCAGGATGCTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG  
GTCACCGTCTCTTCAGGAGGTGGCGGGCTGGCCGTGGAGGTAGCGGTGG  
TGGCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTGTCTGCATC  
TGTAGGAGACAAACTCACCATCACTTGTGGCGAGTCAGGATGTAGCG  
GCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCTAGCCCTCAGCTCCTG  
ATCTTGGTGCATCCACTTGAAGGTGAAGTCCCATCAAGGTTAGCGGC  
AGTGGATCTGGACAGATTACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGCCTGA  
AGATTTCGCCACTTATTATTGTCAACAGGGCTAAATATTCCCTACACTTT  
10  
GCCGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAA

**SEQ ID NO: 152** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv16) 16P8:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
TYYRSKWTYDYAVSVKNRITINPDTSKNQFLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVE  
PQDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDK  
VTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLIFGASTLQGEVPSRFSGSGSGTDF  
15  
TLTSSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGRGKLEIK

**SEQ ID NO: 153** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2218 (LP-scFv16-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGTTGCTGCTCGTACCTCGCTCCTTCTGTGCGAGCTGCCCATCCGGCT  
TTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGTCTGGACTGGTC  
AAGCCGTCCCAGACTCTGAGCCTGACTTGCAGCAATTAGCGGGACTCAGT  
CTCGTCAATTGGCGGGCTGGAACTGGATCCGGCAGTCACCATCAAGGG  
GCCTGGAATGGCTGGCGCACTTACTACCGGTCAAATGGTATACCGAC  
TACGCCGTGTCGTGAAGAACGGATCACCATTAACCCGACACCTCGAA  
GAACCAAGTCTCACTCAAAGTGAACAGCGTGACCCCCGAGGATACCGGG  
TGTACTACTGCGACAAGAAGTGGAAACCGCAGGACGCCCTCGACATTGG  
GGACAGGGAACGATGGTCACAGTGTGTCGGTGGAGGAGGTTCCGGAG  
GCGGTGGATCTGGAGGCGGAGGTTGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCC  
TCCTCGGTGTCGCATCCGTGGCGATAAGGTACCAATTACCTGTAGAGC  
GTCCCAGGACGTGTCGGATGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGCT  
TGGCTCCTCAACTGCTGATCTTCGGCGCCAGCACTTCAAGGGGGAAAGTG  
20  
CCATCACGCTTCTCCGGATCCGGTCCGGCACCGACTTCACCTGACCATC

AGCAGCCTCCAGCCTGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAACAGGCCAA  
GTACTTCCCCATACCTCGGAAGAGGCACTAAGCTGGAAATCAAGCGG  
CCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGACTCCGGCCCCAACCATC  
GCAAGCCAACCCCTCTCTTGCAGGGCTGGACTTGCCTGCATATCTACATTTG  
TGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCATATCTACATTTG  
GGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCAGGGCTGCCTGCCTGCTGCGTGGTCATCAC  
CCTTACTGCAAGAGGGCCGGAAGAAGACTGCTTACATCTCAAGCAGC  
CGTTCATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTC  
ACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTTACA  
ACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG  
ACGCGGACCGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCT  
CAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCT  
ACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGGAAAGGGTCACG  
ACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCC  
TTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

**SEQ ID NO: 154** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2218 (LP-scFv16-CD8TM-41BB-CD3zeta):

5 MLLLVTSLLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCAISGDSVSSN  
SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYTDYAVSVKNRITINPDTSKNQFSL  
QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPQDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGGGG  
GSDIQMTQSPSSVSASVGDKVITCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLIFG  
ASTLQGEVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGRGTL  
EIKAAATTTPAPRPPPTAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGR  
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAAYSEIGMGERRRGKGHDGLYQ  
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 155** es la secuencia de aminoácidos del scFv16 (16P8) LCDR1:

10 QDV SGW

**SEQ ID NO: 156** es la secuencia de aminoácidos del scFv16 (16P8) LCDR2:

15 GAS

**SEQ ID NO: 157** es la secuencia de aminoácidos del scFv16 (16P8) LCDR3:

QQAKYFPYT

20 **SEQ ID NO: 158** es la secuencia de aminoácidos del scFv16 (16P8) HCDR1:

GDSVSSNSAA

25 **SEQ ID NO: 159** es la secuencia de aminoácidos del scFv16 (16P8) HCDR2:

TYYRSKWYT

30 **SEQ ID NO: 160** es la secuencia de aminoácidos del scFv16 (16P8) HCDR3:

AQEVEPQDAFDI

**SEQ ID NO: 161** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv17) 16P13:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGAC  
 CCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCAGGGAACAGTGTCTCTAGCAACAGTGC  
 TGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTGAGTGGCTGG  
 GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTG  
 AAAAGTCGAATAACCACATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAAGTCTCCCT  
 GCAGCTGAACCTGTGACTCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCC  
 AAGAGGTAGAACCTCAAGATGCTTTGATATCTGGGCCAAGGGACAATG  
 GTCACCGTCTCTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGAGGTAGCGTGG  
 TGGCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTGTGCATC  
 TGTAGGAGACAAAGTCACCATCACTTGTGCCGAGTCAGGATGTTAGCG  
 GCTGGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCTAGCCCCCAGCTCTG  
 ATCTTGGTGCATCCACTTGAAGGTGAAGTCCCCTAAGATTAGCG  
 GGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA  
 AGATTITGCCACTTATTATTGTCAACAGGCTAAATATTCCCTTACACTTT  
 GCCCAGGGGACCAAGCTGGAAATCAAA

**SEQ ID NO: 162** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv17) 16P13:

5 QVQLQQSGPGLVKPSQLSLCAISGNSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 TYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAQEVE  
 PQDAFDIWGQQGTMVTVSSGGGGSGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDK  
 VTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLIFGASTLQGEVPSRFSGGGSGTD  
 FTLTISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTKEIK

**SEQ ID NO: 163** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2219 (LP-scFv17-CD8TM-41BB-CD3zeta):

10 ATGTTGCTGCTCGTGACCTCGCTCCTCTGTGCGAGCTGCCCATCCGGCT  
 TTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGTCAGCAGTCCGGCTGGACTGGTC  
 AAGCCGTCCCAGACTCTGAGCCTGACTTGCCTGCCATTAGCGGGAACTCAGT  
 CTCGCTCAATTGGCTGGCGACTTACTACCGGTCCTAACAGG  
 GCCTGGAATGGCTGGCGACTTACTACCGGTCCTAACAGG  
 TACGCCGTCTCGTGAAAGTCCGGATCACCATTAAACCCGACACCTCGAA  
 GAACCAAGTCTCACTCCAAGTGAACAGCGTGACCCCCGAGGATACCGCGG  
 TGTACTACTGCGCACAGAAGTGGAACCGCAGGACGCCCTCGACATTGG  
 GGACAGGGAACGATGGTCACAGTGTCCGGTGGAGGAGGTTCCGGAG  
 GCGGTGGATCTGGAGGCGGAGGTTCGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCC  
 TCCTCGGTGTCGCATCCGTGGCGATAAGGTACCATTACCTGTAGAGC  
 GTCCCAGGACGTGTCGGATGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGCT  
 TGGCTCTCAACTGCTGATCTTGGCGCCAGCACTTCAAGGGGGAGGTGC  
 CATCACGCTCTCCGGAGGTGGTCCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCA  
 GCAGCCTCCAGCCTGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAACAGGCCAAG

15 TACTTCCCCTACCTCGGACAAGGACTAAGCTGGAAATCAAGGCC  
 CGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCACTCCGGCCCCAACCATCG  
 CAAGCCAACCCCTCTCTTGCGCCCCGAAGCTTGGCCGCCGGCGGGGT  
 GGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCCTCGCATATCTACATTG  
 GGCCCCGCTGGCGGCACCTGCGGCGTGCCTGCTGTCGCTGGTCATCAC  
 CCTTACTGCAAGAGGGGCCAGAACAGCTGCTTTACATCTCAAGCAGC  
 CGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
 AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACACTGCGCGTCAAGTTCTC  
 ACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAACATCAGCTCTACA  
 ACAGACGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGACTACGGACGTGGACAAGCG  
 ACGCGGACCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCAAGGCCGGAAAAACCCCT  
 CAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAAGATGGCGGAAGCCT  
 ACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGAGGGAAAGGGTCACG  
 ACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCC  
 TTGCAATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

**SEQ ID NO: 164** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2219 (LP-scFv17-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGNSSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSL  
 QLSNVTPEDETAVYYCAQEVEPQDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGGSGGG  
 GSDIQMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLIFG  
 ASTLQGEVPSRFSGGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTTK  
 LEIKAAATTTPAPRPTPAFTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRF  
 PEEEggcelrvkfsrsADAPAYQQGQNQLYNELNLRREYDVLDRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 165** es la secuencia de aminoácidos del scFv17 (16P13) LCDR1:

5 QDV SGW

**SEQ ID NO: 166** es la secuencia de aminoácidos del scFv17 (16P13) LCDR2:

10 GAS

**SEQ ID NO: 167** es la secuencia de aminoácidos del scFv17 (16P13) LCDR3:

15 QQAKYFPYT

**SEQ ID NO: 168** es la secuencia de aminoácidos del scFv17 (16P13) HCDR1:

20 GNSVSSNSAA

**SEQ ID NO: 169** es la secuencia de aminoácidos del scFv17 (16P13) HCDR2:

25 YYRSKWWY

**SEQ ID NO: 170** es la secuencia de aminoácidos del scFv17 (16P13) HCDR3:

25 AQEVEPQDAFDI

**SEQ ID NO: 171** es la secuencia de ácido nucleico del aglutinante específico de CD22 (scFv18) 16P15:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGAC  
 CCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGC  
 TGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGG  
 GAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTG  
 AAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAAGTCTCCCT  
 GCAGCTGAACCTGTGACTCCGAGGACACGGCTGTGATTACTGTGCC  
 AAGAGGTAGAACCTCATGATGCTCTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG  
 GTCACCGTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGCGGTGGAGGTAGCGGTGG  
 TGGCGGATCCGACATCCAGATGACGAGTCTCCATCATCCGTGTCTGCATC  
 TGTAGGAGACAAAGTCACCATCACTTGTGGGGAGTCAGGATGTTAGCG  
 GCTGGTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCTAGCCCCCTCAGCTCCTG  
 ATCTTGGTGCATCCACTTGAAGGTGAAGTCCCATCAAGGTTAGCGGC  
 AGTGGATCTGGGACAGATTACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA  
 AGATTTCGCACTTATTATTGTCAACAGGCTAAATATTCCCTTACACTTT  
 GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA

30

**SEQ ID NO: 172** es la secuencia de aminoácidos del aglutinante específico de CD22 (scFv18) 16P15:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR  
 YYRSKWWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDETAVYYCAQEVE  
 PHDALDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDK  
 VTITCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLIFGASTLQGEVPSRFSGSGSGTDF  
 TLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTTKLEIK

35

**SEQ ID NO: 173** es la secuencia de ácido nucleico del CD22 CAR LTG2220 (LP-scFv18-CD8TM-41BB-CD3zeta):

ATGTTGCTGCTCGTGANCTCGCTCCTTCTGTGCGAGCTGCCCATCCGGCT  
 TTTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTCGGCCTGGACTGGTC  
 AAGCCCGTCCCAGACTCTGAGCCTGACTTCCGGCAGTACCATCAAGGG  
 GCCTGGAATGGCTCGGGCGACTTACTACCGGTCAAATGGTATAACGAC  
 TACGCCGTGTCCGTGAAGTCCCAGTCACCATTAACCCGACACCTCGAA  
 GAACCAAGTCTCACTCCAACCTGAACAGCGTGACCCCCGAGGATACCGCGG  
 TGTACTACTGCGACAAGAAGTGGAACCGCACGACGCCCTGGACATTGG  
 GGTCAAGGAAACGATGGTCACAGTGTGTCGGTGGAGGAGGTTCCGGAG  
 GCGGTGGATCTGGAGGCGGAGGTTCCGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCC  
 TCCTCGGTGTCCGCATCCGTGGCGATAAGGTACCCATTACCTGTAGAGC  
 GTCCCCAGGACGTGTCCGGATGGCTGGCTGGTACCCAGCAGAAGCCAGGCT  
 TGGCTCCTCAACTGCTGATCTTCGGCGCCAGCACACTTCAGGGGGAGGTG  
 CCATCACGCTTCTCCGGATCCGGTCCGGCACCGACTTCACCCGTGACCATC  
 AGCAGCCTCCAGCCTGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAACAGGCCAA  
 GTACTTCCCTATACCTCGGACAAGGACTAAGCTGGAAATCAAGGCAG  
 CCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATC  
 GCAAGCCAACCCCTCTCTTGCGCCCGAAGCTTGCCTGCCGCCGCCGG  
 TGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCATATCTACATTG  
 GGCCCCGCTGGCGGGCACTTGCCTGCCTGCTGTCGTGGTCATCAC  
 CCTTACTGCAAGAGGGGCCGAAGAACGACTCAGGAAGAGGAGCGATGCTCGTGC  
 CGTTCATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGAGCGATGCTCGTGC  
 AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGGTCAAGTTCTC  
 ACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAACATCAGCTCTACA  
 ACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG  
 ACGCGGACCGCAGCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCCT  
 CAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGAACAGATGGCGGAAGCCT  
 ACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAAAGGGTCACG  
 ACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCC  
 TTGCAATGCAAGCACTCCCACCCCGG

5 **SEQ ID NO: 174** es la secuencia de aminoácidos del CD22 CAR LTG2220 (LP-scFv18-CD8TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLLCLELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTC AISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTITNPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPHDALDIWQGQTMVTVSSGGGGSGGGGGSGG  
 GGSDIQMTQSPSSVSASVGDKVITCRASQDVSGWLAZYQQKPGLAPQLLIF  
 GASTLQGEVPSRFSGSQSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFQGT  
 KLEKAAATTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSC  
 RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDR  
 GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10 **SEQ ID NO: 175** es la secuencia de aminoácidos del scFv18 (16P15) LCDR1:

QDV SGW

15 **SEQ ID NO: 176** es la secuencia de aminoácidos del scFv18 (16P15) LCDR2:

GAS

20 **SEQ ID NO: 177** es la secuencia de aminoácidos del scFv18 (16P15) LCDR3:

QQAKYFPYT

25 **SEQ ID NO: 178** es la secuencia de aminoácidos del scFv18 (16P15) HCDR1:

GDSVSSNSAA

**SEQ ID NO: 179** es la secuencia de aminoácidos del scFv18 (16P15) HCDR2:

TYYRSKWYN

**SEQ ID NO: 180** es la secuencia de aminoácidos del scFv18 (16P15) HCDR3:

5 AQEVEPHDALDI

**SEQ ID NO: 181** secuencia nucleotídica de dominio transmembrana CD8 de ADN

ATTGGGCCCCGCTGCCGGCACTTGCGGCGTGCCTGCTGTCGCTGGTCATCA  
10 CCCTTACTGC

**SEQ ID NO: 182** es la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana CD8

15 IWAPLAGTCGVLLSLVITLYC

**SEQ ID NO: 183** secuencia nucleotídica de dominio de bisagra CD8 de ADN

ACTACCACCCCTGCCCTGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAG  
CCAACCCCTCTCCTTGCAGCCCCGAAGCTTGCCGCCGGCCGGTGGAG  
CCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTAC

20 **SEQ ID NO: 184** secuencia de aminoácidos del dominio de bisagra CD8

TTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIY

25 **SEQ ID NO: 185** secuencia de aminoácidos de la región bisagra y transmembrana de números de aminoácidos 137 a 206 de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3)

TTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAG  
TCGVLLSLVITLYC

30 **SEQ ID NO: 186** secuencia nucleotídica del dominio de señalización de ADN de 4-1BB

AAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTACATCTTCAAGCAGCCGTTATGCG  
GCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTGTGCAGATTCCCTG  
AGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTG

35 **SEQ ID NO: 187** secuencia de aminoácidos del dominio de señalización de 4-1BB

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

**SEQ ID NO: 188** secuencia nucleotídica del dominio de señalización de ADN de CD3-zeta

CGCGTCAAGTTCTACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCA  
GAATCAGCTCTACAAACGAGCTGAACCTGGGAAGGGAGAGAGGAGTACGAC  
GTGCTGGACAAGCGACGCCGACCGCACCCGGAGATGGGGGGAAACAC  
GGCGGAAAAACCCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAA  
GATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGG  
GGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGG  
ATACCTACGATGCCTTGATATGCAAGCACTCCACCCCGG

40 **SEQ ID NO: 189** secuencia de aminoácidos de CD3zeta

RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLKDRRGRDPEMGGKPR  
RKNPQEGLYNELQDKMMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDT  
YDALHMQALPPR

45 **SEQ ID NO: 190** secuencia nucleotídica de la secuencia del péptido líder/señal (LP)

ATGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTC  
TGCTGATTCCG

**SEQ ID NO: 191** secuencia de aminoácidos de la secuencia del péptido líder/señal (LP)

MLLLVTSLLLCELPHAFLLIP

5

**SEQ ID NO: 192** secuencia nucleotídica de ScFv CD19 (FMC63)

GACATTCAAGATGACTCAGACCACCTCTCCTGTCCCGCGTCACTGGGAGAC  
AGAGTGACCATCTCGTGTCCCGCAAGCCAGGATATCTCCAAGTACCTGAA  
CTGGTACCAACAGAACGCCGACGGGACTGTGAAGCTGCTGATCTACCACA  
CCTCACGCCCTGCACAGCGGAGTGCCAAGCAGATTCTCCGGCTCCGGCTCG  
GGAACCGATTACTCGCTTACCATTAGCAACCTCGAGCAGGAGGACATCGC  
TACCTACTTCTGCCAGCAAGGAAATACCCCTGCCCTACACCTTCGGCCGAG  
GAACCAAATTGGAAATCACCGCGGAGGAGGCTCCGGGGAGGAGGTTC  
CGGGGGCGGGGGTCCGAAGTGAAGCTCCAGGAGTCCGGCCCCGGCCTG  
GTGGCGCCGTCGCAATCACTCTGTGACCTGTACCGTGTGGGAGTGTCC  
CTGCCTGATTACGGCGTGAGCTGGATTCCGCAGCCGCCGGAAAGGGCCT  
GGAATGGCTGGGTGTCATCTGGGATCCGAGACTACCTACTACAACCTCGG  
CCCTGAAGTCCCCTGACTATCATCAAAGACAACCTCGAAGTCCCAGGTC  
TTTCTGAAGATGAACCTCCCTGCAAACGTACGACACCGCCATCTATTACTGT  
GCTAAGCACTACTACTACGGTGGAAAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCA  
AGGCACTCGGTGACTGTGTCAAGC

**SEQ ID NO: 193** secuencia de aminoácidos de ScFv CD19 (FMC63)

10

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR  
LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISLEQEDIATYFCQQQNTLPYTFGGGTKLEIT  
GGGGSGGGSGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI  
RQPPRKGLEWLGVIWGSETYYNSALKSRLTIKDNNSKSQVFLKMNSLQTDD  
TAIYYCAKHYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

**SEQ ID NO: 194** nucleótidos de 1538 FMC63 CAR (LP-FMC63-CD8TM-41BB-CD3zeta)

15

ATGCTTCTCCTGGTCACCTCCCTGCTCCTCTGCAGACTGCCTCACCCCTGCCT  
TCCCTCTGATTCCCTGACATTCAAGATGACTCAGACACCACCTCTCCTGTCCG  
CGTCACTGGGAGACAGAGTGACCATCTCGTGTCCCGCAAGCCAGGATATC  
TCCAAGTACCTGAACCTGGTACCAACAGAACGCCGACGGGACTGTGAAGCT  
GCTGATCTACCAACACCTCACGCCCTGCACAGCGGAGTGCACAGCAGATTCT

CCGGCTCCGGCTCGGAACCGATTACTCGCTTACCAATTAGCAACCTCGAG  
 CAGGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGAAATACCCGCCCTA  
 CACCTTCGGCGGAGGAACCAAATTGAAATCACCGCGGAGGAGGCTCC  
 GGGGGAGGAGGTTCCGGGGGGGGTCCGAAGTGAAGCTCCAGGAGT  
 CCGGCCCCGGCTGGTGGCGCGTCGAATCACTCTGTGACCTGTACCG  
 TGTCGGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGAAGCTGGATTGGCAGCCG  
 CCGCGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGTGTCATCTGGGATCCGAGACTAC  
 CTACTACAACCTCGGCCCTGAAGTCCCCTGACTATCATCAAAGACAAC  
 CGAAAGTCCCAGGTCTTCTGAAGATGAACACTCCCTGAAACTGACGACACC  
 GCCATCTATTACTGTGCTAACGACTACTACACGTGGAAGCTATGCTATG  
 GACTACTGGGGCAAGGCACTCGGTGACTGTGTCAGCGCGGCCAAC  
 TACCACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCC  
 AACCCCTCTCTTGCGCCCCGAAGCTTGGCGCCGGCGGGGTGGAGCC  
 GTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTGGGCCCCG  
 CTGGCCGGCACTTGCCTGCGTGCCTGCTGTCATCACCCCTTAC  
 TGCAAGAGGGGCCGGAAGAACGACTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTTCAT  
 GCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTCAGATTCC  
 CTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTCGCGTCAAGTCTCACGGTC  
 CGCCGACCCCCCGCATATCACAGGGCCAGAACATCAGCTCTAACAGAGC  
 TGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACCGG  
 ACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCAACGGCGGAAACCCCTCAGGAA  
 GGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAG  
 AAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGAAAGGGTCACGACGGGC  
 TGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCCTGCAT  
 ATGCAAGCACTCCCACCCCGG

**SEQ ID NO: 195** es la secuencia de aminoácidos de la proteína de CAR específico de CD19 LTG1538 (scFv, FMC63) (LP-FMC63-CD8TM-41BB-CD3zeta)

5

MLLVTSLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYL  
 NWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSQSGTDYSLTISNLEQEDIATY  
 FCQQQNTLPYTFGGGTKEITGGGGGGGGGGSEVKLQESGPLVAPSQ  
 SLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI  
 IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYGGYAMDYWQQGTSTVSS  
 AAATTPAPRPPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAP  
 LAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEE  
 EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNENLGRREYDVLKRRGRDPE  
 MGKPRRKNPQEGLYNELKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS  
 TATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 196** es la secuencia de ácido nucleico de CAR específico de CD22 LTG2200 (scFv, nucleótidos de m971 CAR (LP-m971-CD8TM-41BB-CD3zeta):

10

ATGCTTCTTTGGTGAACCTCCCTTGTGCTGTGCGAGTGTGCCACACCCCGCCT  
 TCCTGCTTATTCCCCAGGTACAGCTCCAGCAGAGTGGCCCAGGGCTCGTG  
 AAGCCAAGCCAGACGCTGCTCCCTGACTTGTCAATTCAAGGGATTCACT  
 TTCATCAAATAGCGCGCGTGAATTGGATTGACAATCTCCTTCCGAG  
 GTTGGAAATGGCTTGGACAAACATATTACAGATCAAATGGTATAACGAC  
 TATGCGGTATCAGTAAAGTCAAGAATAACCATTAAACCCGACACAAGCAA

GAACCAATTCTCTTGCAGCTTAACCTGTACGCCAGAACAGACACGGCAG  
 TCTATTATTGCCTCGCGAGGTAACGGGTACCTGGAAGACGCTTTGAC  
 ATTGGGGGCAGGCTACGATGTCAGACTCACCTCAGGGGGCGTGGGA  
 GTGGGGGAGGGGTAGCGGGGGGGAGGGTACAGACATTAGATGACCCA  
 GTCCCCTTCATCCTTGTCTGCCTCGTGGTACAGGGTACAATAACATG  
 CAGAGCAAGCCAACAAATCTGGAGCTATCTCAACTGGTACCGAGCGAC  
 CAGGAAAAGCGCAAACCTGCTGATTACGCTGCTCCCTCCCAATCA  
 GGCCTGCCTAGTAGATTAGCGGTAGGGCTCCGGCACCGATTACGCT  
 CACTATAAGCTCTTCAAGCAGAAAGATTGCACTTACTGCCAGCA  
 GTCCTATAGTATACTCAGACTTCGGACAGGGTACCAAGTTGGAGATTA  
 AGCGGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCCA  
 ACCATCGCAAGCCAACCCCTCCCTGCGCCCCGAAGCTGCCGCCGGC  
 CGGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCT  
 ACATTGGGCCCCGCTGGCCGGACTTGGCGTGTCTCTGCTGTGGCTGG  
 TCATCACCTTACTGCAAGAGGGCCGAAAGAACGCTGCTTACATCTC  
 AAGCAGCCGTTATCGGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGAT  
 GCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCCGT  
 CAAGTTCTCACGGTCCGCCAGCCTCCGATATCACAGGGCCAGAACATC  
 AGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCT  
 GGACAAGCGACGCCAGCGAACCGGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGG  
 AAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGG  
 CGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAGGGAAA  
 GGGTCACGACGGCTGTACCAAGGACTGAGCACCCGCACTAAGGATACCT  
 ACGATGCCTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

**SEQ ID NO: 197** es la secuencia de aminoácidos de LTG2200 CD22 de CAR específico de CD22 (LP-m971scFv-CDTN-41BB-CD3zeta):

5

MLLVTSLLCLELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCaisGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSL  
 QLSVTPEDTAVYYCAREVTGDLedAFDIWQGQTMVTSSGGGGSGGGSG  
 GGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIY  
 AASSLQSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFQQGK  
 LEIKAATTTPAPRPPAPTIAQSPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRF  
 PEEEFGGCELRVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

**SEQ ID NO: 198** es la secuencia nucleotídica del dominio de unión de scFv reactivo con mesotelina (LTG1904):

10

GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGAGGGCTTGGTACAGCCTGGGGTC  
 CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTGATGATTATGCCAT  
 GCACTGGTCCGGCAAGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGGTA  
 TTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGA  
 TTCACCATCTCAGAGACAACGCCAAGAACCTCCGTATCTGCAAATGAA  
 CAGTCTGAGAGCTGAGGACACCCCTTGATTACTGTGCAAAGATTAT  
 CGTCAGTGGCTGGACCCTTAACTACTGGGCCAGGGCACCCGGTACCC  
 GTCTCCTCAGGAGGTGGCGGGCTGGTGGAGGCGTAGCGGCGGTGGCGG  
 ATCCTCTTGTAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTGTGCGCTTGGGACA  
 GACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACGCTATTATGCA  
 GCTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGGACAGGCCCTGTACTTGTATCTGG  
 AAAAACACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCAGTCTCTGGCTCCAGCTC  
 AGGAAACACAGCTCCTTGACCATCACTGGGCTCAGGCAGGAGGATGAGG  
 CTGACTATTACTGTAACTCCCCGGACAGCACTGGTAACCATCTGGTATT  
 CGGGAGGCACCCAGCTGACCGTCCTCGGT

15

**SEQ ID NO: 199** es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión de scFv reactivo con mesotelina (LTG1904):

EVQLVQSGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGI  
SWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDLSSV  
AGPFNYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGSSSETQDPAVSVALGQTVR  
ITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASL  
TITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHLVFGGGTQLTVLG

**SEQ ID NO: 200** es la secuencia nucleotídica del CAR específico de mesotelina LTG1904 (LP-LTG1904-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

5

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGCGAACTGCCGCATCCGGC  
GTTTCTGCTGATTCCGGAGGTCCAGCTGTCAGCTCTGGGGAGGCTTGG  
TACAGCCTGGGGGTCCTGAGACTCTCCTGTCAGCCTCTGGATTACCT  
TTGATGATTATGCCATGCACTGGTCCGGCAAGCTCAGGGAAAGGGCCTG  
GAGTGGGCTCAGGTATTAGTGGAAATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGA  
CTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCC  
TGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTGTATTAC  
TGTGCAAAAGATTATCGTCAGTGGCTGGACCTTAACTACTGGGCCA  
GGCACCCCTGGTCACCGTCTCCCTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGAGGCG  
GTAGCGGGGGTGGCGGATCCTCTGAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTG  
TCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCT  
CAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGACAGGCCCTG  
TACTTGTATCTATGGTAAAAAACACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGA  
TTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCTGACCATCACTGGGCT  
CAGGCGGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCAGGACAGCAGTGG  
TAACCATCTGGTATTGGCGGGAGGCACCCAGCTGACCGTCTCGTGC  
CCGCAACTACCACCCCTCTCCTGGCGGGAGGCACCCAGCTGACCGTCTCGTGC  
GCAAGCCAACCCCTCTCCTGGCGGGAGGCACCCAGCTGACCGTCTCGTGC  
TGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTG  
GGCCCCGCTGGCCGGACTTGCAGGCTGCTCTGCTGTCGTGGTCATCAC  
CCTTACTGCAAGAGGGCCCGAAGAACAGCTGTTACATCTCAAGCAGC  
CGTTCATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCAGCTCGTCAAGTCTC  
ACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAACATCAGCTTACA  
ACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGGAGTACGACGTGGACAAGCG  
ACGCGGACCGGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCT  
CAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGAACAGATGGCGGAAGCCT  
ACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAAAGGGTCACG  
ACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACC GCCACTAAGGATACTACGATGCC  
TTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

10

**SEQ ID NO: 201** es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1904 (LP-LTG1904-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDD  
YAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ  
MNSLRAEDTALYYCAKDLSSVAGPFNYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGG  
GGSSSETQDPAVSVALGQTVRITCQGDSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYG  
KNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHLVFGGG  
TQLTVLGAAATTTPAPRPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA  
CDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG  
CSCRFPEEE EGCGELRVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELNLGRREYDVLDK  
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHD  
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

15

**SEQ ID NO: 202** es la secuencia nucleotídica del dominio de unión monocatenario reactivo con CD33 VH-4 (LTG1906):

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTC  
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCAT  
GAGCTGGTCCGCCAGGCTCAAAGACAAGGGCTGAGTGGTGGCCAAC  
ATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATCGGACTCAGTGAAGGGCC  
GATTCAACCCTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG  
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCACGTATTACTGTGCGAAAGAAA  
ATGTGGACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCCTCCTCA

**SEQ ID NO: 203** es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión monocatenario reactivo con CD33 VH-4 (LTG1906):

5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPRQGLEWVANI  
KQDGSEKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAKENVD  
WGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO: 204** es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1906 (LP-VH4-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGC  
GTTCTGCTGATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG  
TACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT  
TCAGTAGCTATGGCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAAAGACAAGGGCTT  
GAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGCGG  
ACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCAAGAACACG  
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGCCACGTATTA  
CTGTGCGAAAGAAAAATGTGGACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCT  
CCTCAGGGCCGCAACTACCACCCCTCCTGCGCCCCGAAGCTTGCCTGCGATA  
CCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTGCGCCCCGAAGCTTGCCTGCGATA  
GGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATA  
TCTACATITGGGCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGTCTGCTGTCGC

10

TGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGCCGAAAGAAGCTGCTTACATC  
TTCAAGCAGCCGTTATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGG  
ATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGC  
GTCAAGTTCTCACGGTCCGCCAGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAA  
TCAGCTCTACAACGAGCTAACCTGGGAAGGGAGAGAGGAGTACGACGTG  
CTGGACAAGCGACGCCGACCGAGATGGGGGGAAACCAACGGC  
GGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGAT  
GGCGGAAGCCTACTCAGAAATGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGA  
AAGGGTCACGACGGCTGTACCAAGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATA  
CCTACGATGCCTGATATGCAAGCACTCCCACCCCG

**SEQ ID NO: 205** es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1906 (LP-VH4-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

15

MLLLVTSLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY  
GMSWVRQAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM  
NSLRAEDTATYYCAKENVDWGGQGTLVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPL  
SLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYCKRGR  
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRFPIEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ  
GQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK  
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno CD22 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 152, o 162, al menos un dominio transmembrana, y al menos un dominio de señalización intracelular.
- 10 2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que al menos un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno CD22 está codificado por una secuencia nucleotídica que comprende SEQ ID NO: 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 151, o 161.
- 15 3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el al menos un dominio de unión al antígeno CD22 codificado, el al menos un dominio de señalización intracelular, o ambos, están conectados al dominio transmembrana mediante un dominio enlazador o espaciador, opcionalmente en la que el dominio enlazador o espaciador codificado deriva del dominio extracelular de CD8 o CD28, y está unido a un dominio transmembrana.
- 20 4. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el dominio de unión al antígeno CD22 extracelular codificado está precedido por una secuencia nucleotídica líder que codifica un péptido líder, opcionalmente en la que la secuencia nucleotídica líder comprende una secuencia nucleotídica que comprende SEQ ID NO: 190 que codifica la secuencia de aminoácidos líder de SE ID NO: 191.
- 25 5. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana de una proteína que comprende la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD8, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD83, CD86, CD134, CD137, CD154, y TNFRSF19, o cualquier combinación de los mismos.
- 30 6. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el al menos un dominio de señalización intracelular codificado comprende además un dominio intracelular CD3 zeta.
- 35 7. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el al menos un dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio coestimulador, un dominio de señalización primario, o cualquier combinación de los mismos, opcionalmente en la que el al menos un dominio coestimulador codificado comprende un dominio de señalización funcional de OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12, y 4-1BB (CD137), o cualquier combinación de los mismos.
- 40 8. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) codificado por la molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el CAR es como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 45 9. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que opcionalmente el vector se selecciona del grupo que consiste en un vector de ADN, un vector de ARN, un vector plasmídico, un vector cósmido, un vector del virus del herpes, un vector del virus del sarampión, un vector de lentivirus, vector adenoviral, o un vector de retrovirus, o una combinación de los mismos, que opcionalmente comprende además un promotor, además opcionalmente en el que el promotor es un promotor inducible, un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido, un promotor suicida o cualquier combinación de los mismos.
- 50 10. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 9, opcionalmente en la que la célula es una célula T, además opcionalmente en la que la célula T es una célula T CD8+.
- 55 11. Un método para producir una célula, que comprende transducir una célula T con un vector de la reivindicación 9.
- 60 12. Un método para generar una población de células diseñadas con ARN, que comprende introducir un ARN transrito in vitro o un ARN sintético en una célula, en el que el ARN comprende una molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 65 13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de células T humanas, en la que las células T comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en la que el CAR comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno CD22 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 152 o 162, al menos un dominio enlazador, al menos un dominio transmembrana, al menos un dominio de señalización intracelular, y en la que las células T son células T de un ser humano que tiene cáncer.
- 70 14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz antitumoral de una población de células T, en la que las células T comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en la que el CAR comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno CD22 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 152, o 162, al menos un dominio enlazador o espaciador, al menos un dominio transmembrana, al menos

un dominio de señalización intracelular, en la que las células T son T células de un sujeto que tiene cáncer, en la que la composición farmacéutica es para uso en un método para tratar el cáncer en dicho sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto la composición farmacéutica.

- 5 15. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 14, en la que las células T son células T de un ser humano que tiene un cáncer hematológico, opcionalmente en el que el cáncer hematológico es leucemia o linfoma, opcionalmente además en el que la leucemia es leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), o leucemia mielógena crónica (CML), o en el que el linfoma es un linfoma de células del manto, un linfoma no de Hodgkin (NHL) o un linfoma de Hodgkin.



FIGURA 1

LTG2202: secuencia de ácido nucleico de LP-16P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 3)

ATGCTTCTCTGGTACAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCAACACCCAGCA  
 TTCCCTCTGATCCCACAAGTACAACCTCCAGCAAAGCGGGCTGGTCTGGT  
 GAAGCCGTACAGACGCTTCACTTACGTGTGCGATCTCCGGTACTCCGT  
 GAGTTCTAAAGCGCGGCTTGGAACTGGATTAGGCAGTCTCCATCCCGAG  
 GATTGGAAATGGCTCGGAGGACTTATTATAGAAGTAAGTGGTACAACGAT  
 TATGCAGTCTCTGTGAAATCTGCATCACCATTAAACCCAGACACGTCTAAG  
 AATCAATTCACTCTCAACTCAACTCTGTAAACCCCCGAAQGATAACAGCGT  
 CTACTACTGTGCTCAGGAGGTGCAACCCCCACGATGCTTTGATATCTGGGG  
 CCAGGGTACCATGGTTACGGTGTCTCTGGGGGAGGGGGTCCGGTGGGG  
 GAGGATCAGGGGGTGGGGCAGCGACATACAAATGACGCAATCCCCGTC  
 TTCTGTTCTGCTCTGCGAGATAAAGTAACAATAACCTGTCAGCGTC  
 ACAGGACGTTAGTGGCTGGCTGCGTGGTATCAGCAAAAACCGGGGCTCG  
 CCCCACATTGCTTATATTGGAGCGAGTACTCTTCAGGGCGAGGTACCTA  
 GCAGATTCTGGTCCGGCTCAGGTACGGACTTCACCCCTGACCATATCTA  
 GCTTGAGCCTGAAGATTTGCCACCTACTATTGTCACACAGGCGAAGAAC  
 TTTCCATATAACGTTGGGAGGGTACGAAATTGGAGATAAAAGCGGCCGC  
 AACTACCAACCCCTGCCCTGGCCGCCACTCCGGCCCCAACATCGCAA  
 GCCAACCCCTCTCTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 GCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTGGGCC  
 CCGCTGGCCGGCACTTGCCTGCTGCTGCTGGTACATACCCCT  
 TACTGCAAGAGGGGCCCGGAAGAAGACTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTT  
 CATGGGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTGTCAGA  
 TTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACG  
 GTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGCCAGAATCAAGCTCTACAACG  
 AGCTGAACCTGGGAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAAGCGACG  
 CGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCTCAAG  
 GAAGGACTGTACAAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGGGAAAGGGTACGACG  
 GGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTG  
 CATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

LTG2202: secuencia de aminoácidos de LP-16P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 3)

MLLIVTSLLCELPHPAFLLIPOVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC A ISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVPHDIAFDIWGQQTMTVSSGGGGSGGGGSGG  
 GGSDIQMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAQQLIIF  
 GASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFILTISLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFGQGT  
 KLEIKAATTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC  
 RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRR  
 GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIOMKGERRRGKGDGL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2A

LTG2246: secuencia de ácido nucleico de LP-24P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 13)

ATGCTGCTGTTGGTACATCACTTCTGCTCTGTGAACTCCCCATCCAGCC  
 TTTCTGCTTATACCGCAAGTACAGCTGCAACAATCTGGCCCTGGGCTTGTG  
 AAACCCCTCTCAGACTTGTCTTGACGTGCGCGATAAGTGGCGATTCAAGTT  
 AGTTCTAACAGCGCCCTTGGAACTGGATTAGACAGAGCCCCAGTCGGGG  
 ACTCGAACATGGCTTGGCGACTTATTATCGCAGTAAATGGTATAATGATTA  
 TGCTGTGAGTGTGAAAAGTAGGATCACAACTAACCCCCGATACGAGCAAGA  
 ATCAATCTCATTGCAACTGAACAGCGTCACTCCCAGGGATACAGCTGTA  
 TATTATTGTGCAAGAGAACGGTGGTGGTATGGCGAGATGGATGTATGGGG  
 GAAAGGAACCTACGGTAACGTGTCAGTGGCGGGAGGCAGGTTCAAGGTGGT  
 GAGGCTCTGGAGGGAGGGTCCGAAATCGTGTACCCAGCTCCGGCT  
 ACTCTGAGCGTTAGTCCGGGTGAAAGGGCCTCACTCTCTGTGAGGTTCA  
 CAGTCAGTCTCTCTACTTGGCTTGGTATCAGCAGAACCCAGGTCAAGGCG  
 GCCCCGCTTGTCAATTACGACGCAAGCACAGCGACAGGCACTCCAG  
 ACAGATTTCTGGTCTGGTCTGGCACGGACTTTACTCTTACTATAAACT  
 CACTTGAGGCAGAGGATGTCGACTTACTATTGTCACCAATCAAGCTCT  
 CTGGCTTACACCTTGGCAAGGCAACAAACTCGAAATCAAGGTACGGT  
 ATCATCTGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCGACTCCGG  
 CCCCCAACATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGGCCCCGAAAGCTTGGCC  
 CGGCCGCGGGTGGAGCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGGCTTGCAT  
 ATCTACATTGGGCCCCCTGGCCGGACTTGGCCGGTGTCTGTGTC  
 CTGGTCACTACCCCTTACTGCAAGAGGGCCGGAAAGAACGCTGCTTACAT  
 CTTCAAGCAGCCGTTCATGCGGCCGTOCAGACGACTCAAGAACAGGACG  
 GATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGG  
 CGTCAAGTCTCACGGTCCCGCOACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGA  
 ATCAAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACG  
 GCTGGACAAGCGACCGCGACCGAGATGGGGAAACCCACCG  
 CGGAAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAAGACAAGA  
 TGGCGGAAGGCTACTCAGAAATCGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAGGG  
 AAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCCCACTAAGGAT  
 ACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

LTG2246: secuencia de aminoácidos de LP-24P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 14)

MLLIVTSLLLCELPHFAFLIIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGDSVSSN  
 SAAWNWIQSPSRQLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAREGGWYGE MDVWKGTTTVSSGGGSGOGGGSG  
 GGGSEIVLTQSPATLSVSPGERASLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY  
 DAS TRATGIPDRFSGSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPYTFGQGT  
 LEIKVTVSSAAATTTPAPRPPPTAPTHASQPLSLRPEACRPAAGGA  
 VHTRLDFACDIYIWAPLAGTCVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF  
 MRPVQTTQEDGCSCRFPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQ  
 QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY  
 NELQKD  
 KMAEAYSEIGMKGERRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2B

## LTG2247: secuencia de ácido nucleico de LP-25P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 23)

ATGCTTCTCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCAACACCCAGCA  
 TTCTCTGATCCCACAAGTACAGCTCCAACAGAGTGGACCTGGTCTCGTT  
 AAGCCGTCCTAAACACTGTCTTGACGTGCGCTATTAGTGGCGACAGCGT  
 ATCATCCAATTCGCTGCTTGGAACTGGATTAGACAGTCACCGTCCAGAG  
 GCTTGGAAATGGCTGGCAOGGACGTACTACCGCTCAAATGGTATAACGAT  
 TACGGGTTAGTGTCAAATCCAGGATTACCATTAACCTGACACAAGTAA  
 GAATCAGTTCTCTICAGCTGAATTCCCTGACTCCCTGAGGATACGGCCGT  
 TTACTACTGTGCCGAGAACACCAGAATGAGGCCGTTTGATATTGGG  
 GGCAAGGAACAAATGGTCACAGTTAGCAGTGGGGGGGGTGGCTCCGGGG  
 AGGTGGTCCGGCGGGCGGTGGTCTCAATCCGCTCTGACACAAACCTCCCTC  
 AGCGAGCGGGACTCCCGTCAAAGGGTGACCATCTCTGTTCTGGGGAG  
 GTAGTAACATCGGGACAAATACTGCGTCTGGTATCAGCAACTCCCTGG  
 ACCGCTCCAAGTTGTGATATATCGCAATACGCAACGACCTAGTGGGAT  
 ACCTGATAGATTCAAGCGGAAGCAAAAGTGGTACGAGTGCCTTGGCAA  
 TATCTGCCCTCCAGTCCGAGGAACGAAAGGGATTACTATTGTGCCGCTGG  
 GATGACTCACTGAATGOTTATGTGTTGGTGCAGGTACTCAACTCACCGTA  
 CTTGGTGCGGCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCGACTCCGGC  
 CCCAACATCGCAAGCCAACCCCTCTCTTGCCTGGGGGGAAAGCTTGCCGCC  
 GGGCGGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCCCTGCCATA  
 TCTACATTGGGCCCCCTGGCCGCACTTGCCTGGCTCTGCTGCG  
 TGGTCATCACCCCTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTACATC  
 TTCAAGCAGCCGTTCACTGGGCCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGG  
 ATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGC  
 GTCAAGTTCTACCGTCCCGACCCCCCGCATATCAACAGGCGCAAGAA  
 TCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGGACTACGACGTG  
 CTGGACAAGCGACGCCGACGCCGACCCCGAGATGGGGGGAAACCAACCGC  
 GGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGAT  
 QGGGAAACCTACTCAAGAAATCGGGATGAAAGGGAGAGCGGGAGGGGA  
 AAGGGTCACGACGGCTGTACCAAGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATA  
 CCTACGATGCCCTGCAATGCAAGCACTCCCACCCCGG

## LTG2247: secuencia de aminoácidos de LP-25P-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 24)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPOVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAW  
 NWIRQSPSRGLEWLGRTRYRSKWYNDYAVSVKSRTITNPDTSKNQFSLQLNSLTPED  
 TAVYYCAREHQNEAAFDIWGQGTMTVSSGGGGGGGGGGGGQSVLTOPPSAS  
 GTPGQRTVTISCGGGSNIGTNTASWYQLPGTAKPLLIYRNTQRPSGIPDRFSGSKSGT  
 SASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGAGTQLTVLGAATTTPAPRPTPAP  
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLLSLVITLYCKR  
 GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEQDCSCRPEEEEGOCELRVKFSRSADAPAYQQQQ  
 NQLYNELNLGRREEYDVLDKRGGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS  
 EIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2C

LTG2248: secuencia de ácido nucleico de LP-11s-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 33)

ATGCTTCTCTGGTACAAGCTCTGCTCTGTGAGTTACCAACACCCAGCA  
 TTCTCTGATCCCACAAGTCCAGTGCACAGTCCCGGCCAGGTCTGGTT  
 AAGCCATCCAAAATCTGAGTTGACGTGCCTATTAGCGGAGGATTCCGT  
 GTCCAGCAATTCTGCAACCTGAAATTGGATCCGGCAGAGTCCGAGTGGCG  
 GTTTGGAATGGCTCGGACGCACCTACTACAGGAGCAAATGGTACGATGAT  
 TATGCTGTTCTGTCGCGCTCTCGAACATACCATGAATCCTGATACCTAAAG  
 AACCAATTCTTGCAGTTAACCTCCGTACGCCCTGAAGAGATACTGCCGTC  
 TACTATTGCCACCGCAAGGCGTAGCCGGCGATTGATTACTGGGGCA  
 AGGAACATTGGTCACGGCTCTCTCTGGGGAGGGATCAGGAGGCCGG  
 GGTCAAGGTGGAGGTGGAGCGATATTCAACCTTACGGAGTCTCCGACGAG  
 TCTTCTGCTTCCGTGGAGAGACCGAGTGCACGATTACTTGTAGGGCATCTCA  
 GTCAATAAGTCCATCTTAACTGGTATCACCGAGACTCTCCGACGAG  
 CAAAACCTCTTATTTATGCCGCATCTCATGCCAATCCGGCGTGCCTTCCC  
 GATTTCCGGATCTGGCTCAGGCACTGACTTACCTTGAATTTAGTTCCC  
 TTCAACCAGAAGATTGGCTACCTATTACTGCCAACATACAGTACCC  
 CATATACATTCCGCCAAGGCACGAAATTGGAGGATTAAGCGGCCGCAACT  
 ACCACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCAACCATCAGCAAGCCA  
 ACCCTCTCTTGCGCCCGGAAGCTGCCGCCCGGCCGCGGTGGAGCCG  
 TGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTTGGCCCCGC  
 TGGCCGGCACTTGCGGCGTGCCTGCTGTCGCTGGTCACTACCCCTTACT  
 GCAAGAOGGGCGGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCGTTCATG  
 CGGCCGCGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCT  
 TGAGGAGGAAGAOGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGTCAAGTCTACGGTCC  
 CGCACGCCGGAGATGGGGAAACCAACGGCGGAAAAACCCCTCAGGAAG  
 GACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGA  
 AATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGAGGGAAAGGTCACGACGGCT  
 GTACCAAGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCATGCA  
 TGCAAGCACTCCCACCCCGG

LTG2248: secuencia de aminoacidos de LP-11s-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 34)

MLLVLTSLLCELPHPAFLLIPQVQLQOSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATW  
 NWIRQSPSGGLEWLGRYYRSKWYDDYAVSVRSRITMNPDTSKNQESLQLNSVTPE  
 DTAVYYCAREGVAGDFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIQLTQSPSSLS  
 ASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD  
 FTLTISSLQPEDEATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIKAAATTTPAPRPPPTPAFTIASQPL  
 SLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYCKRGRKKLL  
 YIFKQPFMRPVQTTQEEGCSRFPREEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNE  
 LNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDKMAEAYSEIGMKG  
 ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALIJMQLPPR

## FIGURA 2D

LTG2249: secuencia de ácido nucleico de LP-12S-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 43)

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACACACACCCAGCA  
 TTCTCCTGATCCCACAAGTTCAGTTGCAGCAGAGTGGCCCTGGGCTTGT  
 AAACCATCACAGACGCTCTCACTGACCTGTGCCATCTCTGGAGACAGTGT  
 AAGTCTAACTCAGCCCGTGGAAATTGGATTAGACAATCACCAACCCGGG  
 GACTTGAATGGCTTGGTCGGACGTACTATAAGATCTAAGTGGTATAATGAC  
 TACGCAGTGTCACTGAAATCACGGATAACCATAAACCTGACACCCAGCAA  
 AAACCAATTCTCTCAGCTTAATTCCGTCACGCCAGAAGATAACCCGGT  
 TTACTACTGTGGAGGGAAAGGTGATGACGCATTGGACATCTGGGTCAGG  
 GGACCATGGTCACTGTCTTCCGGCGGGGGGGTAGTGGAGGGGGTGGC  
 TCAGGTGGTGGCGGGTCAGATAACAAATGACACAGACGCCAGTACTCT  
 GAGTCTTCACTGGCGACCGCGTAACATAACCTGTAGAGACATCCAAA  
 GCATTTCCCACTTCTTAATTGGTACCAAGCAGAACGCCGGCACAGCGCCC  
 AAACCTCTGATCACCACTGGGACGGACTTGGTCAAGGTCTCACGATAAACTCC  
 TCAGCCTGAGGACCTGGGACATATTACTGTCAACAATCTTACACCA  
 CACTGACATTGGAGGGGGCACAAAATGGAGATCAAAGCGGCCAAC  
 TACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCC  
 AACCCCTCTCTTGCGCCCGAAGCTTGCCTGGGGCGGGGTGGAGCC  
 GTGCATAACCGGGGGCTGGACTTTGGCTGGATACTACATTTGGGCC  
 CTGGCCGGCACTTGGGGGTGCTCTGCTGCTGGTCATCACCTTAC  
 TGCAAGAGGGGCCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAAGCCGGTAC  
 GCGGCCGGTGCAGACGACTCAGGAAGAGAGGGATGCTGTGAGATTCC  
 CTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTCTCACGGTC  
 CGCCGACGCCCGCATATCAACAGGCCAGAACGCTCTACAAACGAGC  
 TGAACCTGGGAAGAGAGAGAGGGATACGAGCTGCTGGACAAGCGACGCC  
 ACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAACCCCTCAGGAA  
 GGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAG  
 AAATCGGGATGAAAGGGAGAGCGGGAGGGAAAGGGTCACGACCGGG  
 TGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCCTG  
 ATGCAAGCACTCCCACCCCGG

LTG2249: secuencia de aminoácidos de LP-12S-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 44)

MLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQOSGPLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTTNPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAREGDDALDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGGGG  
 SDIQMTQSPSSLSASVGDRVHTCRASQSHFLNWYQQKPGTAPKLLITASG  
 LGSGVPSRFSQSGSGTDFTLTINSLQPEDLATYYCQQSYTTPLTFGGGT  
 KLEIKAAATTIPAPRPPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGA  
 VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK  
 QPFMRPVQTTQEEGCSRFPEE  
 EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
 DKRRGRDPE  
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGK  
 GHDGLYQGLS  
 TATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2E

LTG2203: secuencia de ácido nucleico de LP-16P3-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 53)

ATGTTGTTGTCACAAGCCTTCTTCTCTGTGAGCTTCCGCACCCCGCTTCT  
 GCTGATCCCGAGATACAGCTTCAGCAGTCCGGCCCGGTCTGGTAAAGCCGTCC  
 CAAACGCTTCACTCACATGCCCGATCTCTGGTGAATTCTGTGTCACTCAACAGCG  
 CAGCATGGAATTGGATCCGCCAATCACCCAGTAGAGGCTTGGAGTGGTGGGCC  
 GGACTTATTATCGAAGTAAGTGGTACAATGATTATGCAGTCTCAGTTAAATCCAG  
 GATCACTATTAACCCACGATACAAGTAAAACAGTTCTCATTCGAACATTAAATTCC  
 GTAACCTCCGGAGGGACACTGCAGTATATTACTGCCTCAGGAGGTGCAGCCTGAT  
 GATGCTCTGGACATTGGGACAAGGCACGATGGTACCGTTAGTTCCGGGGGG  
 GGAGGTTCTGGCGGAGGTGGTAGTGGGGGGGGCGCAGTGACATCCAGATGACA  
 CAGAGTCCCAGCAGCGTGTGCCTCAGTCGGGATAAGGTAAACAATTACGTGT  
 AGAGCGAGCCAGGACGTTCCGGGTGGCTGGCGTGGTACCAACAAAAACCCGGT  
 CTCGCTCCGCAGTTGTCATCTCTGGACCGATTTACACTACGATTTCCTCTTT  
 CAACCCGAAGATTTGCTACTTACTATTGCCAGCAGGCCAAAAACTTCCCGTACA  
 CGTTGGACAGGGCACAAAGTTGGAAATTAAAGCGGGCGCAACTACCACCCCTG  
 CCCCCTGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCCTAACGCAAGCCAACCCCTCTTGG  
 CCCCAGAAGCTTGGCCGCCGOCGGGGGTGGAGGCCGTGCATAACCCGGGGCTGGA  
 CTTTGCTGCGATATCTACATTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGCGTGTCTC  
 CTGCTGCGTGGTCATCACCCTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTT  
 ACATCTCAAGCAGCCGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACG  
 GATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATCGAACCTGCGCGTCA  
 AGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCAGAACATCAGCTCTA  
 CAACGAGCTGAACCTGGGAAGGGAGAGAGGAGTACGACGTCTGGACAAAGCGAC  
 GCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCAAGGGGGAAAAACCCCTCAGGAA  
 GGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATC  
 QGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAAGGG  
 ACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCAATGCAAGCACTCCCA  
 CCCCCGG

LTG2203: secuencia de aminoácidos de LP-16P3-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 54)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQIQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNS  
 AAQNWIQRSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQPSLQLNSV  
 TPEDTAVYYCAQEYQPDDALDIWQGQTMVTVSSGGGSQGGGSGGGSDIQMTQS  
 PSSVSASVGDKVTTITCRASQDVSGWLAWYQQKPG LAPQLLISGASTLQGEVPSRFSG  
 SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFQGQGTKLEIKAATTPAPRPPTPAP  
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTGGVLLLSLVITLYCKR  
 GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQFEDGCSRFPFEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQQ  
 NQLYNELNLGRREEYDVLDRKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS  
 EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2F

LTG2204: secuencia de ácido nucleico de LP-16P16-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 63)

ATGCTGCTTTGGTAACCTCCCTCTTTGTGCGAGCTGCCCATCCAGCG  
 TTCCCTCTCATCCCTCAAGTACAGTGCAGCAGTCAGGACCTGGCTTGTG  
 AAACCATCCCAAACCTCTCAGCCTCACGTGTGCTATTCTGTTGACTCAGTA  
 AGTAGCAATAGCGCTGCTTGGAACTGGATCAGACAATCTCCCTCCAGGGG  
 TCTCGAATGGCTGGGGCGAACCTATTACCGATCTAAATGGTATAACGATT  
 ATGCAGTATCCGTGAAATCCAGGATTACAATCAACCCAGATACTGTTCAAG  
 AATCAATTCTCTCTCAGCTCAACTCCGTAACTCCAGAGGACACTGCGGTAA  
 TATTATTGCGCCCAAGAAGTCGAGCCACACGATGCCCTCGATATCTGGGG  
 TCAAGGTACCATGGTACAGTTAGTAGTGTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 GGTGGGTCCGGTGGCGGGGGTCAAGACATCAAGATGACCAATCCCCAAG  
 CTCTGTTTCAAGCATCCGTGGCGATAAGGTAAACCAATTACATGCAGAGCGA  
 GTCAGGACGTTCAAGGTGGCTGGCTGGCTGGTACCAAGCAAAAACCGGGACTC  
 GCACCGCAGCTGTTGATTTCGGCCCAAGTACGCTTCAGGGCGAAGTAC  
 GTCCAGGTTCACTGGTCAAGGTTCTGGCACCGATTTCACGCTCACGATATC  
 CAGTCTCCAACCGGAGGATTTCCTACTTATTACTGCCAGCAGGCTAAGTA  
 TTTCCATACACATTGGCCAGGGGACAAAGTTGGAGATCAAAGCGGCCG  
 CAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCA  
 AGCCAACCCCTCTCCCTGCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 AGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGGCTGCAGTATCTACATTGGG  
 CCCCCTGGCCGGCACTTGGCGCTGCTCTGCTGTCGCTGGTACACCC  
 TTACTGCAAGAGGGGCCGAAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCG  
 TTCATGGGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAG  
 ATTCCCTGAGGAAGGAAGAGGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTCTCAC  
 GGTCCGCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAAC  
 GAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGGAGTACGACGTGCTGGACAAAGCGAC  
 GCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCCTCA  
 GGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTAC  
 TCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGAAGGGAAAGGGTACGAC  
 GGGCTGTACCAAGGACTGAGCACCCCACTAAGGATAACCTACGATGCCTT  
 GCATATGCAAGCACTCCCCACCCCGG

LTG2204: secuencia de aminoácidos de LP-16P16-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 64)

MLLVLTSLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTITNPDTFKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPHDALDIWQQGTMTVSSGGGGSGGGGGSGG  
 GGSDIKMTQSPSSVSASVGDKVTTICRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLIF  
 GASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQQT  
 KLEIKAAATTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSC  
 RFPEEEEGGCELRVKESRSADAPAYQQQQNQLYNENLGRREEYDVLDKRR  
 GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRROKGDGL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2G

LTG2205: secuencia de ácido nucleico de LP-16P20-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 73)

ATGCTGCTCCTCGTAACCTCTCTCTCTTGTGAGTTGCCACATCCAGCAT  
 TTCTTCTGATACCTCAAGTCACCTCCAGCAGAGTGGTCCAGGTTGGTAA  
 AACCCAGCCAGACTCTCTCATTGACGTGTGCCATATCAGGTGATTCACTT  
 CCTCTAATAGCGCGGCATGGAATTGGATCAGGCAAAGCCCTAGTCGCGGG  
 CTGGAGTGGCTCGGGCGGACATACTACCGCTCAAAGTGGTACAACGACTA  
 CGCCGTCAGCGTAAAATCTCGGATTACCATTAACCCGGATACTTCCAAAAA  
 ACCAATTCCTCCCTGCAAGCTAACAGTGTACGCCGGAAAGATAACGCCCGT  
 TATTACTGCGCACAAAGAGGGTGGAACCGCACGACGCCCTCGATATCTGGG  
 CCAAGGCACATGGTGACCGTCAGTAGCGGAGGGGGGGTCCGGAGGA  
 GGCGGCTCTGGTGGCGGAGGATCTGATATCCAAATGACCCAATCACCGTC  
 TTCACTATCACTTCTGTTGGTACAAAGTTACGATTACCTGTCAGCGTC  
 ACAGGAACGTTCTGTTGGTTOGCTTGGTATCAGCAAAACCAGGGCTTG  
 CGCTTCAGTTGCTTATTCTGGGACATCTACTTTGCAAGGGAGAGGTGCCCT  
 CCCGGTTCTCCGGCAGTGGGAGCGGCACCGATTITACACTTACCATCTCTT  
 CCTTGCAACCCGAAGACTTTGCGACGTACTATTGCGACCGAACAGTAT  
 TTCCCTACACTTTGGACAAGGGACTAAACTTGAAATCAAGGGGGCGC  
 AACTACCAACCCCTGCCCTCGGCCCGCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAA  
 GCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCCGAACGCTTGCGCCCGGCCGGTGG  
 GCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCGCTGCGATATCTACATTTGGGCC  
 CGCTGGCCGGCACTTGCGGGCTGCTCTGCTGTCGCTGGTACCGACCTT  
 TACTGCAAGAGGGCCGGAAGAACGACTCAAGGAAGAGGGACGGATGCTG  
 CATGCGGCCGACTCGCCCGCATATCAACAGGCGAACATCAAGCTCTACAG  
 TTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACG  
 GTCCCGCGACGCCCGCGATGGGGGGAAACCACCGCGAAAAACCCCTCAG  
 GAAGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCTACT  
 CAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAGGGAAAAGGGTCACGACG  
 GGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCTTG  
 CATATCGAACACTCCCACCCCGG

LTG2206: secuencia de aminoácidos de LP-16P20-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 74)

MLLIVTSLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCaisGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTRYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPHDALDIWGQQTIVSSGGGGSGGGGSG  
 QGSIDIQMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLIF  
 GASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFQGQT  
 KLEKAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAIVTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSC  
 RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQONQLYNELNLGRREYDVLKDRR  
 GRDPEMOGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2H

LTG2206: secuencia de ácido nucelico de LP-16P2-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 83)

ATGCTTCTTTGGTGA CTTCCCTTTGCTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCT  
 TCCGTCTTATTCCCCAAGTCCAGCTCCAACAATCCGGACCCGGACTTGTAA  
 AGCCGTCTCAGACGTTGCACTCACATGCCATCAGTGGCGATAGCGTG  
 TCCAGCAACAGTCCCCATGGAATTGGATACGACAGAGCCCTTCCCGAGG  
 ATTGGAATGGCTGGGACGAACGTACTATAAGTCCAAGTGGTATAACGACT  
 ACGCGGTGTCAGTTAAATCTGGATTACTATAAATCCCGACACTTTAAGA  
 ATCAGTTTCCCTGCACTCAATTCACTCACACCCGAAGAGATA CGCGA C T G  
 TACTATTGGCTCAAGAAGTTGAGCCACATGATGCGCTGGATATTGGGG  
 TCAGGGGACTATGGTGA CGTAAAGCAGTGGGGGGGGGGCAGTGGCGGA  
 GGTGGCAGCGGGGGCGTGGAAAGCGACATTAAGATGACTCAGTCTCCGTC  
 TTCAGTTTCCGCTCGTAGGGGACAAGGTTACAATTACTTGTCCGCACTC  
 TCAGGGATGTCTCAGTTGGCTGGCTGGTATCAACAGAACGCTGGCCTCG  
 CCCCTCA GCTTCTCATATTGGGCTAGTACCCCTGCAAGGAGAAGTCCCC  
 AGCAGGTTTCCGGTTAGGGTCCGGACAGACTTACCTTGACCATCAG  
 CTCCCTGCAACCGGAGGACTTCGGACCTACTATGTCAACAGGCGAAGT  
 ACTTCCCCTACACGTTGGCAAGGGACTAACGCTCGAAATCAAGGGCGCC  
 GCAACTACCACCCCTGCCCTCGGGCGCCACTCCGGCCCCAACCATCGC  
 AAGCCAACCCCTCTCTTGC GCGCCCGAAGCTTGC CGCCGCGGGCGGGTG  
 GAGCGTGACATACCGGGGGCTGACTTTGCTGCGATATCTACATTGG  
 GCGCGCTGGCGGCACTTGGGGGTGCTCTGCTGTGCGTGGTATCACC  
 CTTTACTGCAAGAGGGCCCGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCC  
 GTTCATGCGGCCGTGCAAGACGACTCAGGAAGAGGACOGATGCTCGTGCA  
 GATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAAGCTGCGCGTCAAGTTCTCA  
 CGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCAGAATCAAGCTCTACAA  
 CGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGA  
 CGCGGACCGGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCCTC  
 AGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTA  
 CTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGAAAGGGTACCGAC  
 GGGCTGTACCAGGGACTGAGCACC GCCACTAAGGATACTACGATGCGTT  
 GCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

LTG2206: secuencia de aminoacidos de LP-16P2-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 84)

MLLVTSLLLCELPHPAFLLIIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEYWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRSITINPDFTKNQFSL  
 QLSVTIPEDTAVYYCAQEVEPHDALDIWGQGTMTVSSGGGSGGGGGGG  
 GGSDIKMTQSPSSVSASVGDKVTTCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLIF  
 GASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGT  
 KLEKAAATTTPAPRPPPTAPIIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSC  
 RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQONQLYNELNLGRREEYDVLDKRR  
 GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKQHDCL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2I

LTG2207: secuencia de ácido nucleico de LP-16P6-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 93)

ATGCTTCTTTGGTGA CTTCCCTTTGCTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCT  
 TCC TGCTTATTCCCCAAGTACAAC TCCAGCAATCAGGGCTTGGCTTGCA  
 AGCCGAGTCAAACCTTGAGTTGACGTGTGCCATCAGCGGTGACTCTGTC  
 AGTTCAAACCTCCGCAGCTTGGAACTGGATTCGGCAGTCCCCCTCCAGGGG  
 CCTCGAATGGCTTGGACCGACGTACTACAGATCAAATGGTACAACGACT  
 ACGCAGTCAGTGTAAAATCAAGGATTACCGATAAACCCCTGATAACGGAGTAAA  
 AACCAAGTTCTCTCCA ACTGAA CAGCGTCA CACCCGAAGA GATA CAGCGT  
 GTATTACTGTGTCAGGAAGTGCAACCTGACGACCGATTTGACATCTGGG  
 GTCAGGGCACGATGATCACCGTGAGTAGTGGAGGGAGGCAGTGGGGG  
 AGGC GGTTCTGGCGGGGGTGGGTCTGATATA CAGATGACACAGAGTCCCT  
 CCTCAGTTCCGCCCTGTGGAGATAAGGTGACAATTACATGCAGGGCG  
 TCCCAAGATGTTCTGGATGGCTCQCATGGTACCAACAGAACGCCAGGACT  
 CGCC CCTCAGCTCCTCATTAGCGGGCTAGCACTCTCCAAGGGGGAGTAC  
 CGAGCAGGTCTCTGGGTCCGGAAAGTGGACGGACTTACCC TGACAATA  
 TCCCTCCCTCAGCCAGAAGACTTCQCAACCTACTATTGCCAACAGGCGAA  
 AAATTTC C CTTACACGTTGCCAAGGA ACTAAACTTGAAATCAAGGCG  
 CCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGGCGACTCCGGCCCCAACCATC  
 GCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCGAAGCTTGGCCCGGGCGCG  
 TGGAGCCGTGCATAACCCGGGGGCTGGACTTTGCCCTGCGATATCTACATTG  
 GGC CCGCTGGCCGGCACTTGGCGCTGCTCTGCTGTGCGCTGGTCATCAC  
 CCTTACTGCAAGAGGGGCCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGC  
 CGTTCATGCGGCCGTGCAAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
 AGATTCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGTCAAGTCTC  
 ACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAAGCTCTACA  
 ACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG  
 ACGCGACCGCACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCT  
 CAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCT  
 ACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGAGGAGGGAAAAGGGTCACG  
 ACGGGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATAACCTACGATGCC  
 TTGCAATATGCAAGCAACTCCCACCCCGG

LTG2207: secuencia de aminoácidos de LP-16P6-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 94)

MLLVTSLLCELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRIITNPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEYQPDFAFDIWGQGTMITVSSGGGGSGGGGGGG  
 GS DIQMTQSPSSVSAVGDKVTTCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLISG  
 ASTLQGGVPSRFSGSQGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFGQGT  
 LEIKAAATTPAPRPPPTAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQFFMRPVQTTQEEEDGCSRF  
 PEEE EGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREYDVL DKKRRGR  
 DPEMOGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRGK GHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALIHMQALPPR

## FIGURA 2J

LTG2208: secuencia de ácido nucleico de LP-16P10-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 103)

ATGCTTCTTTGGTACTTCCCTTTGCTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCT  
 TCCCTGCTTATCCCCAAGTGCAGTGCAACAGTCTGGACCAGGCCTCGTAA  
 AACCTTCTCAAACCTTGTCACTCACTTGOCCTCTCAGGGGACAGTGTCA  
 GTTCCAACAGTGCAGGCATGGAATTGGATTAGGCAATCCCCCTCGAGGT  
 CTGGAATGGCTTGGCGGGACTTACTACCGAAGTAAGTGGTACAACGATTA  
 TGCAGTTCTGTAAAATCAGGAATCACTATAAATCCGGACACTTCTAAGA  
 ATCAAGTTCTCTTGCAGCTTAACCTGTACTCCTGAAGACACAGCCGTAT  
 ATTACTGTGCTCAAGAGGTAGAGCCCAAGATGCCCTCGACATCTGGGC  
 CAAGGGACTATGGTACAGTAAGCTCCGGAGGTGGGGATCAGGGGGAG  
 GTGGGTCCGGTGGTGGTGGCTCTGACATACAGATGACACAGTCCCTAGC  
 TCTGTGTCAGCAAGTGTGGTGACAAGGTTACGATAACGTGCAGGGCCAG  
 TCAAGATGTGTCAGGATGGTGGCGTGGTACCAACAGAAACCCGGCTTGG  
 CACCGCAGCTTGTATATTCCGCCTCCACACTCCAAGGCGAAGTGCCTT  
 CTCGGTTCTGGAAGCGGCAGCGGGACGGACTTACTTGTACAATATCCT  
 CCCTCCAACCCGAGGATTTCGCGACGTATTATTGCCAGCAAGCAAATAC  
 TTCCCATAACACCTTCGGGCCTGGGACCAAACCTGGAGATCAAAGCGCCGC  
 AACTACCACCCCTGCCCTGGGCCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAA  
 GCGAACCCCTCTCCTGGCCCGGGAAAGCTTGGCCCGGGGGGGGGGGGG  
 GCGGTGCATAACCGGGGGCTGGACTTGCCTGCATATCTACATTGGGCC  
 CCGCTGGCCGGCACTTGCCTGCCTGCTGTCGTGGTCAAGTCTCAGG  
 TACTGCAAGAGGGGGGGAAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAAGCGTT  
 CATGGGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGGACGGATGCTCGTGCAGA  
 TTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGGTCAAGTCTCAGG  
 GTCCCGCGAAGGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAAGCTCTACAACG  
 AGCTGAACCTGGGAAGGGAGAGGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACG  
 CGACCGGACCCCGAGATGGGGGGAAACCGCGGGAAAAACCCCTCAG  
 GAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACT  
 CAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGGAGGGAAAGGGTCACGACG  
 GGCTGTACCAAGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCCCTG  
 CATATGCAAGCACTCCACCCCGG

LTG2208: secuencia de aminoácidos de LP-16P10-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 104)

MLLLVTSLLCELPHAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCaisGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPQDAFDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGGGGG  
 GSDIQMTQSPSSVSASVGDKVTTCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAQQLIIFG  
 ASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQOAKYFPYTFGPGTKL  
 EIKAAATTTPAPRPPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
 PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNLQYNENLNGRREYDVLDRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2K

## LTG2209: secuencia de ácido nucleico de LP-16P17-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 113)

ATGCTTCTTTGGTACTTCCCTTTGCTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCCT  
 TCCTGCTTATTCCCCAGGTACAGCTCAACAGAGTGGGCCGGGACTGGTG  
 AAACACTCCAAACACTTCTCTGACGTGGCTATATCAGGTGACTCTGTT  
 TCATCTAATTCTGCTGCGTGGAACTGGATTGACAATCTCCAGTCGCCGG  
 TTGGAATGGCTGGAGAACATATTATCGGTCTAAGTGGTATAACGATTA  
 TGCTGTATCTGTTAAATCTGAATTACGATTAATCCTGACACACTCCAAGAA  
 CCAGTCTCCCTCCAGTGAACACTCACACCCGAAGACACTGCCGGTCT  
 ACTATTGCGCTCAAGAACGACTCGAGCCACATGATGCCATTGACATCTGGGGC  
 CAGGGAACGATGGTCAACCGTCAGCAGTGGCGGCGGGATCTGGGGTG  
 GCGGTTCTGGCGGTGGAGGATCAGACATAAAATGACGCAGAGTCCCTCA  
 AGTGTGTACCGCAGTGTGGGGATAAGGTAACATTACGTGCAGAGCGTC  
 ACAGGATGTTAGTGGATGCGCTTGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCCTG  
 CTCCACAGCTCCTTATCAGTGGTCTACACTCACGGCGAGGTTCCGA  
 GTAGATTCTCTGGTCTGGATCTGGTACTGACTTCACCTTACAATTCTTC  
 TTGCAACCAGAACGACTTGCAGACTTAACTGCCAACAGGCCAAATACTT  
 CCCTTATACATTGGCCAAGGTACCAAGTGGAGATAAAGGGGGCCGCAA  
 CTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCGACTCCGGCCCAACCATCGCAAGC  
 CAACCCCTCTCCTTGCCTCGAACGCTTGCCTGCGATACTACATTGGGCCCC  
 GCTGGCCGGCACTTGGGGCGTGGACTTGCCTGCGATACTACATTGGGCCCC  
 CTGCAAGAGGGGGCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTTCA  
 TGCAGGCCGCTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATT  
 CCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTCGCCGTCAGTCTCACGGT  
 CGGCCGACCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAACATCAGCTCTAACACGAG  
 CTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACGCTGGACAGCG  
 GACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGGGAAAAACCCCTCAGGA  
 AGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGGGGAAGCCTACTCA  
 GAAATCGGGATGAAAGGAGAGCGAGGGGGAAAGGGTCACGACGGG  
 CTGTACCAAGGACTGAGCACCGCCACTAACGGATACTACGATGCCCTGCA  
 TATGCAAGCACTCCCACCCCGG

## LTG2209: secuencia de aminoácidos de LP-16P17-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 114)

MLLVTSLLCELPHPAFLIIPQVQLQQSGPGLVKHSQTLSLTCAlSGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRTITNPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPHDAFDIWGQQGTMVTVSSGGGGGGGGGGGG  
 QSDIQMTQSPSSVYASVGDKVTTCRASQDVSGWLAWYQOKPGLAPQLLISG  
 ASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQQGTL  
 EIKAAATTTPAPRPPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
 PEEEEEGLRVRKFSSRSADAPAYQQQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKQHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2L

LTG2210: secuencia de ácido nucleico de LP-16P20v2-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 123)

ATGCTTCTTTGGTGAATTCCCTTTGCTGTOCGAGTTGCCACACCCCGCT  
 TCTGCTTATTCCTTAAAGTACAACCTCAACAGTCTGGGCTGGGCTTGTAA  
 AACCTAGCCAAACTCTGCTCCACGTGCGGATTTCAAGGGACAGTGTAA  
 AGTTCCAACCTAGCCCATGGAACGGATCAGGCAGTCACCTCAAGGGG  
 GCTCGAATGGCTTGGCGAACGTACTACAGGAGTAAGTGGTACAACGATT  
 ATGCAGTGTCTGTGAAATCACGGATTACTATCAATCCCACACGTCCAAG  
 AACCAAGTTCTCTGCAACTCAACTCAAGTACGACACCAGAGGATACGGCGT  
 TTACTATTGTGACAGGAAGTCAACCTGATGATGATGCCCTTGACATTGGGG  
 TCAGGGCACGATGGTACGGTAAGCTCTGGGGAGGCCAGTGGAGGG  
 GGAGGTAGTGGGGAGGGGATCTGATATAACAGATGACACAAAGCCCCT  
 CATCCGTCACTGCTTCAGTGGTGTAAAGTAACCATTACGTGCCCGCTT  
 CCCAAGACGTTAGCGATGGTGGCTTGTATCAACAAAAACCGGGGTTG  
 GCTCCGCAACTCCTCATATCCGGTGCAGTACGCTCCAAGGCGAAGTCCC  
 TAGCAGATTTCGGGAGCGGTTCCGGTACAGATTACGTTGACCAATTAG  
 CTCTCTCCAGCCCCAAGATTTGCAACCTACTATTGCAACACGGCCAAAA  
 ATTTCCATATACATTGGTCAAGGCACAAAGCTCGAAATCAAAGGGCC  
 GCAACTACCAACCCCTGCCCTCGCCCGCGACTCCGGCCCCAACCATCGC  
 AAGCCAACCCCTCTCCTTGCAGGGCGAGCTGGTACCTTGCTGCGATATCTACATTGG  
 GCCCCGCTGGCCCGOCACCTGGCGCGCTGGACTTTGCTGCGATATCTACATTGG  
 CTTCCTGAGGAAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCTGCGCTGGTACCC  
 CGGTCCGCCACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAAGCTCTACAA  
 CGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAGCGA  
 CGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCAACGGCGGAAAAACCCCTC  
 AGGAAGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTA  
 CTCAGAAATCGGAGTGAAGGGAGAGCGGAGGGAGGGAAAGGGTACCGAC  
 GGGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCCT  
 GCATATGCAAGCACTCCACCCCGG

LTG2210: secuencia de aminoácidos de LP-16P20v2-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 124)

MLLVTSLLCLELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVQPDDAEDIWQQGTMVTVSSGGGSGGGSOG  
 GGSDIQMTQSPSSVSASVGDKVTTCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAQQLLIS  
 GASTLQGEVPSRFSGSQSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAKNFPYTFGQGT  
 KLEIKAAATTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRQLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYKRGRIKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSC  
 RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELNLGRREYDVLKD  
 GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA  
 YSEIGMKGERRGKGHDGL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQLPPR

## FIGURA 2M

LTG2216: secuencia de ácido nucleico de LP-16P1-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 133)

ATGTTGCTGCTCGTACCTCGCTCTTCTGTGCGAGCTCCCCATCCGGCT  
 TTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGTCTGGACTGGTC  
 AAGCCGTCCCAGACTCTGAGCCTGACTTGCATATTAGCAGGGACTCAGT  
 CTCGTCCTAACATTGGCGGGCTGGAACCTGGATCCGGCAGTCACCATCAAGGG  
 GCCTGGAATGGCTCGGGCGCACTTACTACCCGTCCTAAATGGTATAACGAC  
 TACGCCGTGTCGTGAAGTCCGGATCACCATTAAACCCGACACCTCGAA  
 GAACCAGITCTCACTCCAACCTGAACAGCGTGCACCCCGAGGGATACCGCGG  
 TGTACTACTGCGCACAAAGAAATCGAACCGCACGACGCCCTCGACATTGG  
 GACCAGGGAACGATGGTACAGTGTGTCGGTGGAGGAGGTCCGGAG  
 GCGGTGGATCTGGAGGGCGGAGGTTGGTGTGATCCAGATGACCCAGAGCCCC  
 TCTCGGTGTCGCATCCGTGGCGATAAGTCACCATTAACCTGTAGAGC  
 GTCCCAGGACGTGTCGGATGGCTGCCCTGGTACCCAGCAGAACCCAGGGCT  
 TGGCTCCTCAACTGCTGATCTCGGGGCCAGCTCACTTCAGGGGGGGGTG  
 CCATCACGCTCTCCGGATCCGGTCCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATC  
 AGCAGCCTCAGCCTGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAACAGGCCAA  
 GTACTTCCCCTACCTTCGGACAAAGGCACTAAGCTGGAAATCAAGGCG  
 CCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCCAACCATC  
 GCAAGCCAACCCCTCTCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCCGGGCGGG  
 TGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCTGCGATATCTACATTG  
 GGCCCCCTGGCGGCACCTTGCGGGCTCTCTGCTGTCGCTGGTATC  
 CCTTACTGCAAGAGGGCCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGC  
 CGTTCATCGGGCGCGTGCAGACGCACTCAAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
 AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCAAGTCTC  
 ACGGTCCGCGACGCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAAGCTCTACA  
 ACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACGTCGCTGGACAAGCG  
 ACGCGGACCGCACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGGGAAAAACCC  
 CAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCT  
 ACTCAAGAAATGGGGATGAAAGGGAGAGCGGAGGGAGGGAAAGGGTCACG  
 ACGGGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATAACCTACGATGCC  
 TTGCAATGCAAGCACTCCACCCCCCG

LTG2216: secuencia de aminoácidos de LP-16P1-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 134)

MLLVTSLLCELPHPAFLLIPOVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCDISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEIEPHDAFDIWDQGTMVTVSSQGGSGGGSGGG  
 GSIVIQTQSPSSVSASVGDKVTTICRASQDVSGWLAWYQQKPGLAQQLLISG  
 ASSLQGGVPSRFSGSGSQDFLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTK  
 LEIKAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRF  
 PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNLQYNENLIGRREYDVLDKRRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKERRRGKGHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2N

LTG2217: secuencia de ácido nucleico de LP-16P3v2-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 143)

ATGTTGCTGCTCGTACCTCGCTCTCTGTGCGAGCTGCCCATCCGGCT  
 TTTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGTCTGGACTGGTC  
 AAGCACTCCCAGACTCTGAGCCTGGCTGCQCGATTAGGGGGACTCACT  
 CTCGTCCTAACCTCGGCGGCTGGAACCTGGATCCGGCAGTCACCATCAAGGG  
 GCCTGGAATGCTCGGGCGCACTTAACCTACCGGTCCAAATGGTATAACGAC  
 TACGCCGTGTCGGTGAAGTCCGGATCACCATTAACCCCCACACCTCGAA  
 GAACCAAGTTCTCACTCCAACCTGAACACAGCGTACCCCCGGAGGATAACCGGG  
 TGTACTACTGGCGACAAGAAGTGCACAGTGTGTCGGAGGAGGAGGTTCCGGAG  
 GCGGTGGATCTGGAGGCGGAGGTTGGATATCCAGATGACCGAACAGACCCCC  
 TCCCTCGTGTCCGCATCCGTGGCGATAAGGTATTACCTGTAGAGCG  
 TCCCAGGACGTGTCGGATGGCTGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGCTT  
 GGCTCCCTCAACTGCTGATCTCGGCGCCAGCACTCTCAGGGGGAAAGTGC  
 CATCACGCTTCTCCGGATCCGGTTCGGGACCCACTCACCCCTAACCATCA  
 GCAGCCTCCAGCCTGAGGACTTCGCCACTTAACCTGCAACAGGCCAAG  
 TACTTCCCTATAACCTCGGACAAGGCACTAACGCTGGAAATCAAAGCGGC  
 CGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGACTCCGGCCCCAACCATCG  
 CAAGCCAACCCCTCTTGCGCCCGAAGCTGCCGCCGGCGGGGT  
 GGAGCCGTGCATACCCCGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTG  
 GGCCCCGCTGCCCGGACTTGCCTGCGTCTGTCCTGGATCATCAC  
 CCTTACTGCAAGAGGGGCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGC  
 CGTTCATGCCGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
 AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTC  
 ACGGTCCGCCGACCCCCCCCACATATCAACACAGGCCAGAACATCAGCTCTACA  
 ACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAAGCG  
 ACGCGGACGCCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAAACCCCT  
 CAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAAGATGGCGGAAGCCT  
 ACTCAAGAAATCGGATGAAAGGAGAGCGGAGGAAGGGAAAGGGTACG  
 ACGGGCTGTACCAAGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATAACCTACGATGCC  
 TTGCATATGCAAGCACTCCACCCCGG

LTG2217: secuencia de aminoácidos de LP-16P3v2-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 144)

MLLVTSLLCLELPHPAFLIPQVOLQSGPGLVKHSQTLSLACAIISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVQPQDALDIWQGQGTMVIVSSGGGSGGGGSGG  
 GGSDIQMTQSPSFVSAVGDKVIICTRASQDVSGWLAWYQQKPGGLAPQLLISG  
 ASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGTKL  
 EIKAAATTTPAPRPPPTPAFTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRF  
 PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQGQNLQYNELNLGRREYDVLDRGR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQLPPR

## FIGURA 20

LTG2218: secuencia de ácido nucleico de LP-16P8-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 153)

ATGTTGCTGCTCGTACCTCGCTCCCTCTGTGCGAGCTGCCCATCCGGCT  
 TTTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTCGGTCTGGACTGGTC  
 AAGCCGTCCCAGACTCTGAGCCTGACTTGCAGCAATTAGCCGGGACTCAGT  
 CTCGTCCAATTGCGCCGGCTGGAAGTGGATCCGGCAGTCACCATCAAGGG  
 GCCTGGAATGGCTCGGGCCACTTACTACCGGTCCAATGGTATACCGAC  
 TACGCCGTGTCGGTGAAGAATCGGATCACCATTACCCCGACACCTCGAA  
 GAACCAGTTCTCACTCCAATGAAACAGCGTGAACCCCCGAGGATAACGGCG  
 TGTACTACTGCGCACAAGAAGTGGAAACCGCAGGACGCCCTCGACATTGG  
 GGACAGGGAACGATGGTACAGTGTGTCGGTGGAGGAGGTTCCGGAG  
 GCGGTGGATCTGGAGGGCGGAGGTTCCGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCC  
 TCCCTGGTGTCCGCATCCGTGGCGATAAGGTACCCATTACCTGTAGAGC  
 GTCCCAGGACGTGTCGGATGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAACGCCAGGCT  
 TGGCTCTCAACTGCTGATCTTCCGGCCAGCACTCTCAGGGGGAAAGTG  
 CCATCACGCTTCTCCGGATCCGGTCCGGACCAGACTCACCCCTGACCATC  
 AGCAGCCCTCAGGACTTCCCACTTACTACTGCCAACAGGCCAA  
 GTACTTCCCTATACTTCCGGAAAGAAGGCACTAAGCTGGAAATCAAGGCG  
 CCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGACTCCGGCCCCAACCATC  
 GCAAGCCAACCCCTCTCTTCCGGCCCCGAAGCTGCCGCCGGCGGG  
 TGGAGCCGTGATACCCGGGGCTGGACTTTGCTGCGATATCTACATTG  
 GGCCCCGCTGGCCGGACTTGGGGGTGCTCTGCTGTGGTCACTC  
 CCTTACTGCAAGAGGGGCCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGC  
 CGTTCATGCCGCCCCGTGCAAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
 AGATTCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTC  
 ACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGCCAGAACATCAGCTCTACA  
 ACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG  
 ACGCCGACGGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCT  
 CAGGAAGGACTGTACAACGAACTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGGCT  
 ACTCAGAAATCGGGATGAAAGGGAGAGCGGGAGGAGGGAAAGGGTCACG  
 ACGGGCTGTACCAAGGACTGAGCACCCCACTAAGGATAACCTACGATGCC  
 TTGCAATGCAAGCACTCCCACCCCGG

LTG2218: secuencia de aminoácidos de LP-16P8-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 154)

MLLLVTSLLCELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYTDYAVSVKNRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPQDAFDIWGQQGTMVTVSSGGGGGGGGGG  
 GSDIQMTQSPSSVSASVQDKVTITCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAQQLLIFG  
 ASTLQGEVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDEATYYCQQAKYFPYTFGRGTKL  
 EIKAAATTIPAPRPPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRF  
 PEEEEEQCELRVKFSRSADAPAYQQQNLQYNENLGRREYDVLDRRQR  
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKHDGLYQ  
 GLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2P

LTG2219: secuencia de ácido nucleico de LP-16P13-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 163)

ATGTTGCTGCTCGTACCTCGCTCCTTCTGTGCGAGCTGCCCATCCGGCT  
TTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCTGGACTGGTC  
AAGCCGTCCCAGACTCTGAGCCTGACTTGCGCCATTAGCGGGAACTCAGT  
CTCGTCCAATTCCGGCGGCTGGAACTTGGATCCGGCAGTCACCATCAAGGG  
GCCTGGAATGGCTGGCGCAGTACTACCCGGTCAAATGGTATAACGAC  
TACGCCGTGTCCTGAAAGTCCCGATCACCATTACCCCGACACCTCGAA  
GAACCAGTTCACTCCAACCTGAACACAGCGACCCCGAGGGATACCGCGG  
TGTACTACTGCGACAAGAAGTGGAACCGCAGGACGCCCTCGACATTGG  
GGACACAGGAACCGATGGTACAGTGTGTCGGTGGAGGAGGTTCCGGAG  
GCCGGTGGATCTGGAGGCCGGAGGTCCGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCC  
TCCTCGGTGTCGCGATCCGTGGCGATAAGGTACCACTTACCTGTAGAGC  
GTCCCAGGACGTGTCGGATGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAACCCAGGCT  
TGGCTCTCAACTGCTGATCTTGGGCCAGCACTCTCAGGGGGAGGTGC  
CATCACGCTTCTCCGGAGGTGGTCCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCA  
GCAAGCTCCAGCCTGAAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAACAGGCAAG  
TACTTCCCTATACCTCGGACAAGGCACTAAGCTGAAATCAAGGCGGC  
CGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGGCGCCACTCCGGCCCCAACCATCG  
CAAGCCAACCCCTCTTGCGCCCGGAAGCTTGCCTGGCCCGCGCGGT  
GGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCCTCGATATCTACATTG  
GGCCCCCGTGGCCGGCACTTGCCTGGTGCCTGTGCGTGGTACCGAC  
CCTTACTGCAAGAGGGGGCGGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGC  
CGTTCATGCCGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGGACGGATGTCGTGC  
AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCAAGTTCTC  
ACGGTCCGCCGACCCCCCGCATATCAACAGGCCAGAACAGCTCTACA  
ACGAAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG  
ACGCCGACCCGACCCCGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAAACCCCT  
CAGGAAGGACTGTACAACCGAACTCCAGAAAGACAAGATGCGGAAAGCCT  
ACTCAAGAAATCGGATGAAAGGGAGAGCGGAGGGGGAAAGGGTACG  
ACGGGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCC  
TTGCATATGCAAGCACTCCACCCACCCCGG

LTG2219: secuencia de aminoácidos de LP-16P13-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 164)

MLLIVTSLLLCELPHPAFLLIPIQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGN SVSSN  
SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSK WYNDYAVSVKSRTIINPDTSKNQFSL  
QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPQDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGGGG  
GSDIQMTQSPSSVSASVGDKVITTCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAQQLLIFG  
ASTLQGEVPSRFSQGGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFQQGK  
LEIKAAATTTPAPRPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYI  
WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF  
PEEEEGOCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGR  
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ  
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2Q

LTG2220: secuencia de ácido nucleico de LP-16P15-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 173)

ATGTTGCTGCTCGTACCTCGCTCCTCTGTGCGAGCTGCCCATCCGGCT  
 TTTCTGCTCATCCCTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGTCTGGACTGGTC  
 AAGCCGTCCCAGACTCTGAGCCTGACTTGCAGGATTAAGCAGGGACTCAGT  
 CTCGTCCAATTGGGGGGCTGGAACTGGATCCGGCAGTCACCATCAAGGG  
 GCCTGGAAATGGCTGGGGCGACTTACTACCCGGTCCAAATGGTATAACGAC  
 TACGCCGTGTCCTGAAAGTCCGGATCACCATTAACCCCCGACACCTCGAA  
 GAACCAGTTCTCACTCCAACCTGAACACAGCGTGAACCCCCGAGGATACCGCGG  
 TGTACTACTGCCACAAAGAAGTGGAAACCGCACGACGCCCTGGACATTGG  
 GGTCAAGGGAACGATGGTACAGTGTGTCGGTGGAGGAGGTCCGGAG  
 GCGGTGGATCTGGAGGGCGAGGGTCCGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCC  
 TCCCTGGTGTCCGCATCCGTGGCGATAAGGTACCATTAACCTGTAGAGC  
 GTCCCAGGACGTGTCGGATGGCTGGCTGGCTGGTACCAAGCAGAACCCAGGGCT  
 TGGCTCCTCAACTGCTGATCTCGGGGCCAGCACACTTCAGGGGGAGGTG  
 CCATCACGGCTCTCCGGATCCGGTCCGGCACCGACTTCACCCGTGACCATC  
 AGCAGCCTCAGCCTGAGGACTTCGCCACTTACTACTTOCCAACAGGCCAA  
 GTACTTCCCCTATACCTTCGGACAAAGGACTAAGCTGGAAATCAAGGGGG  
 CCGCAACTACCACCCCTGCCCTGGCCCGACTCCGGCCCCAACCATC  
 GCAAGCCAACCOCTCTCCTTGGGCCCGAAGCTTGGCGGCCGGCGCGCG  
 TGGAGCCGTGATACCCGGGGCTGGACTTTGCTGCGATATCTACATTG  
 GGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCCTGGCTGCTGCTGCTGGTCACTAC  
 CCTTACTGCAAGAGGGGGCGGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGC  
 CGTTCATGCCGCCGTGCAAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGC  
 AGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCAAGTCTC  
 ACGGTCCGCCGACCCCCCGCATATCAACACGGCCAGAATCAAGCTCTACA  
 ACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAAGCG  
 ACGCCGGACGGGACCCGGAGATGGGGGGAAACCAACGGGGAAAAACCCCT  
 CAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGGCT  
 ACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAGGGAAAGGGTCACG  
 ACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATAACCTACGGATGCC  
 TTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCCGG

LTG2220: secuencia de aminoácidos de LP-16P15-CD8 TM-41BB-CD3zeta (SEQ ID NO: 174)

MLLVTSLLCLELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSN  
 SAAWNWIRQSPSRGLEWLGRRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL  
 QLNSVTPEDTAVYYCAQEVEPHDALDIWGQQTMTVSSGGGGSGGGQSGG  
 GGSDIQMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQDVSGWLAWYQQKPGLAPQLLIF  
 GASTLQGEVPSRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAKYFPYTFGQGT  
 KLEIKAAATTTPAPRPPTPAPIIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSC  
 RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELNLGRREEYDVLKDRR  
 GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGL  
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

## FIGURA 2R

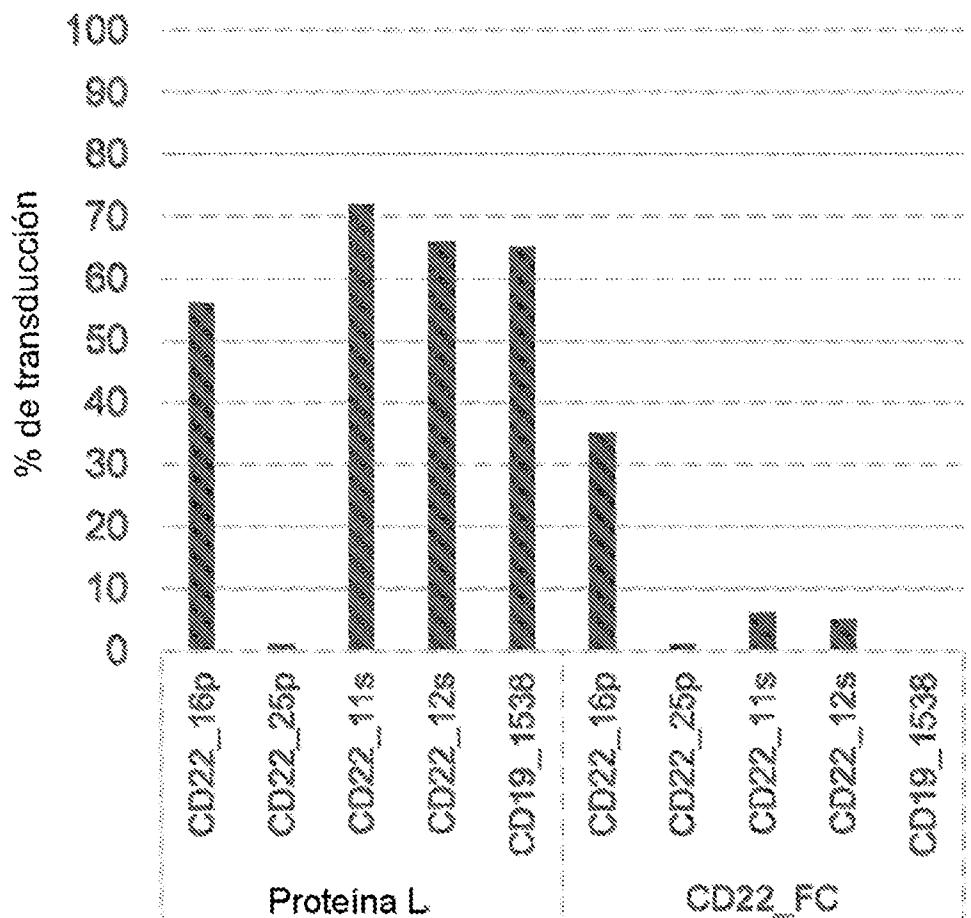


FIGURA 3

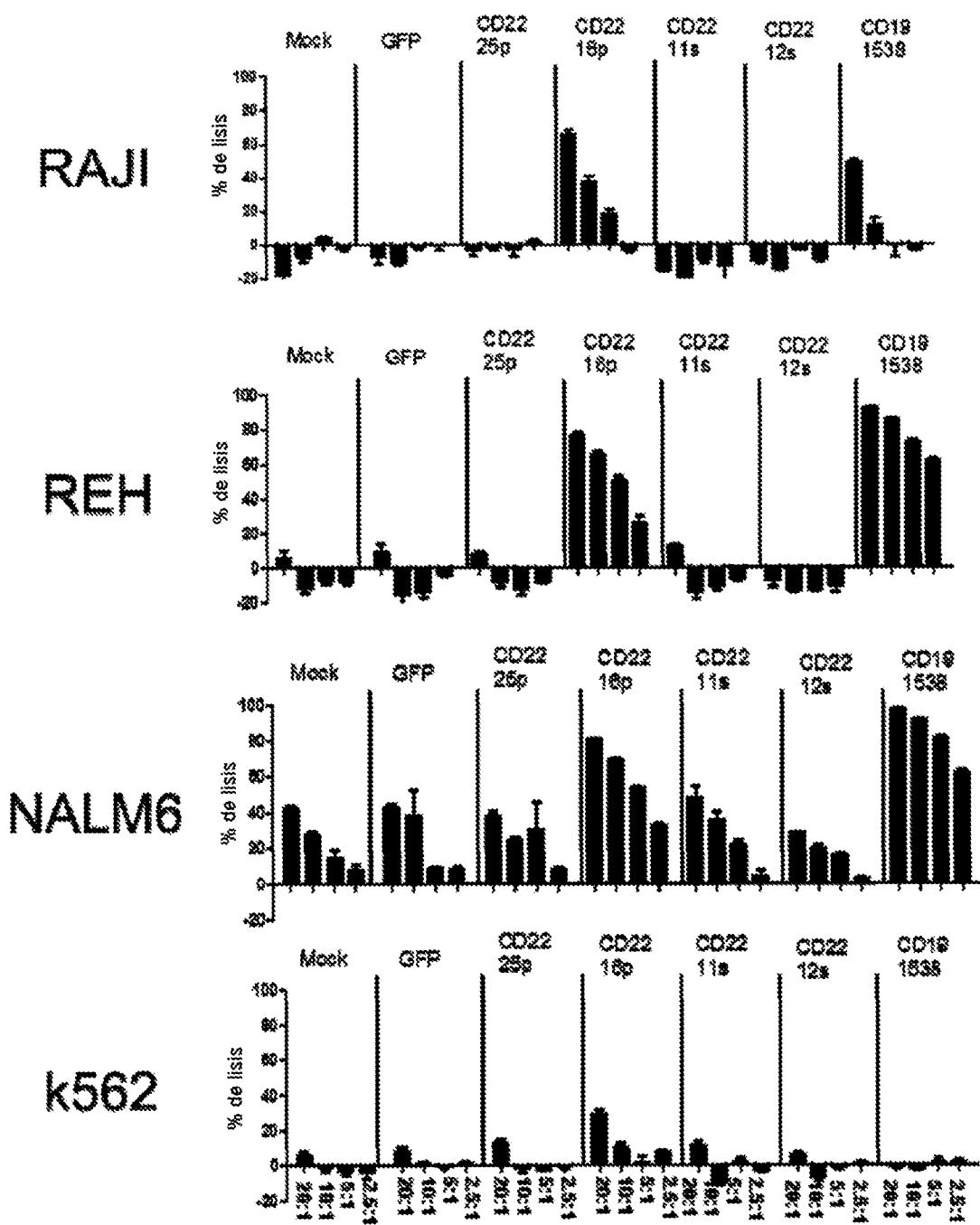


FIGURA 4

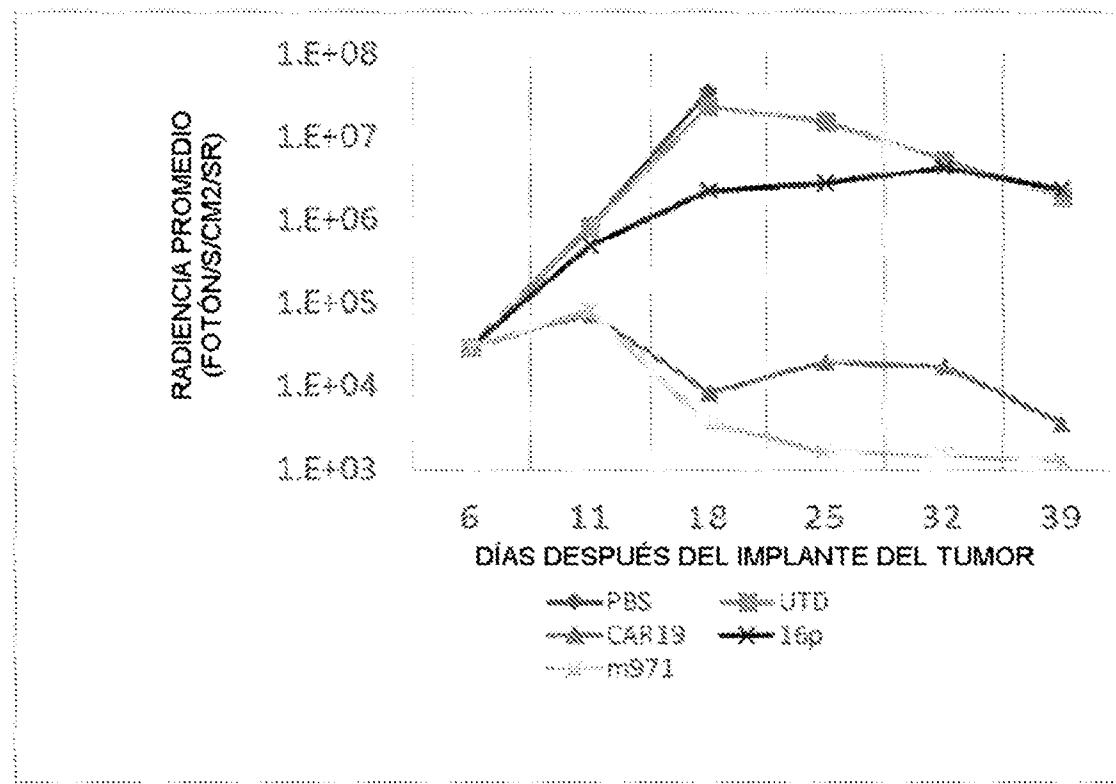


Figura 5

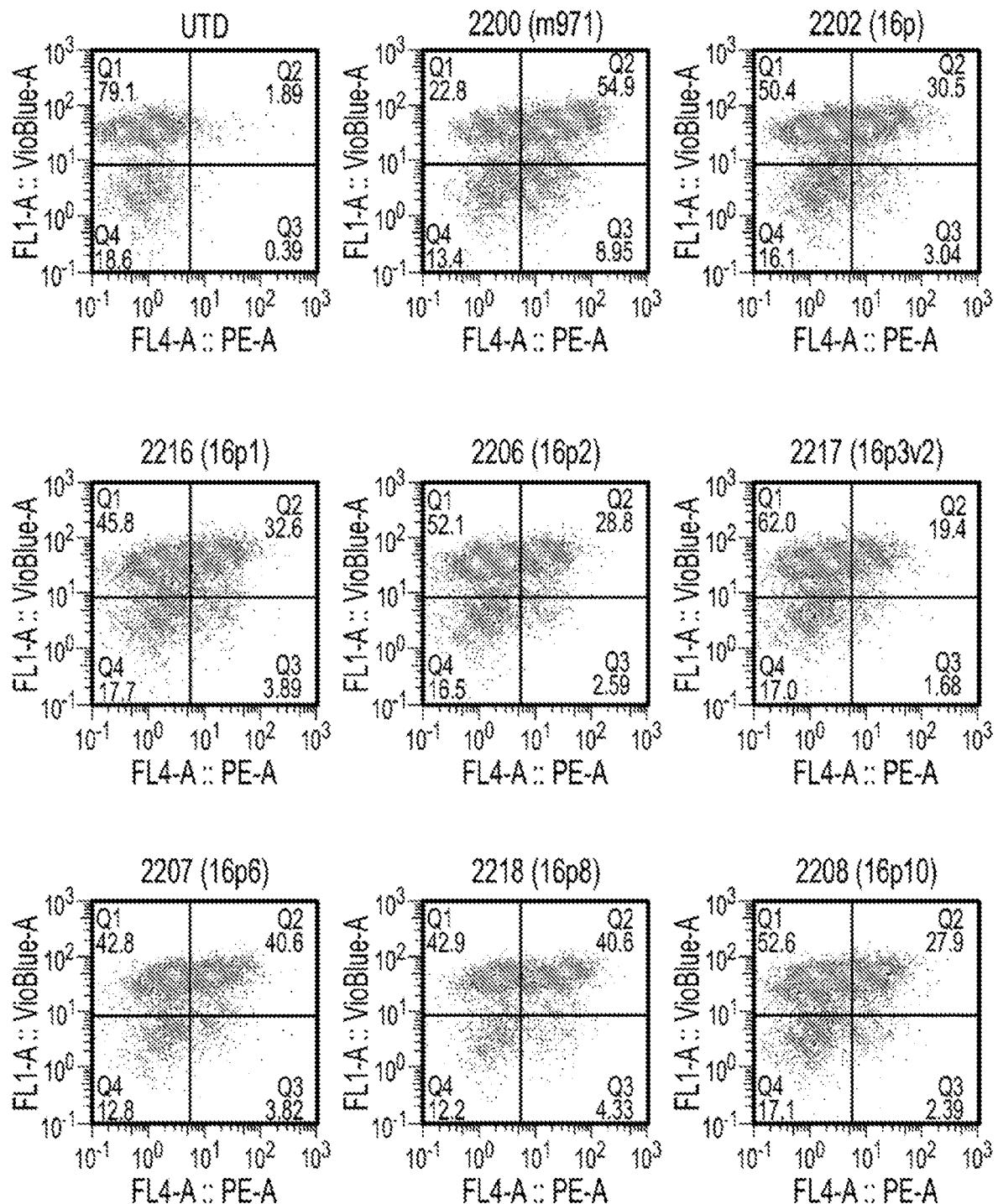


FIGURA 6

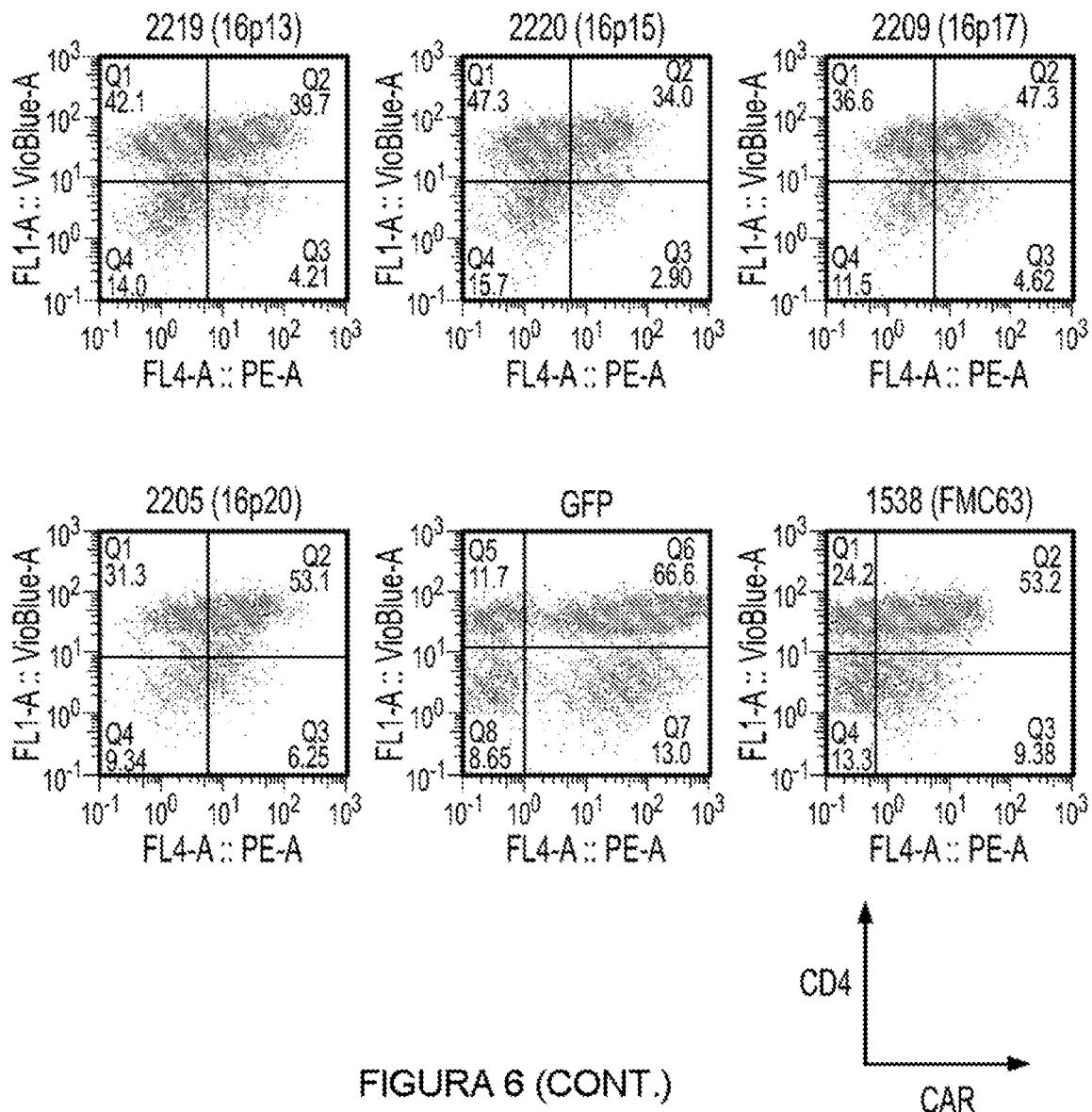


FIGURA 6 (CONT.)

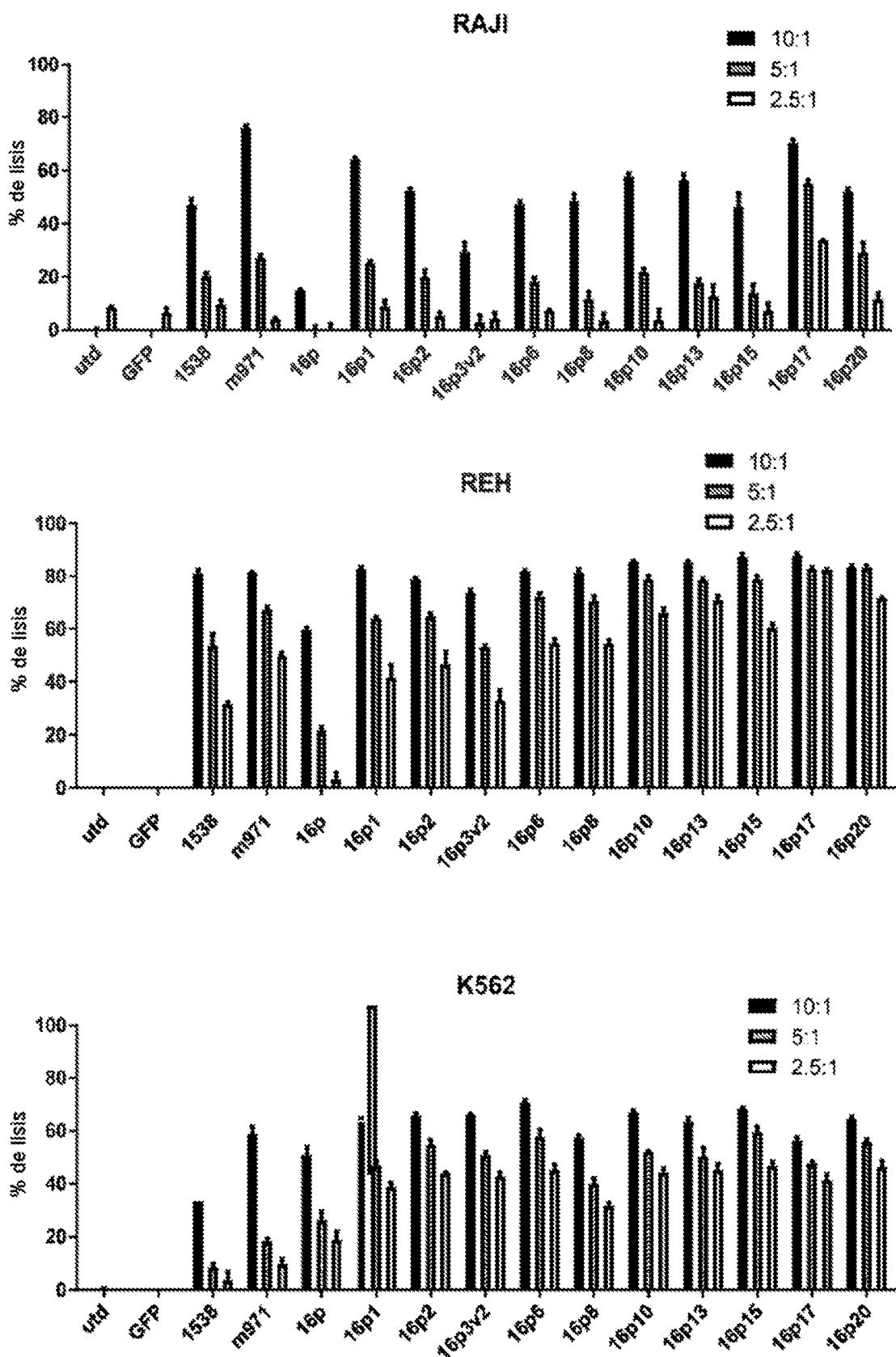


FIGURA 7A

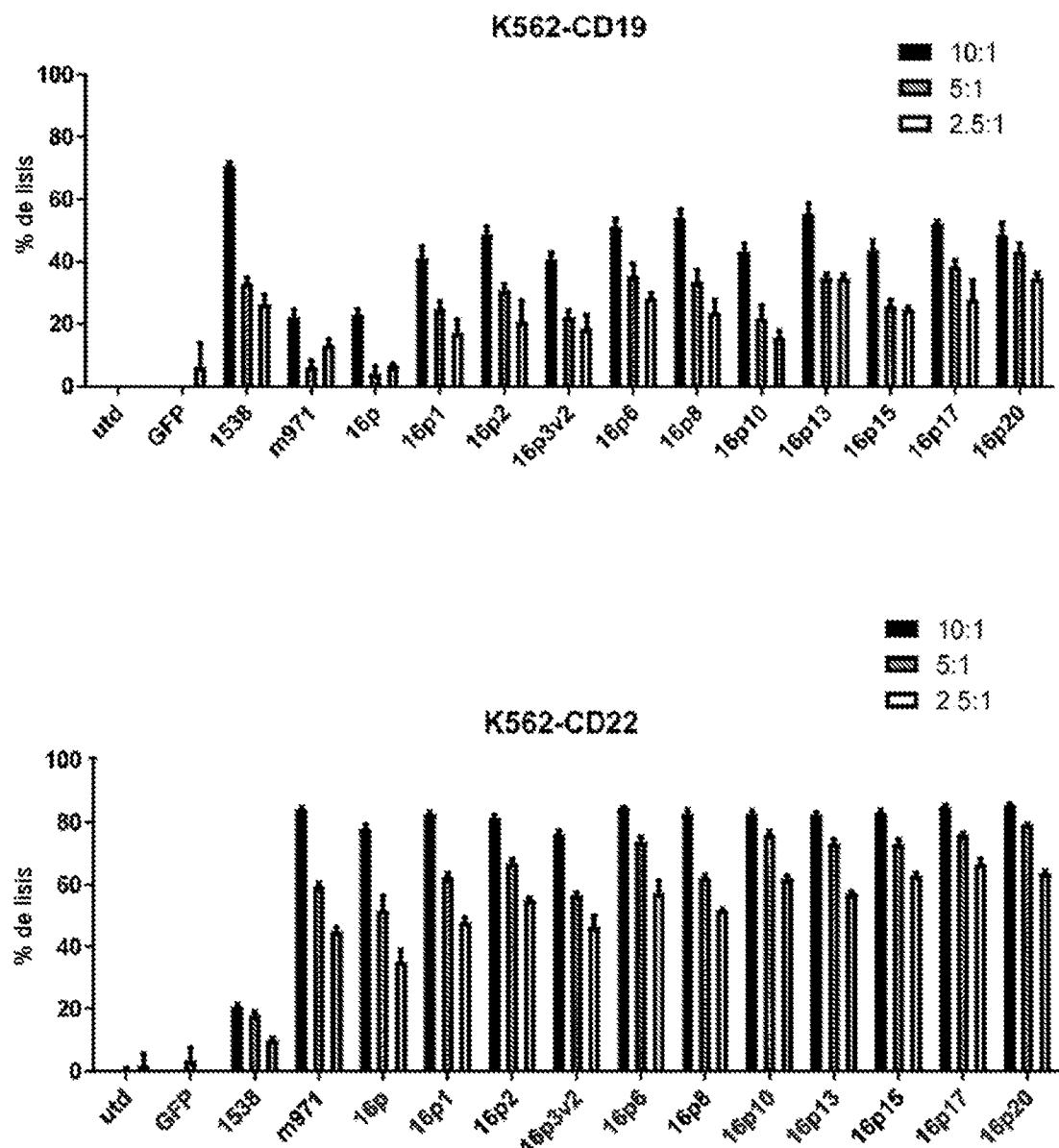


FIGURA 7B

# ES 2 958 849 T3

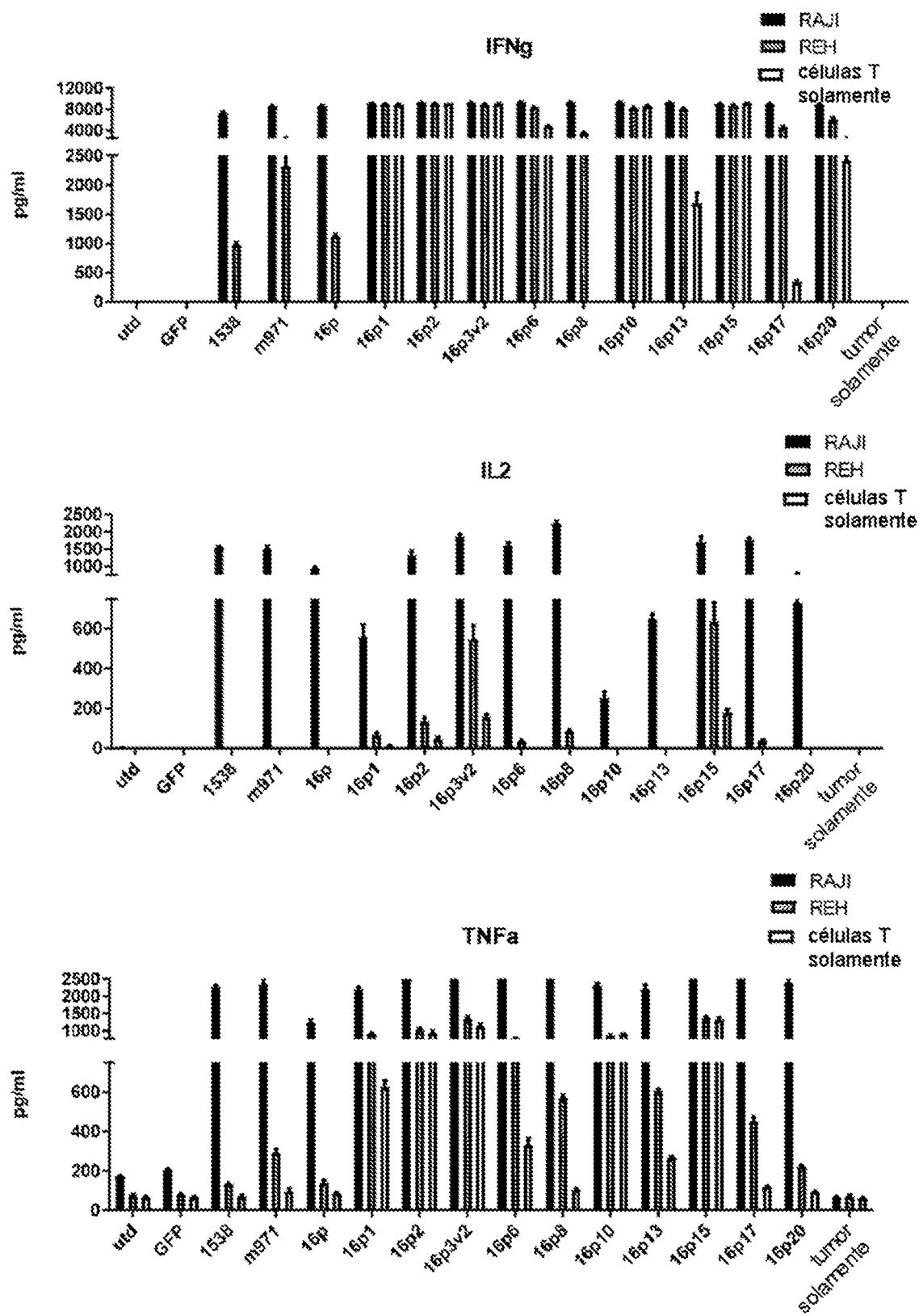


FIGURA 8

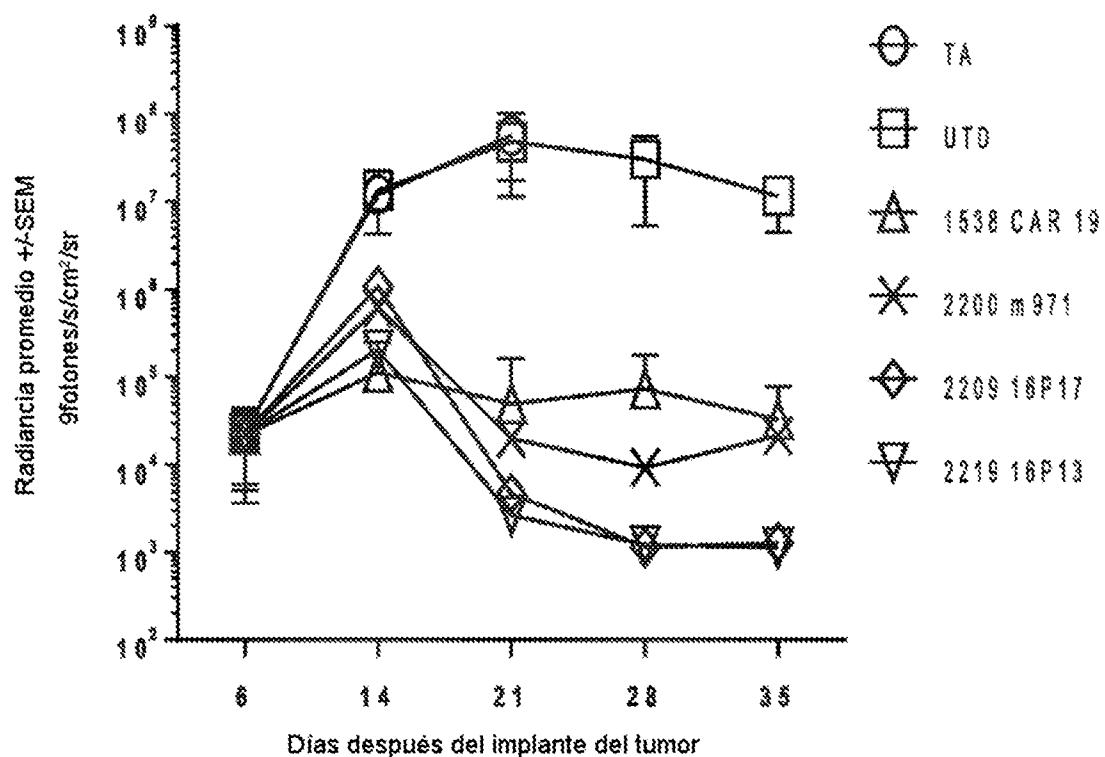


Figura 9