

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 948 133**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/US2016/027751**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16168595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16720247 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2023 EP 3283619**

54 Título: **Métodos para mejorar la eficacia y expansión de células que expresan un receptor de antígeno quimérico**

30 Prioridad:

17.04.2015 US 201562149249 P

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

31.08.2023

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARRETT, DAVID MAXWELL;
BEDOYA, FELIPE;
GHASSEMI, SABA;
JUNE, CARL, H.;
LEVINE, BRUCE, L.;
MELENHORST, JAN, J.;
MILONE, MICHAEL, C.;
POWELL, DANIEL, J.;
SINGH, NATHAN AMAR y
ZHENG, ZOE**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 948 133 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

Métodos para mejorar la eficacia y expansión de células que expresan un receptor de antígeno quimérico

5 Campo de la invención

Esta solicitud reivindica prioridad respecto al documento de EE. UU. con N.º de serie 62/149 249 presentado el 17 de abril de 2015.

10 LISTA DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene una Lista de secuencias que se ha presentado por vía electrónica en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 14 de abril de 2016, tiene como nombre N2067-7094WO_SL.txt y tiene un tamaño de 720 042 bytes.

15 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de manera general a las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR, por sus siglas en inglés), composiciones que las comprenden así como métodos para prepararlas y utilizarlas.

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La terapia de transferencia de células adoptivas (ACT, por sus siglas en inglés) con linfocitos T autólogos, especialmente con linfocitos T transducidos con receptores de antígeno quimérico (CAR), se ha mostrado prometedora en varios ensayos de cáncer hemático. A pesar de estos resultados prometedores, muchos pacientes en proceso de evaluación para la inscripción son, en última instancia, incapaces de continuar debido (al menos en parte) a rendimientos insuficientes de producto producido de manera clínicamente viable. Tales limitaciones de productos producidos de manera clínicamente viable pueden surgir como resultado de varios factores, que incluyen la incapacidad de recolectar linfocitos en una cantidad suficiente y adecuada de un paciente, limitaciones de las células recolectadas y expansión celular *ex vivo* limitada.

Por lo tanto, resulta necesario mejorar la eficacia de la recolección de los linfocitos T y la capacidad para generar cantidades más grandes de células efectoras inmunitarias para generar un producto producido con calidad clínica.

35 El documento WO 2014/055771 divulga CAR con receptor de alfa-folato humano. Barrett *et al.*, *Cytotherapy* (2014);16(5):619-630 se refiere a la influencia de los métodos de cultivo celular sobre la eficacia de los linfocitos T. Kalos *et al.*, *Sci Transl Med* (2011);3(95):95ra73 se refiere a linfocitos CAR-T en pacientes con leucemia avanzada. Flynn *et al.*, *Clin Transl Immunol* (2014);3(7):e20 se refiere a linfocitos T de memoria madre (TSCM, por sus siglas en inglés). Cha *et al.*, *Breast Cancer Res Treat* (2010);122:359-369 estudia el efecto de ciertas citocinas sobre la expansión de linfocitos T. Cheadle *et al.*, *Immunological Reviews* (2013); 257(1):91-106, Hosing *et al.*, *Curr Hematol Malig Rep* (2013);8(1):60-70, Kohn *et al.*, *Mol Therapy* (2011);19(3):432-438 y Koehler *et al.*, *Advances in Hematology* (2012);2012:595060 revisan las terapias con CAR. Singh *et al.*, *Sci Transl Med* (2016);8(320):320ra3 se refiere a terapias con linfocitos T en neoplasias malignas pediátricas. El documento WO 2016/164731 se refiere a CAR CD19, CD20 y CD22. Lee *et al.*, *Lancet* (2015);385:517-528 se refiere a un ensayo de fase 1 de un CAR CD19. Wang *et al.*, *J Immunother* (2012);35(9):689-701 se refiere a linfocitos T de memoria central CD8+ humanos específicos para CD19.

45 SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para evaluar la idoneidad de una población de células efectoras inmunitarias para su uso en una terapia con CAR, que comprende

- (i) proporcionar una población de células efectoras inmunitarias a partir de un sujeto pediátrico que padece una leucemia, en donde la población de células efectoras inmunitarias se adquiere antes de que se le haya administrado al sujeto ciclofosfamida y/o citarabina; y
- (ii) evaluar dicha población para dictar la presencia de al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central, en donde la presencia de al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central es indicativo de la idoneidad de la población de células efectoras inmunitarias para su uso en la terapia con CAR.

La invención también proporciona una población de células efectoras inmunitarias que expresa una molécula CAR («células que expresan CAR» o una «terapia con CAR») para su uso en un método para tratar leucemia en un sujeto pediátrico, o proporcionar inmunidad antitumoral a un sujeto pediátrico que padece una leucemia, en donde dicha

población celular se administra en combinación con quimioterapia que comprende ciclofosfamida y/o citarabina, en donde el método comprende:

- (i) adquirir células efectoras inmunitarias del sujeto pediátrico antes de que se le haya administrado al sujeto ciclofosfamida y/o citarabina;
- (ii) seleccionar una población de dichas células efectoras inmunitarias que incluye al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central;
- (iii) introducir en la población de células efectoras inmunitarias un ácido nucleico que codifica una molécula CAR; y
- (iv) administrar una cantidad eficaz de la población de células efectoras inmunitarias que expresa la molécula CAR al sujeto pediátrico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La información técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de la invención, que está definida por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para ubicar la invención real en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados.

Además, no se debe interpretar que las referencias secundarias a métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y los métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal constituyen una reivindicación de protección para ese método tal cual, sino que deben ser consideradas como una referencia a productos, en particular sustancias o composiciones, para su uso en cualquiera de estos métodos.

La presente divulgación se refiere, al menos en parte, a métodos para mejorar la eficacia y/o expansión (p. ej., expansión *ex vivo*) de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) para su uso en la terapia celular. Los solicitantes han descubierto un beneficio significativo en adquirir, p. ej., recolectar, células inmunitarias de un sujeto, p. ej., un paciente con cáncer, tan pronto como sea posible después del diagnóstico (p. ej., antes de una terapia, o en un momento anterior durante el transcurso de una terapia). Algunos casos descritos en el presente documento proporcionan un criterio para evaluar y/u optimizar la idoneidad de una célula inmunitaria para su uso en la terapia celular, p. ej., terapia con receptor antígeno quimérico (CAR). Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que las células inmunitarias recolectadas tan pronto como es posible después de un diagnóstico, o después del tratamiento con una quimioterapia seleccionada, incluye una población de células efectoras inmunitarias menos diferenciadas (p. ej., linfocitos T vírgenes y de memoria iniciales). Se cree que las poblaciones de células efectoras inmunitarias menos diferenciadas tienen una mayor capacidad proliferativa, de autorrenovación y/o de supervivencia y, por lo tanto, tienen una mayor capacidad de expansión y/o una mayor eficacia antitumoral.

En consecuencia, en algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento mejoran convenientemente la aptitud de los linfocitos T (p. ej., idoneidad para su uso en la terapia celular) y eficacia adquiriendo células de los sujetos poco después del diagnóstico de un cáncer, p. ej., antes de la quimioterapia o antes de ciertos/múltiples ciclos quimioterápicos. En algunos casos, los métodos divulgados en el presente documento utilizan células adquiridas de un paciente antes de un ciclo quimioterápico que contiene fármacos que provocan una depleción de los linfocitos T (p. ej., adquiridas antes de 2, 3, 4 o 5 ciclos de quimioterapia) o adquiridas antes de los ciclos de intensificación retrasada o consolidación. En otros casos, los métodos optimizan la capacidad de expansión y/o eficacia antitumoral de las células inmunitarias al incluir una selección del paciente, p. ej., basándose en el tipo de neoplasia maligna (p. ej., leucemia frente a linfoma) o gravedad de la enfermedad (p. ej., riesgo estándar, alto o muy alto). En otros casos más, los métodos optimizan la capacidad de expansión y/o eficacia antitumoral de las células inmunitarias al incluir una selección de células, p. ej., selección de poblaciones de células que tienen un recuento de linfocitos T absoluto mayor o un porcentaje mayor de linfocitos T menos diferenciados. Por lo tanto, los métodos divulgados en el presente documento se pueden utilizar para optimizar una o más composiciones y métodos para la terapia celular y/o métodos para preparar poblaciones de células efectoras inmunitarias (p. ej., células que expresan CAR).

En consecuencia, en un aspecto, la divulgación se refiere a un método para evaluar la idoneidad de una célula inmunitaria (p. ej., una célula efectora inmunitaria o una población de estas), para su uso en terapia celular, p. ej., terapia con CAR (p. ej., una terapia contra el cáncer). El método incluye adquirir un valor de uno, dos, tres, cuatro o más (todos) de los siguientes:

- (i) la programación de la adquisición de las células inmunitarias (p. ej., recolección) a partir de un sujeto (p. ej., un paciente con cáncer);
- (ii) la programación de una terapia, p. ej., una quimioterapia, p. ej., en relación con la adquisición de células inmunitarias (p. ej., recolección);

(iii) el tipo de terapia, p. ej., quimioterapia;

(iv) la neoplasia maligna subyacente;

5 (v) un parámetro de una célula inmunitaria (p. ej., linfocito T), p. ej., uno o más de número de linfocitos T, fenotipo de linfocitos T o función de linfocitos T,

o una combinación de (i)-(v),

10 en donde el valor de cualquiera de (i)-(v) es indicativo de la idoneidad de la célula inmunitaria para su uso en la terapia celular, p. ej., la terapia CAR. En un caso, el valor de cualquiera de (i)-(v) es indicativo de uno o más de: capacidad de expansión (p. ej., expansión *ex vivo*) de la célula inmunitaria, la eficacia de la célula inmunitaria para la terapia o el rendimiento de la célula inmunitaria.

15 En consecuencia, la presente invención proporciona un método para evaluar la idoneidad de una población de células efectoras inmunitarias para su uso en una terapia con CAR, que comprende

20 (i) proporcionar una población de células efectoras inmunitarias a partir de un sujeto pediátrico que padece una leucemia, en donde la población de células efectoras inmunitarias se adquiere antes de que se le haya administrado al sujeto ciclofosfamida y/o citarabina; y

25 (ii) evaluar dicha población para dictar la presencia de al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central, en donde la presencia de al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central es indicativo de la idoneidad de la población de células efectoras inmunitarias para su uso en la terapia con CAR.

30 En otro aspecto, la divulgación se refiere a tratar, o proporcionar inmunidad antitumoral a, un sujeto que padece un cáncer, que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de una célula inmunitaria (p. ej., una célula efectora inmunitaria o una población de estas) que es capaz de expresar una molécula CAR (una «célula que expresa CAR» o una «terapia con CAR»), en combinación con una terapia, p. ej., una quimioterapia. En ciertos casos, se adquiere (p. ej., se obtiene o se recolecta) la célula inmunitaria (p. ej., una célula efectora inmunitaria o una población de estas) optimizando uno, dos, tres, cuatro o más (todos) de los siguientes:

35 (i) la programación de la adquisición de las células inmunitarias (p. ej., recolección) a partir de un sujeto (p. ej., un paciente con cáncer);

40 (ii) la programación de una terapia, p. ej., una quimioterapia, p. ej., en relación con la adquisición de células inmunitarias (p. ej., recolección);

(iii) el tipo de terapia, p. ej., quimioterapia;

(iv) la neoplasia maligna subyacente;

45 (v) un parámetro de una célula inmunitaria (p. ej., linfocito T), p. ej., uno o más de número de linfocitos T, fenotipo de linfocitos T o función de linfocitos T,

o una combinación de (i)-(v).

50 En consecuencia, la presente invención proporciona una población de células efectoras inmunitarias que expresa una molécula CAR («células que expresan CAR» o una «terapia con CAR») para su uso en un método para tratar leucemia en un sujeto pediátrico, o proporcionar inmunidad antitumoral a un sujeto pediátrico que padece una leucemia, en donde dicha población celular se administra en combinación con quimioterapia que comprende ciclofosfamida y/o citarabina, en donde el método comprende:

55 (i) adquirir células efectoras inmunitarias del sujeto pediátrico antes de que se le haya administrado al sujeto ciclofosfamida y/o citarabina;

60 (ii) seleccionar una población de dichas células efectoras inmunitarias que incluye al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central;

(iii) introducir en la población de células efectoras inmunitarias un ácido nucleico que codifica una molécula CAR; y

- (iv) administrar una cantidad eficaz de la población de células efectoras inmunitarias que expresa la molécula CAR al sujeto pediátrico.

5 En una realización, la célula inmunitaria se adquiere antes de la introducción de la molécula CAR. En una realización, la célula inmunitaria adquirida se expande antes de la introducción de la molécula CAR. En otras realizaciones, la célula inmunitaria se adquiere después de la introducción de la molécula CAR. En una realización, la célula inmunitaria adquirida se expande después de la introducción de la molécula CAR. La célula inmunitaria se puede expandir y/o activar de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

10 En algunos casos, la célula inmunitaria muestra un aumento en uno o más de: la expansión (p. ej., expansión *ex vivo*) de la población de células inmunitarias, la eficacia de la población de células inmunitarias para la terapia o el rendimiento de la población de células inmunitarias, cuando se optimiza cualquiera de (i)-(v).

15 En la presente invención, el método comprende introducir en la célula inmunitaria adquirida (p. ej., población de células) un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., una molécula CAR descrita en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento (p. ej., CTL019).

20 En otro aspecto más, la divulgación presenta un método para enriquecer en, o preparar, una población de células inmunitarias (p. ej., una población de células efectoras inmunitarias) adecuada para su uso en una terapia con CAR (p. ej., una célula que expresa una molécula CAR). El método incluye adquirir (p. ej., recolectar) la población de células inmunitarias, de acuerdo con uno, dos, tres, cuatro o más (todos) de los siguientes:

25 (i) la programación de la adquisición de las células inmunitarias (p. ej., recolección) a partir de un sujeto (p. ej., un paciente con cáncer);

(ii) la programación de una terapia, p. ej., una quimioterapia, p. ej., en relación con la adquisición de células inmunitarias (p. ej., recolección);

30 (iii) el tipo de terapia, p. ej., quimioterapia;

(iv) la neoplasia maligna subyacente;

35 (v) un parámetro de una célula inmunitaria (p. ej., linfocito T), p. ej., uno o más de número de linfocitos T, fenotipo de linfocitos T o función de linfocitos T,

o una combinación de (i)-(v).

40 En un caso, la población de células inmunitarias se adquiere antes de la introducción de la molécula CAR. En un caso, la célula inmunitaria adquirida se expande antes de la introducción de la molécula CAR. En otros casos, la célula inmunitaria se adquiere después de la introducción de la molécula CAR. En un caso, la célula inmunitaria adquirida se expande después de la introducción de la molécula CAR. La célula inmunitaria se puede expandir y/o activar de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

45 En algunos casos, la población de células inmunitarias muestra un aumento en uno o más de: la expansión (p. ej., expansión *ex vivo*) de la población de células inmunitarias, la eficacia de la población de células inmunitarias para la terapia o el rendimiento de la población de células inmunitarias, cuando se optimiza cualquiera de (i)-(v).

50 En algunos casos, el método comprende además introducir en la célula inmunitaria (p. ej., población de células) un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., una molécula CAR descrita en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento (p. ej., CTL019).

55 En otro aspecto, la divulgación presenta un preparado de células inmunitarias o mezcla de reacción, p. ej., que comprende una población de células efectoras inmunitarias (p. ej., que comprende una molécula CAR o un ácido nucleico que codifica una molécula CAR), preparados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Las características o casos y realizaciones adicionales de cualquiera de los métodos, preparados y mezclas de reacción mencionados anteriormente incluyen uno o más de los siguientes:

Sujetos

60 En una realización, el sujeto, p. ej., el sujeto a partir del cual se adquieren las células inmunitarias y/o el sujeto que se va a tratar, es un ser humano, p. ej., un paciente con cáncer. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una edad de 18 años o menos (p. ej., 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o menos [p. ej., 12 meses, 6 meses, 3 meses o menos]). En la presente invención, el sujeto es un paciente pediátrico con cáncer.

65

En otros casos divulgados en el presente documento, el sujeto es un adulto, p. ej., el sujeto tiene más de 18 años de edad (p. ej., tiene más de 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o más). En un caso, el sujeto es un paciente adulto con cáncer.

5 En ciertos casos de la divulgación, el sujeto padece una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno asociado a un tumor o a un cáncer, p. ej., una enfermedad como se describe en el presente documento. En un caso, el sujeto padece un cáncer, p. ej. un cáncer como se describe en el presente documento.

10 En un caso de la divulgación, el sujeto padece un cáncer que se elige entre un cáncer hemático, un tumor sólido o una lesión metastásica de este. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, entre otros, leucemia linfocítica aguda de linfocitos B (LLA-B), leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (LLA-T), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia promielocítica de linfocitos B, neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, tricoleucemia, linfoma folicular microcítico o macrocítico, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto (LCM),
15 linfoma de zonas marginales, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no hodgkiniano (LNH), linfoma de Hodgkin (LH), linfoma plasmoblástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides y macroglobulinemia de Waldenström. En una realización el cáncer es LLA. En otra realización el cáncer es LLC.

20 En la presente invención, el sujeto padece una leucemia, p. ej., LLA. En la presente invención, el sujeto padece leucemia, p. ej., LLA, y es un paciente pediátrico, p. ej., tiene una edad de 18 años o menos (p. ej. 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o menos (p. ej., 12 meses, 6 meses, 3 meses o menos)).

25 En una realización, el sujeto padece LLA, p. ej., se clasifica como LLA del riesgo estándar, riesgo alto o riesgo muy alto. En una realización, el sujeto padece LLA, p. ej., se clasifica como LLA de riesgo estándar, riesgo alto un riesgo muy alto y es un sujeto pediátrico, p. ej., tienen una edad de 18 años o menos. En una realización, el sujeto se clasifica como uno que padece LLA de riesgo estándar. En las realizaciones, el sujeto se clasifica como uno que padece LLA de riesgo estándar y es un sujeto pediátrico, p. ej., tiene una edad de 18 años o menos. En otra realización, el sujeto no se clasifica como uno que padece LLA de riesgo alto o riesgo muy alto. En las realizaciones, el sujeto no se clasifica como uno que padece LLA de riesgo alto o riesgo muy alto y es un sujeto pediátrico, p. ej., tiene una edad de 18 años o menos.
30

En las realizaciones, el sujeto no padece un linfoma, p. ej., el sujeto no padece linfoma no hodgkiniano (LNH). En las realizaciones, el sujeto es un sujeto pediátrico, p. ej., tiene una edad de 18 años o menos y no padece LNH.

35 En otras realizaciones, el sujeto padece un linfoma, p. ej., LNH. En las realizaciones, el sujeto es un sujeto pediátrico, p. ej., tiene una edad de 18 años o menos y padece LNH.

40 En las realizaciones, el sujeto no padece un cáncer en recaída. En las realizaciones, el sujeto es un sujeto pediátrico, p. ej., tiene una edad de 18 años o menos y no padece un cáncer en recaída. En otras realizaciones, el sujeto padece un cáncer en recaída. En las realizaciones, el sujeto es un sujeto pediátrico, p. ej., tiene una edad de 18 años o menos y padece un cáncer en recaída.

En la presente invención, la célula inmunitaria (p. ej., la población de células efectoras inmunitarias) se adquiere, p. ej., obtiene, a partir de un sujeto que padece un cáncer hemático, que es una leucemia, p. ej., LLC, LLA.

45 Programación de la recolección/administración de la quimioterapia

50 En ciertas realizaciones, una programación temprana de la adquisición de células inmunitarias, p. ej., recolección (p. ej., después del diagnóstico) es indicativo de una mayor idoneidad de la célula inmunitaria para su uso en terapia celular, p. ej., la terapia con CAR. En las realizaciones, la programación temprana de la recolección de células inmunitarias aumenta la capacidad de uno o más de: la expansión (p. ej. expansión *ex vivo*) de la célula inmunitaria, la adecuación de la célula inmunitaria para la terapia o el rendimiento de producción de la célula inmunitaria.

55 En una realización, la recolección de la célula inmunitaria antes de la administración de una terapia, p. ej., una quimioterapia, al sujeto da como resultado una mayor idoneidad de la célula inmunitaria para su uso en la terapia celular, p. ej., terapia con CAR. En otras realizaciones, la recolección de la célula inmunitaria temprano durante el transcurso de una terapia, p. ej., una quimioterapia (p. ej., antes de que el sujeto se haya sometido a 2, 3, 4 o 5 ciclos de quimioterapia) al sujeto da como resultado una mayor idoneidad de la célula inmunitaria para su uso en la terapia celular, p. ej., terapia con CAR.

60 En las realizaciones de los métodos divulgados en el presente documento, la recolección de la célula inmunitaria ocurre antes de la administración de una terapia, p. ej., una quimioterapia, al sujeto. En las realizaciones, la recolección ocurre temprano durante el transcurso de una terapia, p. ej., una quimioterapia, al sujeto. En una realización, la recolección de las células inmunitarias se produce antes de que el sujeto se haya sometido a 2, 3, 4 o 5 ciclos de quimioterapia. En una realización, la recolección de células inmunitarias se produce después de que el sujeto se haya sometido a 1 ciclo de

quimioterapia, pero antes de que el sujeto se haya sometido a más de 1 ciclo (p. ej., más de 1, 2, 3, 4 o 5 ciclos) de quimioterapia.

5 En ciertas realizaciones, la quimioterapia o ciclo de quimioterapia incluye uno o más de un ciclo de inducción, de consolidación, de mantenimiento intermedio, de intensificación retrasada o de terapia de mantenimiento. En una realización, las células efectoras inmunitarias se recolectan del sujeto antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de consolidación de quimioterapia o un ciclo de inducción de quimioterapia. En las realizaciones, las células se recolectan antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de consolidación de quimioterapia. En las realizaciones, el sujeto se clasifica como uno que padece un cáncer (p. ej., LLA) de riesgo alto o riesgo muy alto y las células se recolectan antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de consolidación. En otra realización, las células efectoras inmunitarias se recolectan del sujeto antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de intensificación retrasado. En algunas realizaciones, el sujeto se clasifica como uno que padece un cáncer (p. ej., LLA) de riesgo estándar y las células se recolectaron antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de intensificación retrasado. En las realizaciones, el ciclo o los ciclos de quimioterapia se eligen a partir de la Tabla 8.

15 En algunas realizaciones, la quimioterapia comprende un fármaco elegido a partir de la Tabla 8. En las realizaciones, la quimioterapia comprende un fármaco y pauta posológica descrita en la Tabla 8. En las realizaciones, la quimioterapia puede incluir vincristina, dexametasona, PEG-L-asparaginasa, daunorrubicina, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, citarabina, metotrexato, doxorrubicina, 6-tioguanina y/o prednisona.

20 En la presente invención, las células efectoras inmunitarias se recolectan a partir del sujeto antes de que se haya administrado al sujeto ciclofosfamida y/o citarabina.

Parámetros de las células efectoras inmunitarias

25 En algunas realizaciones, las células efectoras inmunitarias recolectadas incluyen un número elevado de linfocitos T menos diferenciados, p. ej., un número más elevado de uno o más de linfocitos T vírgenes, linfocitos T de memoria central madre y/o linfocitos T de memoria central, p. ej., en comparación con un valor de referencia (p. ej., una muestra del sujeto en un momento posterior o después de la exposición a ciclos adicionales de quimioterapia). En la presente invención, las células efectoras inmunitarias recolectadas incluyen al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central.

30 En las realizaciones, un recuento de linfocitos T absoluto (RTA) aumentado es indicativo de una mayor idoneidad de la célula inmunitaria para su uso en la terapia celular, p. ej., terapia con CAR. En una realización, las células efectoras inmunitarias recolectadas comprenden un recuento absoluto de linfocitos T de al menos 400 células/microlitro, un recuento absoluto de linfocitos T vírgenes de al menos 200 células/microlitro, un recuento absoluto de linfocitos T de memoria central madre de al menos 20 células/microlitro y/o un recuento absoluto de linfocitos T de memoria central de al menos 40 células/microlitro.

40 En las realizaciones, la población de células efectoras inmunitarias se selecciona basándose en la expresión de uno o más marcadores, p. ej., CCR7, CD62L, CD45RO y CD95, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T) es CCR7+ y CD62L+.

45 En las realizaciones, los linfocitos T vírgenes se identifican basándose en un patrón de expresión de CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95-, en donde los linfocitos T de memoria central madre se identifican basándose en un patrón de expresión de CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95+, y en donde los linfocitos T de memoria central se identifican basándose en un patrón de expresión de CCR7+, CD62L+, CD45RO+, CD95+.

Moléculas CAR

50 De acuerdo con los métodos, preparados y mezclas de reacción descritos en el presente documento, se puede modificar una célula efectora inmunitaria, p. ej., obtenida mediante un método descrito en el presente documento, para contener una molécula CAR (también denominada en el presente documento «CAR») que tiene como diana uno o más antígenos paraneoplásicos. En algunas realizaciones, el antígeno paraneoplásico (antígenos tumorales) se escoge entre uno o más de: CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (también denominado subconjunto 1 de CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 y 19A24); molécula 1 similar a lectina de tipo C (CLL-1 o CLECL1); CD33; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRVIII); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeij5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); maduración de linfocitos B de miembros de la familia de receptores de TNF (BCMA); antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAcα-Ser/Thr)); antígeno de membrana específico de próstata (PSMA); receptor huérfano de tipo tirosina·cinasa 1 (ROR1); tirosina·cinasa 3 de tipo Fms (FLT3); glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72); CD38; CD44v6; antígeno carcinoembrionario (CEA); molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2); mesotelina; receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre prostáticas (PSCA); proteasa serina 21 (testisina o PRSS21); receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); antígeno de Lewis(Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno embrionario 4 específico de etapa (SSEA-4); CD20; receptor de folato alfa; proteína

tirosina ·cinasa receptora ERBB2 (Her2/neu); Mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión de células neurales (NCAM); prostasa; fosfatasa ácida prostática (PAP); factor de elongación 2 mutado (ELF2M); efrina B2; proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP); receptor del factor insulínico de crecimiento 1 (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); subunidad de proteasoma (prosoma, macropaína), tipo beta, 9 (LMP2); glucoproteína 100 (gp100); proteína de fusión de oncogén que consiste en la región de agrupamiento de puntos de ruptura (BCR) y el homólogo 1 del oncogén vírico de la leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor 2 de efrina de tipo A (EphA2); fucosil GM1; molécula de adhesión de sialilo de Lewis (sLe); gangliósido GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2); receptor de folato beta; marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248); relacionado con el marcador endotelial tumoral 7 (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR); receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; cinasa de linfoma anaplásico (ALK); ácido polisialico; específico de placenta 1 (PLAC1); porción de hexasacárido de glucoceramida globoH (GloboH); antígeno de diferenciación de glándula mamaria (NY-BR-1); uroplaquina 2 (UPK2); receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); panexina 3 (PANX3); receptor acoplado a proteína G 20 (GPR20); complejo de antígeno de linfocitos 6, locus K 9 (LY6K); receptor olfativo 51E2 (OR51E2); Proteína de Marco de Lectura Alternativa TCR Gamma (TARP); proteína del tumor de Wilms (WT1); antígeno de cáncer/testículo 1 (NY-ESO-1); antígeno de cáncer/testículo 2 (LAGE-1a); antígeno 1 asociado al melanoma (MAGE-A1); gen 6 variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); proteína de espermatozoide 17 (SPA17); familia de antígenos X, miembro 1A (XAGE1); receptor de superficie celular de unión a angiopoyetina 2 (Tie 2); antígeno de testículo y cáncer melanoma 1 (MAD-CT-1); antígeno de testículo y cáncer melanoma 2 (MAD-CT-2); antígeno 1 relacionado con Fos; proteína tumoral p53 (p53); p53 mutada; prosteína; survivina; telomerasa; antígeno tumoral de carcinoma de próstata-1 (PCTA-1 o Galectina 8); antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T 1 (MelanA o MART1); mutante de sarcoma de rata (Ras); transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT); puntos de rotura de translocación de sarcoma; inhibidor de la apoptosis de melanoma (ML-IAP); ERG (proteasa transmembrana, gen de fusión de ETS y serina 2 (TMPRSS2)); N-acetilglucosaminil ·transferasa V (NA17); proteína de caja emparejada Pax-3 (PAX3); receptor de andrógenos; ciclina B1; homólogo derivado del neuroblastoma del oncogén vírico de la mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); miembro C de la familia de homólogos de Ras (RhoC); proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2); citocromo P450 1B1 (CYP1B1); similar al factor de unión a CCCTC (proteína de dedo de zinc) (BORIS o hermano del regulador de sitios impresos), antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por linfocitos T 3 (SART3); proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina ·cinasa específica de linfocitos (LCK); proteína de anclaje A cinasa 4 (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto de rotura 2 de X (SSX2); receptor para productos finales de glucación avanzada (RAGE-1); renal ubicuo 1 (RU1); renal ubicuo 2 (RU2); legumaina; virus del papiloma humano E6 (VPH E6); virus del papiloma humano E7 (VPH E7); carboxil ·esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (hsp70-2 mut); CD79a; CD79b; CD72; receptor 1 de tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos (LAIR1); fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); miembro 2 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILRA2); miembro f de la familia de tipo molécula CD300 (CD300LF); miembro A de la familia 12 de dominios de lectina de tipo C (CLEC12A); antígeno 2 de células estromales de la médula ósea (BST2); tipo receptor de hormona de tipo mucina que contiene módulo de tipo EGF 2 (EMR2); antígeno de linfocitos 75 (LY75); Glipicano-3 (GPC3); proteína 5 similar al receptor Fc 5 (FCRL5); y el polipéptido 1 de tipo inmunoglobulina lambda (IGLL1).

En una realización, el antígeno paraneoplásico que es diana de la molécula CAR es CD19, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento (p. ej., CTL019). En una realización, el CAR CD19 comprende una secuencia de aminoácidos o tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Tabla 4.

En una realización, el antígeno paraneoplásico que es diana de la molécula CAR es BCMA, p. ej., un CAR anti-BCMA descrito en el presente documento. En una realización, el CAR anti-BCMA comprende una secuencia de aminoácidos o tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Tabla 11.

En una realización, el antígeno paraneoplásico que es diana de la molécula CAR es EGFRvIII, p. ej., un CAR anti-EGFRvIII descrito en el presente documento, p. ej., descrito en el documento US2014/0322275A1. En las realizaciones, el CAR anti-EGFRvIII comprende una secuencia de aminoácidos o tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en el documento US2014/0322275A1.

En una realización, el antígeno paraneoplásico que es diana de la molécula CAR es CD123, p. ej., un CAR anti-CD123 descrito en el presente documento, p. ej., descrito en el documento US2014/0322212A1 o US2016/0068601A1. En las realizaciones, el CAR anti-CD123 comprende una secuencia de aminoácidos o tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en el documento US2014/0322212A1 o US2016/0068601A1.

En una realización, el antígeno asociado paraneoplásico que es diana de la molécula CAR es la mesotelina, p. ej., un CAR anti-mesotelina descrito en el presente documento, p. ej., descrito en el documento WO 2015/090230. En las realizaciones, el CAR antimesotelina comprende una secuencia de aminoácidos o tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en el documento WO 2015/090230.

En una realización, el antígeno paraneoplásico que es diana de la molécula CAR es la mesotelina, p. ej., un CAR anti-CLL1 descrito en el presente documento, p. ej., descrito en el documento US2016/0051651A1. En las realizaciones, el CAR anti-CLL1 comprende una secuencia de aminoácidos o tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en el documento US2016/0051651A1.

5

En una realización, el antígeno paraneoplásico que es diana de la molécula CAR es la mesotelina, p. ej., un CAR anti-CD33 descrito en el presente documento, p. ej., descrito en el documento US2016/0096892A1. En las realizaciones, el CAR anti-CD33 comprende una secuencia de aminoácidos o tiene una secuencia de nucleótidos que se muestra en el documento US2016/0096892A1. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de la molécula CAR comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un scFv, un Fv, un Fab, un (Fab')₂, un anticuerpo de dominio único (SDAB, por sus siglas en inglés), un dominio VH o VL o un dominio VHH de camélido.

10

En algunas realizaciones, el dominio transmembrana de la molécula CAR comprende un dominio transmembrana elegido entre el dominio transmembrana de una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D y/o NKG2C.

15

20

En ciertas realizaciones, el dominio transmembrana de la molécula CAR comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio transmembrana de CD8 que tiene al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, o una secuencia con un 95-99 % de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. En una realización, el dominio transmembrana comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

25

En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana de CD8 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con esta.

30

En ciertas realizaciones, el dominio de unión al antígeno está conectado al dominio transmembrana mediante una región bisagra. En una realización, la región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de una bisagra de CD8, p. ej., la SEQ ID NO: 2; o la secuencia de aminoácidos de una bisagra de IgG4, p. ej., la SEQ ID NO: 36 o una secuencia con un 95-99 % de identidad respecto a la SEQ ID NO: 2 o 36. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica la región bisagra comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 37, correspondiente a una bisagra de CD8 o una bisagra de IgG4, respectivamente, o una secuencia con un 95-99 % de identidad respecto a la SEQ ID NO: 13 o 37.

35

En otras realizaciones, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización primario y/o un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización primario. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización primario y un dominio de señalización coestimulador.

40

En ciertas realizaciones, el dominio de señalización primario comprende un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en CD3 zeta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, FcR gamma común (FCER1G), FcR beta (Fc Épsilon R1b), CD79a, CD79b, Fc gamma RIIa, DAP10 y DAP12.

45

En una realización, el dominio de señalización primario de la molécula CAR comprende un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. El dominio de señalización primario de CD3 zeta puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10, o una secuencia con un 95-99 % de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el dominio de señalización primario comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización primario comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 20 o la SEQ ID NO: 21, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con esta.

50

55

En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular de la molécula CAR comprende un dominio de señalización coestimulador. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización primario y un dominio de señalización coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador comprende un dominio de señalización funcional de una proteína escogida entre una o más de CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente a CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), CD160, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1,

60

65

5 CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46 o NKG2D.

10 En ciertas realizaciones, el dominio de señalización coestimulador de la molécula CAR comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 16, o una secuencia con un 95-99 % de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 16. En una realización, el dominio de señalización coestimulador comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 16. En otras realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización coestimulador comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con esta.

15 En otras realizaciones, el dominio intracelular de la molécula CAR comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10, y la secuencia de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 16, en donde la secuencia o las secuencias de aminoácidos que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica.

20 En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con esta, y una secuencia de la SEQ ID NO: 20 o la SEQ ID NO: 21 o una secuencia con un 95-99 % de identidad con esta.

25 En algunas realizaciones, el CAR comprende además una secuencia líder. En una realización, la secuencia líder comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

En ciertas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de la molécula CAR tiene una KD de afinidad de unión de 10^{-4} M a 10^{-8} M.

30 En una realización, el dominio de unión al antígeno de la molécula CAR es un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento, p. ej., un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento para una diana proporcionada anteriormente.

35 En algunas realizaciones, el CAR comprende un CAR CD19, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento. En las realizaciones, el CAR CD19 comprende un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento, p. ej., en la Tabla 1 o 4.

Tratamiento/terapias combinadas

40 De acuerdo con el tratamiento de un trastorno como se describe en el presente documento (p. ej., un cáncer) y el suministro de inmunidad antitumoral que se describen en el presente documento, en algunos casos de la divulgación, el método comprende administrar al sujeto una molécula CAR o una población de células efectoras inmunitarias preparadas mediante un método descrito en el presente documento. La presente invención proporciona una población de células efectoras inmunitarias que expresa una molécula CAR («células que expresan CAR» o una «terapia con CAR») para su uso en un método para tratar la leucemia en un sujeto pediátrico, o para proporcionar inmunidad antitumoral a un sujeto pediátrico que padece una leucemia, donde el método es como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la población de células efectoras inmunitaria se modifica para expresar una molécula CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento. En las realizaciones, el método comprende además administrar una terapia, p. ej., una quimioterapia descrita en el presente documento, al sujeto.

50 También se divulga en el presente documento una composición que comprende una célula efectora inmunitaria (p. ej., una población de células efectoras inmunitarias) que comprende una molécula CAR (p. ej., una molécula CAR como se describe en el presente documento) para su uso en tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral, p. ej., un trastorno como se describe en el presente documento.

55 En algunas realizaciones, la quimioterapia (p. ej., ciclo de quimioterapia) y la terapia con CAR se administran simultáneamente. En otras realizaciones, la quimioterapia (p. ej., ciclo de quimioterapia) y la terapia con CAR se administran secuencialmente, p. ej., una detrás de la otra. En las realizaciones, hay menos de 1 semana (p. ej., menos de 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día) de solapamiento en la administración de la quimioterapia (p. ej., ciclo de quimioterapia) y la terapia con CAR. En las realizaciones, hay al menos 1 semana (p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 meses o más) de solapamiento en la administración de la quimioterapia (p. ej., ciclo de quimioterapia) y la terapia con CAR.

65 En algunas realizaciones, la terapia con CAR se administra antes de la quimioterapia, p. ej., antes de un ciclo de quimioterapia. En las realizaciones, la terapia con CAR se administra antes de un primer ciclo, segundo ciclo, tercer ciclo,

cuarto ciclo o quinto ciclo de quimioterapia. En las realizaciones, la terapia con CAR se administra antes de un ciclo de inducción, ciclo de consolidación, cinco de mantenimiento intermedio, ciclo de intensificación retrasada o ciclo de mantenimiento de la quimioterapia. En las realizaciones, la terapia con CAR se administra antes de una quimioterapia, p. ej., ciclo de quimioterapia, que comprende un fármaco descrito en el presente documento, p. ej., un fármaco descrito en la Tabla 8. En las realizaciones, la administración de la terapia con CAR comienza antes de la administración de una quimioterapia, p. ej., antes de un ciclo de quimioterapia, y la administración posterior de la terapia con CAR y la quimioterapia continúa simultáneamente durante un periodo de tiempo.

En las realizaciones, la terapia con CAR se administra después de la quimioterapia, p. ej., después de un ciclo de quimioterapia. En las realizaciones, la terapia con CAR se administra después de un primer ciclo, segundo ciclo, tercer ciclo, cuarto ciclo o quinto ciclo de quimioterapia. En las realizaciones, la terapia con CAR se administra después de un ciclo de inducción, ciclo de consolidación, cinco de mantenimiento intermedio, ciclo de intensificación retrasada o ciclo de mantenimiento de la quimioterapia. En las realizaciones, la terapia con CAR se administra después de una quimioterapia, p. ej., ciclo de quimioterapia, que comprende un fármaco descrito en el presente documento, p. ej., un fármaco descrito en la Tabla 8. En las realizaciones, la administración de la terapia con CAR comienza después de la administración de una quimioterapia, p. ej., después de un ciclo de quimioterapia, y la administración posterior de la terapia con CAR y la quimioterapia continúa simultáneamente durante un periodo de tiempo.

En un caso de la divulgación, el cáncer es un cáncer hemático tal como, p. ej., LLA o LLC. En un caso, el cáncer, p. ej., un cáncer hemático descrito en el presente documento, tal como, p. ej., una leucemia (p. ej., LLA o LLC) o un linfoma (p. ej., LCM, LH o LNH). En la presente invención del sujeto padece una leucemia.

En casos de la divulgación, incluidas realizaciones de la invención, una enfermedad asociada con un antígeno tumoral, p. ej., un antígeno tumoral descrito en el presente documento, p. ej., CD19, se selecciona entre una enfermedad proliferativa tal como un cáncer o una neoplasia maligna, o una afección precancerosa tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia, o es una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de un antígeno tumoral descrito en el presente documento. En un caso, la enfermedad es un cáncer descrito en el presente documento, p. ej., un cáncer descrito en el presente documento como asociado con una diana descrita en el presente documento. En la presente invención, el cáncer hemático es leucemia. En casos de la divulgación, incluidas realizaciones de la invención, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en una o más leucemias agudas incluidas, entre otras, LLA-B, LLA-T, LLA; una o más leucemias crónicas incluidas, entre otras, la leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC); cánceres hemáticos adicionales o afecciones hemáticas que incluyen, entre otros, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, tricoleucemia, linfoma folicular microcítico o macrocítico, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de zonas marginales, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström y/o «preleucemia» (p. ej., una colección diversa de afecciones hemáticas que tienen en común una producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides). En ciertos casos, incluidas ciertas realizaciones, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral descrito en el presente documento incluye, entre otros, cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan un antígeno tumoral como se describe en el presente documento; y cualquier combinación de estos.

En algunos casos, incluidas algunas realizaciones, la enfermedad asociada con la expresión del antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad proliferativa, una afección precancerosa, un cáncer y una afección no relacionada con un cáncer asociados con la expresión del antígeno tumoral.

En otro caso, la enfermedad asociada con un antígeno tumoral descrita en el presente documento es un tumor sólido. En algunos casos, el cáncer se elige entre cáncer de colon, cáncer de recto, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma no microcítico de pulmón, cáncer de intestino delgado, cáncer de esófago, melanoma, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uréter, carcinoma de pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente, combinaciones de dichos cánceres y lesiones metastásicas de dichos cánceres.

En ciertas realizaciones de los métodos o usos reivindicados, el antígeno tumoral asociado con la enfermedad se elige entre uno o más de: CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1 (CLECL1), CD33, EGFRVIII, GD2, GD3, BCMA, Tn Ag, PSMA, ROR1, FLT3, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, mesotelina, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-beta, SSEA-4, CD20, receptor de folato alfa, ERBB2 (Her2/neu), MUC1,

EGFR, NCAM, próstata, PAP, ELF2M, efrina B2, FAP, receptor de IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, tirosinasa, EphA2, fucosil GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-acetil-GD2, receptor de folato beta, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, ácido polisiálico, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, MAGE A1, ETV6-AML, proteína espermática 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, antígeno 1 relacionado con Fos, p53, mutante de p53, prosteína, survivina y telomerasa, PCTA-1/galectina 8, MelanA/MART1, mutante de Ras, hTERT, puntos de rotura de traslocación, ML-IAP, ERG (gen de fusión Tmprss2 Ets), NA17, PAX3, receptor androgénico, ciclina B 1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, transcriptasa inversa de la telomerasa humana, RU1, RU2, legumina, HPV E6, E7, carboxil-esterasa intestinal, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5 y IGLL1.

La población de células es autóloga respecto al sujeto al que se administra la población. En una realización, el sujeto es un ser humano.

En una realización, la población de células efectoras inmunitarias transducidas con un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento, se expande, p. ej., mediante un método descrito en el presente documento. En una realización, las células se expanden durante un periodo de 8 días o menos, p. ej. 7, 6, 5, 4 o 3 días. En una realización, las células, p. ej., una célula CAR CD19 descrita en el presente documento, se expanden en cultivo durante 5 días y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo, p. ej., como se describe en el presente documento.

En una realización, al sujeto se le administran de 10^4 a 10^6 células efectoras inmunitarias por kg de peso corporal del sujeto. En una realización, el sujeto recibe una administración inicial de una población de células efectoras inmunitarias (p. ej., una administración inicial de 10^4 a 10^6 células efectoras inmunitarias por kg de peso corporal del sujeto, p. ej., de 10^4 a 10^5 células efectoras inmunitarias por kg de peso corporal del sujeto), donde una pluralidad de las cuales comprende el ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento, y una o más administraciones posteriores de una población de células efectoras inmunitarias (p. ej., una o más administraciones posteriores de 10^4 a 10^6 células efectoras inmunitarias por kg de peso corporal del sujeto, p. ej., de 10^4 a 10^5 células efectoras inmunitarias por kg de peso corporal del sujeto), donde una pluralidad de las cuales comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento. En una realización, la una o más administraciones posteriores se administran menos de 15 días, p. ej., 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días después de la administración anterior, p. ej., menos de 4, 3, 2 días después de la administración anterior. En una realización, el sujeto recibe un total de aproximadamente 10^6 células efectoras inmunitarias por kg de peso corporal del sujeto durante el transcurso de al menos tres administraciones de una población de células efectoras inmunitarias, p. ej., el sujeto recibe una dosis inicial de 1×10^5 células efectoras inmunitarias, una segunda administración de 3×10^5 células efectoras inmunitarias y una tercera administración de 6×10^5 células efectoras inmunitarias y, p. ej., cada administración se administra menos de 4, 3, 2 días después de la administración anterior.

En ciertas realizaciones, los métodos o usos se llevan a cabo en combinación con un agente que aumenta la eficacia de la célula efectora inmunitaria, p. ej., un agente como se describe en el presente documento.

Realizaciones y casos de los métodos, preparados y mezclas de reacción adicionales

Los métodos y usos reivindicados pueden comprender además eliminar los linfocitos T reguladores, p. ej., linfocitos T CD25+, de la población de células inmunitarias, p. ej., para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+, que son adecuadas para la expresión de un CAR.

En una realización, la población de células con depleción de linfocitos T reguladores contiene menos de un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+.

En un caso, la población de células inmunitarias incluye células de un sujeto que padece cáncer, p. ej., un sujeto que padece un cáncer que expresa CD25 tal como, p. ej., leucemia linfocítica crónica (LLC). En una realización, la población de células con depleción de linfocitos T reguladores contiene menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales.

La población de células inmunitarias es autóloga respecto al sujeto al cual se administrarán las células para el tratamiento.

En una realización, los linfocitos T reguladores, p. ej., linfocitos T CD25+, se eliminan de la población utilizando un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, o un ligando de unión a CD25, p. ej., IL-2. En una realización, el anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, o ligando de unión a CD25 se conjuga con un sustrato, por ejemplo, una perla, o se utiliza

para recubrir de otra manera un sustrato, p. ej., una perla. En una realización, el anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, se conjuga con un sustrato como se describe en el presente documento.

5 En una realización, los linfocitos T reguladores, p. ej., linfocitos T CD25+, se eliminan de la población utilizando un reactivo de depleción de CD25 de Miltenyi™. En una realización, la proporción de células respecto al reactivo de depleción de CD25 es de 1e7 células respecto a 20 uL, o de 1e7 células respecto a 15 uL, o de 1e7 células respecto a 10 uL, o de 1e7 células respecto a 5 uL, o de 1e7 células respecto a 2,5 uL, o de 1e7 células respecto a 1,25 uL.

10 En una realización, la población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+, es adecuada para la expresión de un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento. En una realización, la población de células con depleción de linfocitos T reguladores contiene menos de un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de las células de leucemia, p. ej., células de LLC o células de LLA. En una realización, la población de células efectoras inmunitarias se obtiene de un sujeto que padece LLC, y la población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+, contiene menos de un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de las células de leucemia, p. ej., células de LLC y es adecuada para la expresión de un CAR CD19 descrito en el presente documento. En una realización, la población de células con depleción de linfocitos T reguladores contienen menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC. En una realización, la población de células con depleción de linfocitos T reguladores contiene menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC.

En las realizaciones, las células efectoras inmunitaria se recolectan de la sangre, p. ej., sangre periférica, del sujeto.

25 En una realización, la población de células efectoras inmunitarias son linfocitos T aislados de linfocitos de la sangre periférica. En una realización, la población de linfocitos T se obtiene lisando glóbulos rojos sanguíneos y/o mediante la depleción de los monocitos. En una realización, la población de linfocitos T se aísla de linfocitos periféricos utilizando, p. ej., un método descrito en el presente documento.

30 En una realización, la población de células efectoras inmunitarias se puede obtener a partir de una muestra de sangre de un sujeto, p. ej., obtenerse mediante aféresis. En una realización, las células recolectadas mediante aféresis se lavan para eliminar la fracción plasmática y, opcionalmente, las células se proporcionan en un tampón o medio apropiado para los pasos de procesamiento posteriores. En una realización, las células se lavan con un tampón tal como, p. ej., solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización, las células se lavan en una solución de lavado que carece de uno o más cationes divalentes tales como calcio y magnesio. En una realización, las células se lavan en un tampón que, sustancialmente, no tenga cationes divalentes.

En las realizaciones, las células efectoras inmunitarias se recolectan de la sangre utilizando centrifugación con densidad.

40 En una realización, el método de preparación comprende además eliminar células de la población que expresan un antígeno tumoral, p. ej., un antígeno tumoral que no comprende CD25, p. ej., CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 o CD11b, para proporcionar de esta manera una población con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., con depleción de CD25+, y células con depleción del antígeno tumoral que son adecuadas para la expresión de un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento. En una realización, las células que expresan un antígeno tumoral se eliminan simultáneamente que los linfocitos T reguladores, p. ej., CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, y un anticuerpo anti-antígeno tumoral, o fragmento de este, se pueden unir al mismo sustrato, p. ej., perla, que se puede utilizar para eliminar las células o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, o el anticuerpo anti-antígeno tumoral, o fragmento de este, se puede unir a perlas separadas, y una mezcla de estas se puede utilizar para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de linfocitos T reguladores, p. ej., células CD25+, y la eliminación de las células que expresan un antígeno tumoral es secuencial y puede ocurrir, p. ej., en cualquier orden.

55 En una realización, el método de preparación comprende además eliminar células de la población que expresan un inhibidor de un punto de control, p. ej., un inhibidor de un punto de control descrito en el presente documento, p. ej., una o más células PD1+, células LAG3+ y células TIM3+, para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+, y células con depleción de un inhibidor de un punto de control, p. ej., células con depleción de PD1+, LAG3+ y/o TIM3+. En una realización, las células que expresan un inhibidor de un punto de control se eliminan simultáneamente con los linfocitos T reguladores, p. ej., CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, y un anticuerpo anti-inhibidor de un punto de control, o fragmento de este, se pueden unir a la misma perla, que se puede utilizar para eliminar las células o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, y el anticuerpo anti-inhibidor de un punto de control, o fragmento de este, se pueden unir a perlas separadas, y puede utilizarse una mezcla de las cuales para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de linfocitos T reguladores, p. ej., células CD25+, y la eliminación de las células que expresan un inhibidor de un punto de control es secuencial y puede ocurrir, p. ej., en cualquier orden.

- 5 En una realización, la población de células que se van a eliminar no son linfocitos T reguladores ni células tumorales, sino células que afectan negativamente de otra manera a la expansión y/o función de los linfocitos CART, p. ej., células que expresan CD14, CD11b, CD33, CD15 u otros marcadores expresados por células potencialmente inmunosupresoras. En una realización, se contempla que tales células se eliminen a la vez que los linfocitos T reguladores y/o células tumorales, o tras dicha depleción, o en otro orden.
- 10 En una realización, el método comprende además eliminar células de la población que expresan CD14 para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+ y células con depleción de CD14+. En una realización, las células CD14+ se eliminan simultáneamente con los linfocitos T reguladores, p. ej., CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, y un anticuerpo anti-CD14, o fragmento de este, pueden unirse a la misma perla que se puede utilizar para eliminar las células; o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, y el anticuerpo anti-CD14, o fragmento de este, pueden unirse a perlas separadas, y puede utilizarse una mezcla de las cuales para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de linfocitos T reguladores, p. ej., células CD25+, y la eliminación de las células CD14+ es secuencial y puede ocurrir, p. ej., en cualquier orden.
- 20 En una realización, la población de células efectoras inmunitarias proporcionada se ha seleccionado basándose en la expresión de uno o más marcadores, p. ej., CD3, CD28, CD4, CD8, CD27, CD127, CD45RA y CD45RO, p. ej., la población proporcionada de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T) son CD3+ y/o CD28+.
- 25 En una realización, el método comprende además obtener una población de células efectoras inmunitarias, p. ej., linfocitos T, enriquecidas en la expresión de uno o más marcadores, p. ej., CD3, CD28, CD4, CD8, CD27, CD127, CD45RA y CD45RO. En una realización, la población de células efectoras inmunitarias está enriquecida en células CD3+ y/o CD28+. Por ejemplo, se obtienen linfocitos T aislados por incubación con perlas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28. En una realización, el método comprende además seleccionar células de la población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+, que expresan uno o más marcadores, p. ej., CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO.
- 30 En una realización, el método comprende además activar la población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+, p. ej., mediante un método descrito en el presente documento.
- 35 En las realizaciones, el método comprende además transducir una célula de la población de células efectoras inmunitarias con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento. En las realizaciones, el método comprende además expandir la población de células efectoras inmunitarias modificadas para expresar un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento, p. ej., mediante un método descrito en el presente documento. En las realizaciones, la población de células se expande en presencia de una citocina, p. ej., IL-15 y/o IL-7 (p. Ej., IL-15 e IL-7).
- 40 En una realización, el método de preparación comprende además transducir una célula de la población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., la población de células con depleción de CD25+, con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento. En una realización, el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector retrovírico. En una realización, la célula de la población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., la población de células con depleción de CD25+, se transduce con un vector una vez, p. ej., en un plazo de un día desde que la población de células efectoras inmunitarias se haya obtenido de una muestra sanguínea de un sujeto, p. ej., obtenido mediante aféresis.
- 45 En una realización, el método comprende además generar una población de células con ARN modificado que expresan de manera transitoria ARN exógeno a partir de la población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., la población de células con depleción de CD25+. El método comprende introducir un ARN transcrito *in vitro* o ARN sintético en una célula de la población, donde el ARN comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento.
- 50 En una realización, las células transducidas con un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento, se expanden, p. ej., mediante un método descrito en el presente documento. En una realización, las células se expanden en cultivo durante un período de varias horas (p. ej., aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 horas) a aproximadamente 14 días (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días). En una realización, las células se expanden durante un período de 4 a 9 días. En una realización, las células se expanden durante un periodo de 8 días o menos, p. ej. 7, 6, 5, 4 o 3 días. En una realización, las células, p. ej., una célula CAR CD19 descrita en el presente documento, se expanden en cultivo durante 5 días y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. La potencia se puede definir, p. ej., mediante diversas funciones de linfocitos T, p. ej., proliferación, eliminación de células diana, producción de citocinas, activación, migración o combinaciones de estas. En una realización, las células, p. ej., una célula CAR CD19 descrita en el presente documento, expandidas durante 5 días muestran al menos

5 un aumento de una, dos, tres o cuatro veces en duplicaciones celulares tras la estimulación con antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las células, p. ej., las células que expresan un CAR CD19 descritas en el presente documento, se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes presentan una mayor producción de citocinas proinflamatorias, p. ej., niveles de IFN- γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las células, p. ej., una célula CAR CD19 descrita en el presente documento, expandidas durante 5 días muestran un aumento de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, diez veces o más en pg/mL de producción de citocinas proinflamatorias, p. ej., niveles de IFN- γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

10 En una realización, las células se expanden cultivando las células en presencia de un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células, p. ej., como se describe en el presente documento. En una realización, el agente es una perla conjugada con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de este, y/o un anticuerpo anti-CD28, o un fragmento de este.

15 En una realización, las células se expanden en un medio apropiado (p. ej., medio descrito en el presente documento) que puede, opcionalmente, contener uno o más factores para la proliferación y/o viabilidad, incluidos suero (p. ej., suero humano o bovino fetal), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, TGF β y TNF- α o cualesquiera otros aditivos para el crecimiento de las células.

20 En una realización, las células se expanden en un medio apropiado (p. ej., medios descritos en el presente documento) que incluye una o más interleucinas que dan como resultado un aumento de al menos 200 veces (p. ej., 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces) de las células durante un período de expansión de 14 días, p. ej., según lo medido mediante un método descrito en el presente documento, tal como citometría de flujo. En una realización, las células se expanden en presencia de IL-15 y/o IL-7 (p. ej., IL-15 e IL-7).

25 En una realización, las células se crioconservan después del periodo de expansión apropiado. En una realización, las células se crioconservan de acuerdo con un método descrito en el presente documento. En una realización, las células expandidas se crioconservan en un medio apropiado, p. ej., un método que se puede infundir, p. ej., como se describe en el presente documento.

30 En una realización, el método de preparación comprende además poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT. En una realización, el ácido nucleico es ADN o ARN.

35 En una realización, el método comprende además, antes de la expansión, eliminar los linfocitos T reguladores, p. ej., linfocitos T CD25+, de la población, para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+ para ser expandida. En una realización, los linfocitos T reguladores, p. ej., células CD25+, se eliminan mediante un método descrito en el presente documento.

40 En una realización, el método comprende además, antes de la expansión, eliminar los linfocitos T reguladores, p. ej., células CD14+, de la población, para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de CD14+ para ser expandida. En una realización, los linfocitos T reguladores, p. ej., células CD14+, se eliminan mediante un método descrito en el presente documento.

45 En una realización, el método comprende además poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT. En una realización, el ácido nucleico es ADN o ARN.

50 En las realizaciones, el método comprende poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica un CAR, y un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT, en condiciones que permitan la expresión de CAR y telomerasa.

55 En una realización, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa es ARN. En otra realización, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa es ADN. En una realización, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa comprende un promotor capaz de impulsar la expresión de la subunidad de telomerasa.

60 En las realizaciones, el método de preparación comprende poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica un CAR, y un ARN que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT, en condiciones que permitan la expresión de CAR y la telomerasa.

65 En una realización, el ácido nucleico que codifica el CAR y el ARN que codifica la subunidad de telomerasa son parte de la misma molécula de ácido nucleico. En una realización, el ácido nucleico que codifica el CAR y el ARN que codifica la subunidad de telomerasa son parte de moléculas de ácido nucleico separadas.

- 5 En una realización, el método comprende poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica el CAR y el ARN que codifica la subunidad de telomerasa sustancialmente a la vez. En una realización, el método de preparación comprende poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica el CAR antes de poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con el ARN que codifica la subunidad de telomerasa. En una realización, el método comprende poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica el CAR después de poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con el ARN que codifica la subunidad de telomerasa.
- 10 En una realización, el ARN que codifica la subunidad de telomerasa es ARNm. En una realización, el ARN que codifica la subunidad de telomerasa comprende una cola de poli(A). En una realización, el ARN que codifica la subunidad de telomerasa comprende una estructura de caperuza en 5'.
- 15 En una realización, el método comprende transfectar las células efectoras inmunitarias con el ARN que codifica la subunidad de telomerasa. En una realización, el método de preparación comprende transducir las células efectoras inmunitarias con el ARN que codifica la subunidad de telomerasa. En una realización, el método de preparación comprende electroporar las células efectoras inmunitarias con el ARN que codifica la subunidad de telomerasa, en condiciones que permiten la expresión de CAR y telomerasa.
- 20 En las realizaciones, el método comprende proporcionar una población de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) que expresan un CAR y/o comprenden un ácido nucleico que codifica un CAR; y poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT, en condiciones que permitan la expresión de hTERT.
- 25 En las realizaciones, el método comprende proporcionar una población de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) que expresan ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT, y poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica un CAR, en condiciones que permitan la expresión de CAR.
- 30 *Preparados de células efectoras inmunitarias*
- Un preparado de células efectoras inmunitarias (p. ej., una mezcla de reacción o una población de células efectoras inmunitarias) descrito en el presente documento se puede preparar mediante un método descrito en el presente documento.
- 35 En algunos casos, el preparado de células efectoras inmunitarias (p. ej., mezcla de reacción) se escoge entre:
- (i) la población de células efectoras inmunitarias comprende al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central, y/o
- 40 (ii) la población de células efectoras inmunitarias comprende un recuento absoluto de linfocitos T de al menos 400 células/microlitro, un recuento absoluto de linfocitos T vírgenes de al menos 200 células/microlitro, un recuento absoluto de linfocitos T de memoria central madre de al menos 20 células/microlitro y/o un recuento absoluto de linfocitos T de memoria central de al menos 40 células/microlitro.
- 45 En algunos casos, la población de células efectoras inmunitarias se ha seleccionado basándose en la expresión de uno o más marcadores, p. ej., CCR7, CD62L, CD45RO y CD95, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T) es CCR7+ y CD62L+.
- 50 En algunos casos, los linfocitos T vírgenes se identifican basándose en un patrón de expresión de CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95-, en donde los linfocitos T de memoria central madre se identifican basándose en un patrón de expresión de CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95+, y en donde los linfocitos T de memoria central se identifican basándose en un patrón de expresión de CCR7+, CD62L+, CD45RO+, CD95+.
- 55 En algunos casos, el preparado de células efectoras inmunitarias descrito en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR como se describe en el presente documento.
- En algunos casos, un preparado de células efectoras inmunitarias descrito en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa exógena, p. ej., hTERT. En un caso, el ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa exógena es ARN, p. ej., ARNm.
- 60 En algunos casos, un preparado de células efectoras inmunitarias descrito en el presente documento comprende un CAR, p. ej., un CAR como se describe en el presente documento; y una subunidad de telomerasa exógena, p. ej., hTERT. En un caso, la célula no comprende ADN que codifica la subunidad de telomerasa exógena.
- 65 Por ejemplo, la célula puede haberse puesto en contacto con ARNm que codifica la subunidad de telomerasa exógena.

En un caso, el preparado de células efectoras inmunitarias es una población de células con depleción de linfocitos T reguladores que contiene menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+. En un caso, el preparado de células efectoras inmunitarias es una población de células con depleción de linfocitos T reguladores que contienen menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC. En un caso, el preparado de células efectoras inmunitarias contiene menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC. En un caso, el preparado de células efectoras inmunitarias contiene menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC.

En un caso, el preparado de células efectoras inmunitarias es una población de células con depleción de linfocitos T reguladores que contienen menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células que expresan un inhibidor de un punto de control, p. ej., células PD1+, células LAG3+ o células TIM3+.

En un caso, el preparado de células efectoras inmunitarias es una población de células con depleción de linfocitos T reguladores que contienen menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD14+.

En algunos casos, el preparado de células efectoras inmunitarias descrito en el presente documento comprende una población de células efectoras inmunitarias autólogas, p. ej., donde una pluralidad de las cuales se transfecta o transduce con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento, en donde el preparado de células efectoras inmunitarias contiene menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células de LLC. En un caso, el preparado de células efectoras inmunitarias contiene menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC. En un caso, el preparado de células efectoras inmunitarias contiene menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC.

En un caso, la mezcla de reacción puede comprender además un agente que activa y/o expande las células de la población, p. ej., un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y/o un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células, p. ej., como se describe en el presente documento. En un caso, el agente es una perla conjugada con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de este, y/o un anticuerpo anti-CD28, o un fragmento de este.

En algunos casos, la mezcla de reacción descrita en el presente documento comprende una población de células con depleción de linfocitos T reguladores que contiene menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+. En un caso, la mezcla de reacción comprende una población de células con depleción de linfocitos T reguladores que contienen menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC. En un caso, la población de células contiene menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC. En un caso, la población de células contiene menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células tumorales que expresan CD25, p. ej., células de LLC.

En un caso, la mezcla de reacción comprende una población de células con depleción de linfocitos T reguladores que contienen menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células que expresan un inhibidor de un punto de control, p. ej., células PD1+, células LAG3+ o células TIM3+. La mezcla de reacción puede comprender además un tampón u otro reactivo, p. ej., una solución que contiene PBS.

En un caso, la mezcla de reacción comprende una población de células con depleción de linfocitos T reguladores que contienen menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD14+. La mezcla de reacción puede comprender además un tampón u otro reactivo, p. ej., una solución que contiene PBS.

En un caso, la mezcla de reacción comprende además uno o más factores para la proliferación y/o viabilidad, incluidos suero (p. ej., suero humano o bovino fetal), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células. En un caso, la mezcla de reacción comprende además IL-15 y/o IL-7.

En un caso, una pluralidad de las células de la población en la mezcla de reacción comprenden una molécula de ácido nucleico, p. ej., una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, que comprende una secuencia que codifica un CAR, p. ej., una secuencia que codifica un CAR CD19, p. ej., como se describe en el presente documento.

En un caso, una pluralidad de células de la población en la mezcla de reacción comprenden un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento. En un caso, el vector es un vector descrito en el presente documento, p. ej., un vector seleccionado del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector retrovírico.

En un caso, la mezcla de reacción comprende además un crioprotector o estabilizante tal como, p. ej., un sacárido, un oligosacárido, un polisacárido y un poliol (p. ej., trehalosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, glucosa y dextrano), sales y éteres corona. En un caso, el crioprotector es dextrano.

En algunos casos, la mezcla de reacción comprende una población de células efectoras inmunitarias en donde una pluralidad de las células de la población en la mezcla de reacción comprenden una molécula de ácido nucleico, p. ej., una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, que comprende una secuencia que codifica un CAR, p. ej., una secuencia que codifica un CAR CD19, p. ej., como se describe en el presente documento, e IL-7 y/o IL-15.

En un caso, una pluralidad de células de la población en la mezcla de reacción comprenden un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento. En un caso, el vector es un vector descrito en el presente documento, p. ej., un vector seleccionado del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector retrovírico.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o evaluación de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Las **Figuras 1A-1D** muestran los efectos diferenciales de citocinas γ_c e IL-18 en la acumulación de linfocitos CAR-T. La **Figura 1A** es un diagrama esquemático del vector CAR C4-27z. La **Figura 1B** es un gráfico que muestra la acumulación global de linfocitos CAR-T en respuesta a la exposición a diversas citocinas. Los linfocitos T se transdujeron y expusieron a diversas citocinas exógenas con concentraciones finales de 10 ng/mL a partir del siguiente día (día 0). Se calculó la cantidad de linfocitos CAR-T basándose en el número de linfocitos T y los porcentajes de expresión de CAR. Las curvas son representativas de 6 donantes. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. NC, no citocina. La **Figura 1C** es un histograma que muestra la proliferación de los linfocitos T en respuesta a diversas citocinas. El día 7 después de la transducción con lentivirus, los linfocitos T en el grupo NC se marcaron con CFSE (2,5 μ M) y a continuación se expusieron a diversas citocinas. Siete días después, se analizaron los linfocitos T para determinar la dilución de CFSE mediante citometría de flujo. La **Figura 1D** es un gráfico que muestra la viabilidad de los linfocitos T 15 días después de la transducción lentivírica. Se tiñeron linfocitos T de varios grupos de citocinas con anexina V y 7-AAD, y después se analizaron para determinar las proporciones de células viables (negativas para anexina V y 7-AAD). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ frente al grupo de IL-2 (n=6).

Las **Figuras 2A-2F** muestran los subconjuntos de linfocitos T de memoria de los linfocitos CAR-T. La **Figura 2A** muestra la expresión de CD95 en la subpoblación CD45RA+CD62L+ de linfocitos T antes de la transducción y linfocitos CAR-T 15 días después de la transducción. Las **Figuras 2B y 2C** son gráficos que muestran el aumento de las proporciones de linfocitos T madre de memoria (Tscm) en linfocitos T CD4+ (**Figura 2B**) y linfocitos T CD8+ (**Figura 2C**) después de la transducción lentivírica. Los Tscm se definen como subconjuntos de linfocitos T CD45RA+CD62L+CD95+CCR7+. La **Figura 2D** es un gráfico que muestra la correlación entre la cantidad de linfocitos T vírgenes (Tn, definidos como subpoblación CD45RA+CD62L+CD95-) en los linfocitos T antes de la transducción y la proporción de Tscm en los linfocitos CAR-T después de la transducción (n=6). Las barras de la izquierda representan los porcentajes de Tn en linfocitos T CD4+ y CD8+ antes de la transducción y las barras de la derecha representan los porcentajes de Tscm en los linfocitos CAR-T CD4+ y CD8+. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. La **Figura 2E** es un gráfico que muestra la autorrenovación y diferenciación de diferentes subconjuntos de linfocitos CAR-T. Los linfocitos Tscm, Tcm, Tern y Temra CAR+ clasificados por FACS se cultivan expuestos a IL-2 (10 ng/mL) durante 3 días, después se analizan los fenotipos basándose en la expresión de CD45RA y CD62L (n=3). La **Figura 2F** es un histograma que muestra la proliferación de varios subconjuntos de linfocitos CAR-T en respuesta a IL-2. Los linfocitos Tscm, Tcm, Tern y Temra CAR+ clasificados por FACS se marcaron con CFSE (2,5 μ M), y después se cultivaron expuestos a IL-2 (10 ng/mL) durante 3 días. Tres días después, se analizaron los linfocitos T para determinar la dilución de CFSE.

Las **Figuras 3A-3B** muestran la correlación entre la expresión de CD45 RA y la intensidad de CFSE. La **Figura 3A** demuestra que la expresión de CD45RA se correlaciona inversamente con la intensidad de CFSE. La **Figura 3B** muestra que para todos los grupos de citocinas (IL-2, IL-7, IL-15, IL-18 e IL-21), los linfocitos T CD45RA+ exhibieron niveles mucho más bajos de CFSE que los linfocitos T negativos para CD45RA y con expresión tenue de CD45RA lo que indica que los linfocitos T CD45RA+ tenían una actividad de proliferación más fuerte que los linfocitos T CD45RA-.

La **Figura 4** muestra los fenotipos de linfocitos CAR-T resultado de la exposición a diferentes citocinas. La **Figura 4** es una serie de gráficos que muestra la cuantificación de la expresión de CD45RA, CD62L, CCR7, CD27, CD28 e IL7R α por FACS en la superficie de los linfocitos CAR-T en los grupos de citocinas indicados. Los histogramas representan el valor medio \pm EEM de los niveles de expresión de 6 donantes independientes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ frente al grupo de IL-2.

Las **Figuras 5A-5D** muestran el análisis funcional de los linfocitos CAR-T expuestos a diferentes citocinas. Las **Figuras 5A, 5B y 5C** son representaciones cuantitativas que muestran los porcentajes de linfocitos CAR-T productores de citocinas en diversos grupos de citocinas (n=6) para la producción de IFN γ (**Figura 5A**), TNF- α (**Figura 5B**) e IL-2 (**Figura 5C**). Los linfocitos T transducidos con lentivirus se exponen a las citocinas indicadas durante 14 días, y después se cocultivan con células SKOV3 durante 5 horas antes de la recolección para el análisis por citometría de flujo. La **Figura 5D** es un gráfico que muestra la actividad citotóxica específica del antígeno de los linfocitos CAR-T. Catorce días después de la exposición a las citocinas indicadas, se evaluó la capacidad citotóxica de los linfocitos CAR-T utilizando un ensayo con luciferasa después de un cocultivo de 18 horas con SKOV3 en las relaciones E/T indicadas. Los linfocitos T no transducidos (UNT) sirvieron como controles efectores negativos. Los datos mostrados con el valor medio \pm EEM de seis ensayos citotóxicos independientes.

Las **Figuras 6A-6C** muestran el fenotipo y función de los linfocitos CAR-T descritos anteriormente en la Figura 5. Las **Figuras 6A y 6B** muestran que los linfocitos CAR-T CD62L+ (Tscm y Tcm) exhibieron menos actividad de producción de citocinas (**Figura 6A y 6B**) y menor capacidad citotóxica (**Figura 6C**) en comparación con linfocitos CAR-T CD62L- (Tern y Temra).

Las **Figuras 7A-7B** muestran la expansión y el fenotipo de los linfocitos CAR-T expuestos a una provocación antigénica. La **Figura 7A** presenta dos gráficos que muestran la acumulación y viabilidad globales de CAR-T expuestos previamente a las citocinas indicadas tras la provocación antigénica. Los linfocitos T expuestos a las citocinas indicadas se recolectan el día 15 y después se cocultivan con SKOV3 con relaciones E/T de 5:1 durante 7 días. Se calculan las expansiones de los linfocitos CAR-T y se evalúa la viabilidad de los linfocitos T en el séptimo día. La **Figura 7B** son dos gráficos que muestran la distribución de subconjuntos T de memoria de linfocitos CAR-T CD4+ y CD8+ en diversos grupos de citocinas. N.S.: sin diferencia estadística.

Las **Figuras 8A-8C** muestran la actividad antitumoral de diversos linfocitos CAR-T con exposición previa a citocinas. La **Figura 8A** muestra las curvas de crecimiento tumoral de ratones tratados con linfocitos CAR-T C4-27z expuestos a diversas citocinas, linfocitos CAR-T anti-CD19-27z y linfocitos T no transducidos. Los datos se presentan como valor medio \pm EEM. La flecha indica el momento de la infusión de linfocitos T. La **Figura 8B** es un gráfico que muestra la cuantificación de los recuentos de linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos circulantes en sangre periférica de ratones 15 días después de la primera dosis de infusión de linfocitos CAR-T. La **Figura 8C** es un gráfico que muestra la cuantificación de la expresión de CAR en linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos circulantes en sangre de ratones.

La **Figura 9** es una serie de gráficos FACS (parte superior) que muestran las poblaciones de CD3 y CD19 e histogramas (parte inferior) que muestran la expresión de CD14 de células procedentes de la aféresis, células seleccionadas con anti-CD3/CD28, células con depleción de CD25 y células enriquecidas en CD25.

Las **Figuras 10A, 10B y 10C** muestran la comparación de la capacidad de proliferación entre células con selección de CD3/CD28 y células con depleción de CD25. La **Figura 10A** es un gráfico que muestra el número total de células en los días de cultivo indicados. La **Figura 10B** es un gráfico que muestra las duplicaciones de la población cuantificadas en cada día de cultivo indicado. La **Figura 10C** muestra el porcentaje de células viables en los días de cultivo indicados.

La **Figura 11** es una serie de gráficos FACS que muestra la distribución de CD3 y CD19 en PBMC no manipuladas y PBMC con depleción de CD25 después del cultivo con los complementos de citocinas indicados, IL-7, IL-15 o IL-7 e IL-15.

La **Figura 12** es un conjunto de gráficos que muestran el perfil de expansión en las duplicaciones de la población (gráfico de la izquierda) y tamaño medio (fL) (gráfico de la derecha) de PBMC que han sido estimuladas con

perlas anti-CD3 y CD28, y que se han dejado sin manipular (UTD) o se han transducido con un CAR CD19 (CD19.BBz), se han eliminado las perlas, y después se han recolectado en el Día 5 y D9.

5 La **Figura 13** es un conjunto de gráficos que muestran la citotoxicidad como una lisis porcentual de células K562 que expresan CD19 tratadas con PMBC que han sido estimuladas con perlas anti-CD3 y CD28, y se han dejado sin manipular (UTD) o se han transducido con un CAR CD19 (CD19.BBz), se han eliminado las perlas y después se han recolectado en el Día 5 y D9.

10 La **Figura 14** es un conjunto de gráficos que muestran la proliferación de PBMC estimuladas con perlas anti-CD3 y CD28 (3 x 28 perlas), células K562 de tipo natural, células K562 que expresan CD19, células de LLA (Nalm6) o células de LLC (P114). Las PBMC se han dejado sin manipular (UTD) o se han transducido con un CAR CD19 (CART19), se han eliminado las perlas y después se han recolectado en el Día 5 y D9.

15 La **Figura 15** es una representación esquemática de un esquema de producción ejemplar.

La **Figura 16** es una representación esquemática de un esquema de producción ejemplar.

20 La **Figura 17** es un conjunto de gráficos que muestran el nivel de proliferación celular de dos lotes de producción diferentes de células donantes transfectadas con el CAR CTL019, CHP959-115 y CHP959-121, expandidas durante un periodo de 0 a 9 días.

25 La **Figura 18** es un conjunto de gráficos que muestran la producción de citocinas proinflamatorias, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α e IL-4 de dos lotes de producción diferentes de células donantes transfectadas con CAR CTL019, concretamente CHP959-115, o un ss1-mesoCAR, concretamente CHP959-121, y expandidas durante un periodo de 0 a 9 días después de la aféresis.

30 La **Figura 19** es un conjunto de gráficos que muestran niveles de producción de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-2, IL-1 β , GM-CSF e IL-4 en células donantes estimuladas con perlas con anticuerpo anti-idiotipo CAR19 o perlas de control, transfectadas con CAR CTL019 y expandidas durante de 5 a 9 días. Con las perlas de control no se detectaron niveles de citocinas o se detectaron niveles de citocinas bajos (<200 pg/mL).

35 La **Figura 20** es un gráfico que muestra la destrucción celular basándose en los lisados totales utilizando un ensayo con luciferasa de células Nalm6 (LLA) de PBMC que se dejaron se manipular (UTD) o se transdujeron con un CAR CD19 (CART19), se eliminaron las perlas y después se recolectaron en el Día 5 y D9. Se cultivaron diversas proporciones de PMBC respecto a células Nalm6 (efector (E):Diana (T)). Como se muestra, las células CART19 recolectadas en el día 5 muestran una mejor capacidad destructora.

40 La **Figura 21** es un gráfico que muestra la capacidad de destrucción *in vivo* a largo plazo de PBMC que se dejaron se manipular (UTD) o se transdujeron con un CAR CD19 (CART19), se eliminaron las perlas y después se recolectaron en el Día 5 y D9. Las PBMC se introdujeron en ratones con inmunodeficiencia combinada grave/diabéticos no obesos inoculados con células Nalm6.

45 La **Figura 22A** es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de muestras de sangre periférica que tuvieron éxito en la expansión de prueba a partir de pacientes con LLA y LNH. La **Figura 22B** es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de muestras de sangre periférica que tuvieron éxito en la expansión de prueba a partir de pacientes con LLA-RE y LLA-RA/RMA. La **Figura 22C** es un gráfico de barras que muestra los recuentos absolutos de linfocitos de sangre periférica en diversos momentos de recogida de todos los pacientes con una expansión superior (tienen éxito) o inferior (no tienen éxito) a 5 veces el umbral de expansión *in vitro*. La **Figura 22D** es un gráfico de barras que muestra los recuentos absolutos de linfocitos T de sangre periférica en diversos momentos de recogida de todos los pacientes que tuvieron éxito o no tuvieron éxito en cuanto a superar el valor de 5 veces del umbral de expansión *in vitro*. La **Figura 22E** es un gráfico de barras que muestra los recuentos absolutos de linfocitos (en células por microlitro) de sangre periférica en diversos puntos de recogida de todos los pacientes con leucemia o linfoma. La **Figura 22F** es un gráfico de barras que muestra los recuentos absolutos de linfocitos T (en células por microlitro) de sangre periférica en diversos puntos de recogida de pacientes con leucemia o linfoma. Las diferencias significativas se indican con un «*» por encima de cada columna y representan $P < 0,05$. Se puede consultar el análisis estadístico en la Tabla 12.

55 Las **Figuras 23A-23O** son gráficos de barras que muestran los fenotipos de memoria de linfocitos T recolectados de sangre periférica de pacientes que se están sometiendo a quimioterapia. Se muestran los recuentos absolutos de células a partir de muestras que tuvieron éxito o no tuvieron éxito en cuanto a superar elHR valor superior a cinco veces del umbral de expansión [columna 1, de Figura 23A a Figura 23E], pacientes con LLA o LNH [columna 2, de Figura 23F a Figura 23J] y pacientes con LLA-RE y LLA-RA/RMA [columna 3, de Figura 23K a Figura 23O]. Las diferencias significativas se indican con un «*» por encima de cada columna y representan $P < 0,05$. Se puede consultar el análisis estadístico en la Tabla 13, y se puede consultar una tabla de resumen en la Tabla 9.

La **Figura 24** es un gráfico de barras que muestra los recuentos absolutos de linfocitos T (en células por microlitro) de sangre periférica en diversos puntos de recogida de todos los pacientes con LLA-RE y LLA-RA/RMA. Las diferencias significativas se indican con un «*» por encima de cada columna y representan $P < 0,05$. Se puede consultar el análisis estadístico en la Tabla 12.

La **Figura 25A** y **25B** son gráficos de barras que muestran el efecto de IL-7 e IL-15 en el fenotipo y expansión de linfocitos T. Las muestras recogidas se dividieron en dos cultivos estimuladores, con o sin IL-7 e IL-15 como se describe en el Ejemplo 4. La **Figura 25A** es un gráfico de barras que muestra el cambio porcentual en el recuento absoluto de células con fenotipo de memoria en pacientes con leucemia y linfoma después del cultivo con citocinas. Las diferencias significativas se indican con un «*» por encima de cada columna y representan $P < 0,05$. La **Figura 25B** es un gráfico de barras que muestra porcentajes de muestras que tuvieron éxito en la expansión de prueba evaluadas después del cultivo con o sin citocinas. «Todas las muestras» representa cada muestra expandida sin citocinas, algunas de las cuales se recogieron antes del protocolo de división del cultivo. Se puede consultar el análisis estadístico en la Tabla 14.

La **Figura 26** es un conjunto de diagramas de sectores que muestran fenotipos después de la expansión de muestras que tuvieron éxito y no tuvieron éxito en la expansión de prueba. Los fenotipos se evaluaron al final de la expansión de prueba.

DESCRIPCIÓN DETALLADA ADICIONAL

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la aptitud de las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) para su uso en la terapia celular (p. ej., una terapia con CAR, p. ej., como se describe en el presente documento) se correlaciona con varios factores, incluidos la programación de la quimioterapia respecto a la adquisición de células de un sujeto, el tipo de quimioterapia que se administra a un sujeto a partir del cual se han adquirido las células, la neoplasia maligna subyacente de un sujeto (del cual se adquieren las células), la gravedad de la neoplasia maligna (p. ej., LLA de riesgo estándar, riesgo alto o riesgo muy alto), porcentaje de linfocitos T menos diferenciados (p. ej., linfocitos T vírgenes, linfocitos T de memoria central madre o linfocitos T de memoria central), porcentaje de linfocitos T efectoras terminales y número de linfocitos T adquiridos de un sujeto (p. ej., recuento absoluto de linfocitos T).

Como se describe detalladamente en los Ejemplos, se observó una expansión mejorada de linfocitos T (p. ej., que puede indicar idoneidad para su uso en la terapia celular) utilizando células adquiridas de un paciente pronto durante su quimioterapia (p. ej., antes de la administración de un ciclo quimioterápico que provocó depleción de linfocitos T con capacidad muy proliferativa). Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que la adquisición de células de un paciente pronto durante su quimioterapia genera poblaciones celulares que están menos deterioradas, p. ej., en su capacidad de expansión. Por ejemplo, se observó una expansión mejorada de linfocitos T utilizando células adquiridas de pacientes antes de un ciclo de intensificación retrasado o ciclo de consolidación de quimioterapia. La gravedad de la enfermedad puede afectar el deterioro de las células, p. ej., la capacidad de expansión en las células. En algunos casos, las células adquiridas de pacientes que padecían una enfermedad menos grave (p. ej., LLA de riesgo estándar) se expandieron mejor que las células adquiridas de pacientes que padecían una enfermedad más grave (p. ej., LLA de riesgo alto o riesgo muy alto). Los pacientes con una enfermedad más grave (p. ej., LLA de riesgo alto o riesgo muy alto) pueden requerir la adquisición de células en un momento anterior en la quimioterapia (p. ej., antes del ciclo 2 o un ciclo de consolidación) en comparación con pacientes con una enfermedad menos grave (p. ej., LLA de riesgo estándar). Se pueden adquirir células capaces de expansión de pacientes con una enfermedad menos grave (p. ej., LLA de riesgo estándar) en un momento posterior en la quimioterapia (p. ej., antes del ciclo 4 o un ciclo de intensificación retrasado) en comparación con pacientes con una enfermedad más grave. En otros casos, las células adquiridas de pacientes con leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA pediátrica) tuvieron una capacidad de expansión mejor que las células adquiridas de pacientes con linfoma (p. ej., LNH, p. ej., LNH pediátrico). Además, las poblaciones de células adquiridas que contenían un recuento absoluto de linfocitos T mayor también tendieron a expandirse mejor que aquellas con un recuento absoluto de linfocitos T menor. Las poblaciones de células adquiridas que contenían porcentajes mayores de células efectoras inmunitarias menos diferenciadas (p. ej., linfocitos T menos diferenciados), que tendieron a tener una capacidad de proliferación y supervivencia mayor, mostraron también una mejor capacidad de expansión.

Sin desear ceñirse a ninguna teoría, se cree que los fármacos utilizados en algunos ciclos quimioterápicos, tales como ciclofosfamida y citarabina, provocan una depleción significativa de linfocitos T muy proliferativos (p. ej., linfocitos T menos diferenciados), y este efecto es más pronunciado en pacientes con una enfermedad más grave. Una duración mayor de exposición o dosis más elevadas de fármacos quimioterápicos pueden dar lugar a una depleción mayor de estas poblaciones de linfocitos T. Asimismo, se cree que una población mayor de linfocitos T menos diferenciados da lugar a una mayor capacidad de expansión, persistencia y eficacia de linfocitos T como terapia anticancerosa con linfocitos T.

En consecuencia, en el presente documento se divulgan métodos que mejoran convenientemente la aptitud de los linfocitos T (idoneidad para su uso en la terapia celular) y eficacia adquiriendo células de los sujetos poco después del diagnóstico de un cáncer, p. ej., antes de la quimioterapia o antes de ciertos/múltiples ciclos quimioterápicos. En la presente invención, las células efectoras inmunitarias se adquieren antes de que se le haya administrado al sujeto

ciclofosfamida y/o citarabina. En las realizaciones, los métodos utilizan células adquiridas de pacientes antes de ciclos quimioterápicos que contienen fármacos que provoca la depleción de linfocitos T, adquiridas antes de 2, 3, 4 o 5 ciclos de quimioterapia, o adquiridas antes de ciclos de intensificación retrasada o consolidación. En otras realizaciones, los métodos además optimizan la capacidad de expansión y/o eficacia antitumoral de las células inmunitarias al incluir una selección del paciente, p. ej., basándose en el tipo de neoplasia maligna (p. ej., leucemia frente a linfoma) o gravedad de la enfermedad (p. ej., riesgo estándar, alto o muy alto). En otras realizaciones más, los métodos optimizan además la capacidad de expansión y/o eficacia antitumoral de las células inmunitarias al incluir una selección de células, p. ej., selección de poblaciones de células que tienen un recuento de linfocitos T absoluto mayor o un porcentaje mayor de linfocitos T menos diferenciados. Se describen realizaciones adicionales más detalladamente en el presente documento.

Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todas las expresiones y términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

El término «un» y «uno/a» se refiere a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento.

Se entiende que el término «aproximadamente», cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o en algunos casos $\pm 10\%$, o en algunos casos $\pm 5\%$, o en algunos casos $\pm 1\%$, o en algunos casos $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son adecuadas para realizar los métodos divulgados.

«Adquirir» o «que adquiere», tal como los términos se utilizan en el presente documento, se refieren a obtener la posesión de una entidad física (p. ej., una muestra, una célula o población de células, un polipéptido, un ácido nucleico o una secuencia), o un valor, p. ej., un valor numérico, al «adquirir directamente» o «adquirir indirectamente» la entidad física o valor. En una realización, «adquirir» se refiere a obtener o recolectar una célula o población de células (p. ej., una célula efectora inmunitaria o población como se describe en el presente documento). «Adquirir directamente» se refiere a realizar un proceso (p. ej., realizar un método sintético o analítico o de purificación) para obtener la entidad física o valor. «Adquirir indirectamente» se refiere a recibir la entidad física o valor de otra parte o fuente (p. ej., otro laboratorio que adquiere directamente la entidad física o valor). «Adquirir directamente» una entidad física incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una sustancia física, p. ej., un material de partida. Los cambios a modo de ejemplo incluyen preparar una entidad física partir de dos o más materiales de partida, cizallar o fragmentar una sustancia, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una mezcla, realizar una reacción química que incluye la rotura o formación de un enlace covalente o no covalente. Adquirir directamente un valor incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, p. ej., realizar un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, p. ej., una muestra, analito o reactivo (denominado a veces en el presente documento «análisis físico»), realizar un método analítico, p. ej., un método que incluye uno o más de los siguientes: separar o purificar una sustancia, p. ej., un analito, o un fragmento o derivado de este, de otra sustancia; combinar un analito, o fragmento u otro derivado de este, con otra sustancia, p. ej., un tampón, disolvente o reactivo; o cambiar la estructura de un analito o un fragmento u otro derivado de este, p. ej., rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiando la estructura de un reactivo, o un fragmento u otro derivado de este, p. ej., rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

El término "bioequivalente" se refiere una cantidad de un agente que no es el compuesto de referencia (p. ej., RAD001), necesaria para producir un efecto equivalente al efecto producido por la dosis de referencia o cantidad de referencia del compuesto de referencia (p. ej., RAD001). En una realización, el efecto es el nivel de inhibición de mTOR, p. ej., medido por la inhibición de la cinasa P70 S6, p. ej., según se evalúa en un ensayo *in vivo* o *in vitro*, p. ej., según se mide mediante un ensayo descrito en el presente documento, p. ej., el ensayo de Boulay o la medida de los niveles de S6 fosforilado por inmunoelectrotransferencia. En una realización, el efecto es la alteración de la proporción de linfocitos T positivos para PD-1/negativos para PD-1, medidos por clasificación celular. En una realización, una cantidad o dosis bioequivalente de un inhibidor de mTOR es la cantidad o dosis que alcanza el mismo nivel de inhibición de la cinasa P70 S6 que la dosis de referencia o la cantidad de referencia de un compuesto de referencia. En una realización, una cantidad o dosis bioequivalente de un inhibidor de mTOR es la cantidad o dosis que logra el mismo nivel de alteración en la proporción de linfocitos positivos para PD-1/negativos para PD-1 que la dosis de referencia o la cantidad de referencia de un compuesto de referencia.

La expresión "receptor de antígeno quimérico" o, como alternativa, un "CAR" se refiere a un conjunto de polipéptidos, normalmente dos en las realizaciones más sencillas, que, cuando están en una célula efectora inmunitaria, proporcionan a la célula especificidad para una célula diana, normalmente una célula cancerosa, y generación de señales intracelulares. En algunas realizaciones, un CAR comprende al menos un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplasmático (también denominado en el presente documento "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora y/o una molécula coestimuladora como se define más adelante. En algunos aspectos, el conjunto de polipéptidos son

contiguos entre sí, p. ej., están en la misma cadena polipeptídica, p. ej., que comprende una proteína de fusión quimérica. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos no son contiguos entre sí, p. ej., están en diferentes cadenas polipeptídicas. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos incluye un conmutador de la dimerización que, tras la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, p. ej., puede acoplar un dominio de unión al antígeno a un dominio de señalización intracelular. En un aspecto, la molécula estimuladora es la cadena zeta asociada con el complejo receptor de linfocitos T. En un aspecto, el dominio de señalización citoplasmático comprende, además, uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula coestimuladora tal como se define más adelante. En un aspecto, la molécula coestimuladora se selecciona entre las moléculas coestimuladoras descritas en el presente documento, p. ej., 4-1BB (es decir, CD137), CD27 y/o CD28. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula coestimuladora y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende al menos dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una secuencia líder opcional en el extremo amino (N-ter) de la proteína de fusión CAR. En un aspecto, el CAR comprende, además, una secuencia líder en el extremo N del dominio de unión al antígeno extracelular, en donde la secuencia líder se escinde opcionalmente del dominio de unión al antígeno (p. ej., un scFv) durante el procesamiento celular y la ubicación del CAR en la membrana celular.

Un CAR que comprende un dominio de unión al antígeno (p. ej., un scFv o TCR) que tiene como diana un antígeno tumoral X específico, tal como los descritos en el presente documento, también se denomina XCAR. Por ejemplo, un CAR que comprende un dominio de unión al antígeno que tiene como diana CD19 se denomina CARCD19.

La expresión «dominio de señalización» se refiere a la porción funcional de una proteína que actúa transmitiendo la información dentro de la célula para regular la actividad celular a través de rutas de señalización definidas, generando segundos mensajeros o funcionando como efectores al responder a dichos mensajeros.

El término «anticuerpo», tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas policlonales o monoclonales, de cadena sencilla o múltiple, o intactas, y pueden proceder de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una porción de un anticuerpo, que conserva la capacidad de interactuar específicamente con (p. ej., mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítipo de un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, fragmentos de anticuerpos scFv, Fv enlazados por disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único tales como sdAb (ya sea VL o VH), dominios VHH de camélidos, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, tales como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra, y una CDR aislada u otros fragmentos de unión al epítipo de un anticuerpo. También se puede incorporar un fragmento de unión al antígeno en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, p. ej., Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión al antígeno también se pueden injertar en esqueletos de base polipeptídica tales como una fibronectina de tipo III (Fn3) (véase la patente de EE. UU. N.º: 6 703 199, que describe minicuerpos polipeptídicos de fibronectina).

El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en donde las regiones variables de cadena ligera y pesada están enlazadas de forma contigua, p. ej., a través de un conector sintético, p. ej., un conector polipeptídico flexible corto, y capaz de expresarse como un polipéptido monocatenario, y en donde el scFv conserva la especificidad del anticuerpo intacto del que procede. A menos que se especifique, tal como se utiliza en el presente documento, un scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, p. ej., con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender VL-conector-VH o puede comprender VH-conector-VL.

La porción de un CAR que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este puede existir en diversas formas en las que el dominio de unión al antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo monocatenario (scFv) y un anticuerpo

humanizado (Harlow *et al.*, 1999, En: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow *et al.*, 1989, En: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426). En una realización, el dominio de unión al antígeno de un CAR comprende un fragmento de anticuerpo. En una realización adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv. Los límites exactos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluidos los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.ª Ed. Public Health Service, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD (esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273,927-948 (esquema de numeración de "Chothia") o una combinación de estos.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" se refiere a una proteína, p. ej., una cadena de inmunoglobulina o fragmento de esta, que comprende al menos una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina. La expresión "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En una realización, una molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífico, p. ej., comprende una pluralidad de secuencias del dominio variable de inmunoglobulina, en donde una primera secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión por un primer epítipo y una segunda secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión por un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad por dos antígenos como máximo. Una molécula de anticuerpo biespecífico está caracterizada por una primera secuencia del dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión por un primer epítipo y una segunda secuencia del dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión por un segundo epítipo.

La expresión «región determinante de la complementariedad» o «CDR», tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables del anticuerpo que confieren especificidad y afinidad de unión por el antígeno. Por ejemplo, en general, hay tres CDR en cada región variable de la cadena pesada (p. ej., HCDR1, HCDR2, y HCDR3) y tres CDR en cada región variable de la cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3). Los límites exactos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluidos los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.ª Ed. Public Health Service, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD (esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) *JMB* 273,927-948 (esquema de numeración de "Chothia") o una combinación de estos. En algunas realizaciones, según el esquema de numeración de Kabat, los residuos aminoácidos de la CDR en el dominio variable de la cadena pesada (VH) tienen la numeración 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos aminoácidos de la CDR en el dominio variable de la cadena ligera (VL) tienen la numeración 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). En algunas realizaciones, según el esquema de numeración de Chothia, los aminoácidos de CDR en el VH se numeran 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos aminoácidos de CDR en el VL se numeran 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3). En algunas realizaciones, en un esquema de numeración combinado de Kabat y Chothia, las CDR corresponden a los residuos aminoácidos que forman parte de una CDR de Kabat, una CDR de Chothia o ambas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las CDR corresponden a los residuos aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en una VH, p. ej., una VH de mamífero, p. ej., una VH humana; y los residuos aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en una VL, p. ej., una VL de mamífero, p. ej., una VL humana.

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

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

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

La expresión "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago o un sistema de expresión en levaduras. También se debe entender que la expresión se refiere a un anticuerpo que ha sido generado por la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y donde la molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido

utilizando tecnología de ADN recombinante o de secuencias de aminoácidos que está disponible y es muy conocida en la técnica.

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

20 El término "autólogo" se refiere a cualquier material procedente del mismo individuo en el que se reintroducirá más tarde.

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

25 El término "xenogénico" se refiere a cualquier material procedente de un animal de una especie diferente.

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

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

35 La frase «enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral» como se describe en el presente documento incluye, entre otras, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento o una afección asociada con células que expresan un antígeno tumoral como se describe en el presente documento que incluye, p. ej., enfermedades proliferativas tales como un cáncer o una neoplasia maligna o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan un antígeno tumoral como se describe en el presente documento. En un caso, un cáncer asociado con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento es un cáncer hemático. En un caso, un cáncer asociado con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento es un cáncer sólido. Las enfermedades adicionales asociadas con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento incluyen, entre otros, p. ej., cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento. Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento incluyen, entre otras, p. ej., enfermedad autoinmunitaria (p. ej., lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes. En algunos casos, las células que expresan el antígeno tumoral expresan, o han expresado en algún momento, el ARNm que codifica el antígeno tumoral. En un caso, las células que expresan el antígeno tumoral producen la proteína del antígeno tumoral (p. ej., de tipo natural o mutante), y la proteína del antígeno tumoral puede estar presente en niveles normales o niveles reducidos. En un caso, las células que expresan el antígeno tumoral produjeron niveles detectables de una proteína antigénica tumoral en un punto y posteriormente no produjeron sustancialmente ninguna proteína antigénica tumoral detectable.

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

La frase "enfermedad asociada con la expresión de CD19" incluye, entre otras, una enfermedad asociada con la expresión de CD19 (p. ej., CD19 de tipo natural o mutante) o afección asociada con células que expresan, o han expresado en algún momento, CD19 (p. ej., CD19 de tipo natural o mutante) incluidas, p. ej., enfermedades proliferativas tales como un cáncer o neoplasia maligna o una afección precancerosa tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan CD19. Para evitar dudas, una enfermedad asociada con la expresión de CD19 puede incluir una afección asociada con células que actualmente no expresan CD19, p. ej., porque la expresión de CD19 ha disminuido de forma regulada, p. ej., debido al tratamiento con una molécula que tiene como diana CD19, p. ej., CAR CD19, pero que en algún momento expresó CD19. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 es un cáncer hemático. En un aspecto, el cáncer hemático es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 incluye cánceres y neoplasias malignas que incluyen, entre otras, p. ej., una o más leucemias agudas, que incluyen entre otras, p. ej., leucemia linfocítica aguda de linfocitos B (LLAB), leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (LLAT), leucemia linfocítica aguda (LLA); una o más leucemias crónicas que incluyen, entre otras, p. ej., leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC). Los cánceres hemáticos o las afecciones hemáticas adicionales asociados con la expresión de CD19, comprenden, entre otros, p. ej., leucemia prolinfocítica de linfocitos B, neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, tricoleucemia, linfoma folicular microcítico o macrocítico, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zonas marginales, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom y "preleucemia", que son un conjunto diverso de afecciones hemáticas que tienen en común la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y similares. Las enfermedades adicionales asociadas con la expresión de CD19 incluyen, entre otros, p. ej., cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD19. Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de CD19 incluyen, entre otras, p. ej., enfermedad autoinmunitaria (p. ej., lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes. En algunas realizaciones, las células que expresan CD19 expresan, o han expresado en algún momento, ARNm de CD19. En una realización, las células que expresan CD19 producen una proteína CD19 (p. ej., de tipo natural o mutante) y la proteína CD19 puede estar presente en niveles normales o niveles reducidos. En una realización, las células que expresan CD19 produjeron niveles detectables de una proteína CD19 en un momento y posteriormente sustancialmente no produjeron una proteína CD19 detectable.

La expresión "modificaciones de secuencia conservadoras" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran de manera significativa las características de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la divulgación mediante técnicas convencionales conocidas en este campo, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en las que el residuo aminoacídico se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos aminoacídicos dentro de un CAR descrito en el presente documento pueden ser reemplazados por otros residuos aminoacídicos de la misma familia de cadenas laterales y el CAR alterado se puede estudiar usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (p. ej., un complejo TCR/CD3 o CAR) con su ligando afín (o antígeno tumoral en el caso de un CAR) que media de este modo en un evento de transducción de señales, tal como, entre otros, la transducción de señales a través del complejo TCR/CD3

o la transducción de señales a través del receptor de NK adecuado o los dominios de señalización del CAR. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de ciertas moléculas.

5 La expresión "molécula estimuladora" se refiere a una molécula expresada por una célula inmunitaria (p. ej., linfocito T, linfocito NK, linfocito B) que proporciona la secuencia o las secuencias de señalización citoplasmática que regulan la activación de la célula inmunitaria de forma estimuladora para al menos algún aspecto de la ruta de señalización de las células inmunitarias. En un aspecto, la señal es una señal primaria que se inicia, por ejemplo, mediante la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, y que da lugar a la mediación de una respuesta de linfocitos T, que incluye, entre otros, proliferación, activación, diferenciación y similares. Una secuencia de señalización citoplasmática primaria (también denominada como «dominio de señalización primario») que actúa de manera estimuladora puede contener un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina o ITAM. Los ejemplos de una secuencia de señalización citoplasmática que contiene un ITAM que es de uso particular en la divulgación incluye, entre otras, las derivadas de CD3 zeta, FcR gamma común (FCER1G), Fc gamma RIIa, FcR beta (Fc epsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD79a, CD79b, DAP10 y DAP12. En un CAR específico utilizado en la invención, el dominio de señalización intracelular en uno o más cualesquiera CAR utilizados en la invención comprende una secuencia de señalización intracelular, p. ej., una secuencia de señalización primaria de CD3-zeta. En un CAR específico de uso en la invención, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada como la SEQ ID NO:9 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares. En un CAR específico de uso en la invención, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 10 o los restos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares.

25 La expresión «célula presentadora de antígenos» o «APC» se refiere a una célula del sistema inmunitario tal como una célula accesoria (p. ej., un linfocito B, una célula dendrítica y similares) que presenta un antígeno exógeno en complejo con complejos mayores de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) en su superficie. Los linfocitos T pueden reconocer estos complejos usando sus receptores de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés). Las APC procesan antígenos y los presentan a los linfocitos T.

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

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

50 Un dominio de señalización intracelular primario puede comprender un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina o ITAM. Los ejemplos de secuencias de señalización citoplasmática primaria que contienen ITAM incluyen, entre otras, las procedentes de CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, Cd79b, y CD66d, CD278 («ICOS»), FcεRI, CD66d, CD32, DAP10 y DAP12.

60 El término «zeta» o, como alternativa, «cadena zeta», «CD3-zeta» o «TCR-zeta» se define como la proteína proporcionada como N.º de acceso de GenBank BAG36664.1, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares, y un «dominio estimulador zeta» o, como alternativa, un «dominio estimulador de CD3-zeta» o un «dominio estimulador de TCR-zeta» se define como los residuos aminoacídicos del dominio citoplásmico de la cadena zeta que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de los linfocitos T. En un aspecto, el dominio citoplásmico de zeta comprende los residuos de 52 a 164 del n.º de acceso de GenBank BAG36664.1 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares, que son ortólogos funcionales de este. En un aspecto, el «dominio estimulador zeta» o un «dominio

estimulador de CD3-zeta» es la secuencia proporcionada como la SEQ ID NO:9. En un aspecto, el «dominio estimulador zeta» o un «dominio estimulador de CD3-zeta» es la secuencia proporcionada como la SEQ ID NO:10.

5 La expresión "molécula coestimuladora" se refiere al participante en la unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, y media de esta manera en una respuesta coestimuladora por parte del linfocito T, tal como, entre otras, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que contribuyen a una respuesta inmunitaria eficaz. Las moléculas coestimuladoras incluyen, entre otras, una molécula de MHC de clase I, una proteína receptora de TNF, una proteína de tipo inmunoglobulina, un receptor de citocinas, una integrina, una molécula de activación de linfocitos de señalización (proteína SLAM), un receptor de linfocitos NK activador, BTLA, un receptor de un ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, 10 CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, 15 ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se une específicamente con CD83. Un dominio de señalización intracelular coestimulador se refiere a la porción intracelular de una molécula coestimuladora. El dominio de señalización intracelular puede comprender la porción intracelular completa, o el dominio de señalización intracelular nativo completo, de la molécula de la que procede, o un fragmento funcional de este.

25 El término «4-1BB» se refiere a un miembro de la superfamilia de TNFR con una secuencia de aminoácidos proporcionada como el n.º de acceso de GenBank AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares; y un "dominio coestimulador de 4-1BB" se define como los residuos aminoacídicos 214-255 del n.º de acceso de GenBank AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares. En un aspecto, el «dominio coestimulador de 4-1BB» es la secuencia proporcionada como la SEQ ID NO:7 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares.

30 «Célula efectora inmunitaria», tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que está involucrada en una respuesta inmunitaria, p. ej., en la promoción de una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de células efectoras inmunitarias incluyen linfocitos T, p. ej., linfocitos T alfa/beta y linfocitos T gamma/delta, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales (NK), linfocitos T citolíticos naturales (NKT), mastocitos y fagocitos de origen mielóide.

35 La «función efectora inmunitaria o respuesta efectora inmunitaria», tal como se utiliza la expresión en el presente documento, se refiere a una función o respuesta, p. ej., de una célula efectora inmunitaria, que potencia o fomenta un ataque inmunitario de una célula diana. P. ej., una función o respuesta efectora inmunitaria se refiere a una propiedad de un linfocito T o NK que fomenta la destrucción o la inhibición del crecimiento o la proliferación de una célula diana. En el caso de un linfocito T, la estimulación primaria y la coestimulación son ejemplos de función o respuesta efectora 40 inmunitaria.

45 El término «codificar» se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (p. ej., ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de esta. Por lo tanto, un gen, ADNc o ARN codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Se puede hacer referencia tanto a la hebra codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y habitualmente se proporciona en listas de secuencias, como a la hebra no codificante, utilizada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, como la que codifica la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

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

55 El término «endógeno» se refiere a cualquier material de un organismo, célula, tejido o sistema o producido dentro de estos.

60 El término «exógeno» se refiere a cualquier material introducido desde fuera de un organismo, célula, tejido o sistema o producido fuera de estos.

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

5 La expresión «vector de transferencia» se refiere a una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede utilizar para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. En la técnica se conocen numerosos vectores que incluyen, entre otros, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por tanto, la expresión «vector de transferencia» incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. También debe interpretarse que la expresión incluye, además, compuestos no plasmídicos y no víricos que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, un compuesto de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores de transferencia vírica incluyen, entre otros, vectores adenovíricos, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y similares.

10 La expresión «vector de expresión» se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión ligadas operablemente a una secuencia de nucleótidos que se va a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en *cis* para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula hospedadora o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, incluidos cósmidos, plásmidos (p. ej., desnudos o contenidos en liposomas) y virus (p. ej., lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

20 El término «lentivirus» se refiere a un género de la familia *Retroviridae*. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus al ser capaces de infectar células que no se dividen; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética al ADN de la célula hospedadora, por lo que son uno de los métodos más eficaces de un vector de suministro de genes. El VIH, el VIS y el VIF son todos ejemplos de lentivirus.

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

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

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

60 «Completamente humana» se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde la molécula completa es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo o inmunoglobulina.

65 El término «aislado» significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está «aislado», pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o completamente de los materiales coexistentes en su estado natural está «aislado». Un ácido nucleico o una proteína

aislados pueden existir en forma sustancialmente purificada, o pueden existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

5 En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácido nucleico que se producen de manera habitual. «A» se refiere a adenosina, «C» se refiere a citosina, «G» se refiere a guanosina, «T» se refiere a timidina y «U» se refiere a uridina.

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

15 La expresión administración «parenteral» de una composición inmunógena incluye, p. ej., técnicas de inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, intratumoral o por infusión.

20 La expresión «ácido nucleico» o «polinucleótido» se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de estos, ya sea en forma mono- o bicatenaria. La expresión «ácido nucleico» incluye un gen, ADNc o un ARNm. En una realización, la molécula de ácido nucleico es sintética (p. ej., de síntesis química) o recombinante. A menos que se limite específicamente, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también engloba de forma implícita variantes modificadas de forma conservadora de esta (p. ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como también la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o su totalidad) se sustituyen con residuos de desoxiinosina y/o base mixta (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)).

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

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

50 La expresión «secuencia promotora/reguladora» se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es necesaria para la expresión de un producto génico que se liga operablemente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y, en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que son necesarios para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que exprese el producto génico de una manera específica para el tejido.

55 El término promotor «constitutivo» se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se liga operablemente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula en la mayoría o en todas las condiciones fisiológicas de la célula.

60 El término promotor «inducible» se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se liga operablemente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo cuando está presente en la célula un inductor que corresponde al promotor.

La expresión promotor «específico de tejido» se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se liga operablemente a un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

65

Las expresiones «antígeno paraneoplásico» o «antígeno tumoral» se refieren indistintamente a una molécula (normalmente una proteína, carbohidrato o lípido) que se expresa preferencialmente en la superficie de una célula cancerosa, ya sea en su totalidad o como un fragmento (p. ej., MHC/péptido), en comparación con una célula normal, y que es útil para el direccionamiento preferente de un agente farmacológico a la célula cancerosa. En algunas realizaciones, un antígeno paraneoplásico es una molécula de la superficie celular que se sobreexpresa en una célula cancerosa en comparación con una célula normal, por ejemplo, con una sobreexpresión de 1 vez, sobreexpresión de 2 veces, sobreexpresión de 3 veces o más en comparación con una célula normal. En algunas realizaciones, un antígeno paraneoplásico es una molécula de la superficie celular que se sintetiza de forma inapropiada en la célula cancerosa, por ejemplo, una molécula que contiene deleciones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en una célula normal. En algunas realizaciones, un antígeno paraneoplásico se expresará exclusivamente en la superficie celular de una célula cancerosa, en su totalidad o como un fragmento (p. ej., MHC/péptido), y no se sintetizará ni expresará en la superficie de una célula normal. En algunas realizaciones, los CAR para su uso en la presente invención incluyen CAR que comprenden un dominio de unión al antígeno (p. ej., anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un péptido presentado en MHC. Normalmente, los péptidos derivados de proteínas endógenas llenan las cavidades de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y son reconocidos por receptores de linfocitos T (TCR) en los linfocitos T CD8+. Los complejos MHC de clase I son expresados de manera constitutiva por todas las células nucleadas. En el cáncer, los complejos péptido/MHC específicos de un virus y/o específicos de un tumor representan una clase única de dianas de la superficie celular para la inmunoterapia. Se han descrito anticuerpos de tipo TCR que tienen como diana péptidos derivados de antígenos víricos o tumorales en el contexto del antígeno leucocitario humano (HLA)-A1 o HLA-A2 (véanse, p. ej., Sastry *et al.*, *J Virol.* 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva *et al.*, *Blood*, 2011 117(16):4262-4272; Verma *et al.*, *J Immunol* 2010 184(4):2156-2165; Willemsen *et al.*, *Gene Ther* 2001 8(21):1601-1608; Dao *et al.*, *Sci Transl Med* 2013 5(176):176ra33; Tassev *et al.*, *Cancer Gene Ther* 2012 19(2):84-100). Por ejemplo, se puede identificar un anticuerpo de tipo TCR cribando una colección, tal como una colección de presentación en fagos de scFv humano.

La expresión «conector polipeptídico flexible» o «conector», tal como se utiliza en el contexto de un scFv, se refiere a un conector peptídico que consiste en aminoácidos tales como residuos de glicina y/o serina utilizados solos o combinados, para enlazar regiones de la cadena pesada variable y ligera variable. En una realización, el conector polipeptídico flexible es un conector Gly/Ser y comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO: 22), donde n es un número entero positivo igual o superior a 1. Por ejemplo, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 y n=6, n=7, n=8, n=9 y n=10. En una realización, los conectores polipeptídicos flexibles incluyen, entre otros, (Gly₄ Ser)₄ (SEQ ID NO:27) o (Gly₄ Ser)₃ (SEQ ID NO:28). En otra realización, los conectores incluyen múltiples repeticiones de (Gly₂Ser), (GlySer) o (Gly₃Ser) (SEQ ID NO:29). En una realización, el conector es GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 104). También se incluyen dentro del alcance de la divulgación los conectores descritos en el documento WO2012/138475.

Tal como se utiliza en el presente documento, una caperuza en 5' (también denominada caperuza de ARN, caperuza de tipo 7-metilguanosina de ARN o una caperuza de tipo m⁷G de ARN) es un nucleótido de guanina modificado que se ha añadido a la parte «frontal» o extremo 5' de un ARN mensajero eucariótico poco después del inicio de la transcripción. La caperuza en 5' consiste en un grupo terminal que está enlazado al primer nucleótido transcrito. Su presencia es crucial para el reconocimiento por parte del ribosoma y la protección contra las ARNasas. La adición de la caperuza está acoplada a la transcripción, y se produce a la vez que la transcripción, de modo que cada una influye en la otra. Poco después del inicio de la transcripción, el extremo 5' del ARNm que está siendo sintetizado se une a un complejo sintetizador de la caperuza asociado con la ARN polimerasa. Este complejo enzimático cataliza las reacciones químicas que son necesarias para la generación de la caperuza del ARNm. La síntesis prosigue como una reacción bioquímica de múltiples pasos. El resto de adición de la caperuza se puede modificar para modular la funcionalidad del ARNm tal como su estabilidad o eficacia de traducción.

Tal como se utiliza en el presente documento, el «ARN transcrito *in vitro*» se refiere a ARN, preferentemente ARNm, que se ha sintetizado *in vitro*. Generalmente, el ARN transcrito *in vitro* se genera a partir de un vector de transcripción *in vitro*. El vector de transcripción *in vitro* comprende un molde que se utiliza para generar el ARN transcrito *in vitro*.

Tal como se utiliza en el presente documento, un «poli(A)» es una serie de adenosinas unidas por poliadenilación al ARNm. En la realización preferida de un constructo para la expresión transitoria, el poliA tiene entre 50 y 5000 (SEQ ID NO: 30), preferentemente más de 64, más preferentemente más de 100, de la manera más preferente más de 300 o 400. Las secuencias de poli(A) se pueden modificar por medios químicos o enzimáticos para modular la funcionalidad del ARNm, tal como la ubicación, estabilidad o eficacia de la traducción.

Tal como se utiliza en el presente documento, "poliadenilación" se refiere al enlace covalente de un resto de poliadenililo, o su variante modificada, a una molécula de ARN mensajero. En los organismos eucariotas, la mayoría de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) están poliadeniladas en el extremo 3'. La cola de poli(A) 3' es una secuencia larga de nucleótidos de adenina (a menudo varios cientos) añadidos al pre-ARNm a través de la acción de una enzima, la poliadenilato polimerasa. En las células eucariotas superiores, la cola poli(A) se añade a las transcripciones que contienen una secuencia específica, la señal de poliadenilación. La cola de poli(A) y la proteína unida a ella ayudan a proteger el ARNm de la degradación por parte de exonucleasas. La poliadenilación también es importante para la terminación de la transcripción, la exportación del ARNm del núcleo y la traducción. La poliadenilación se produce en el

núcleo inmediatamente después de la transcripción del ADN en ARN, pero adicionalmente también se puede producir más tarde en el citoplasma. Una vez terminada la transcripción, la cadena de ARNm se escinde mediante la acción de un complejo de endonucleasa asociado con la ARN·polimerasa. El sitio de escisión se caracteriza habitualmente por la presencia de la secuencia de bases AAUAAA cerca del sitio de escisión. Una vez que se ha escindido el ARNm, se añaden residuos de adenosina al extremo 3' libre en el sitio de escisión.

Tal como se utiliza en el presente documento, «transitorio» se refiere a la expresión de un transgén no integrado durante un periodo de horas, días o semanas, en donde el periodo de tiempo de expresión es inferior al periodo de tiempo para la expresión del gen si está integrado en el genoma o contenido dentro de un replicón de plásmido estable en la célula hospedadora.

La aféresis es el proceso en el cual se retira sangre completa de un individuo, se separa en componentes seleccionados y el resto se devuelve a la circulación. Por lo general, hay dos métodos para separar los componentes sanguíneos, el centrífugo y el no centrífugo. La leucaféresis da como resultado la selección activa y separación de los glóbulos blancos del paciente.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos «tratar», «tratamiento» y «que trata» se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno proliferativo, o la mejora de uno o más síntomas (preferentemente, uno o síntomas más perceptibles) de un trastorno proliferativo resultante de la administración de una o más terapias (p. ej., uno o más agentes terapéuticos tales como un CAR de la invención). En algunas realizaciones específicas, los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata" se refieren a la mejora de al menos un parámetro físico mensurable de un trastorno proliferativo tal como el crecimiento de un tumor, no necesariamente perceptible por el paciente. En otras realizaciones, los términos «tratar», «tratamiento» y «que trata» se refieren a la inhibición de la progresión de un trastorno proliferativo, ya sea físicamente, p. ej., mediante la estabilización de un síntoma perceptible, fisiológicamente mediante, p. ej., la estabilización de un parámetro físico, o ambos. En otras realizaciones, los términos «tratar», «tratamiento» y «que trata» se refieren a la reducción o estabilización del tamaño del tumor o el recuento de células cancerosas. No es necesario que el tratamiento sea de un 100 %, y en algunas realizaciones una reducción o retraso en al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % es suficiente para que se considere abarcado por estos términos.

"Refractario", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enfermedad, p. ej., cáncer, que no responde a un tratamiento. En algunas realizaciones, un cáncer refractario puede ser resistente a un tratamiento antes del o al comienzo del tratamiento. En otras realizaciones, el cáncer refractario puede volverse refractario durante un tratamiento.

El término "recaída", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la reaparición de una enfermedad (p. ej., cáncer) después de un periodo inicial de respuesta (p. ej., respuesta completa o respuesta parcial). El periodo inicial de respuesta puede implicar que el nivel de células cancerosas caiga por debajo de un determinado umbral, p. ej., por debajo de un 20 %, 1 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %. La reaparición puede implicar que el nivel de células cancerosas se eleve por encima de un determinado umbral, p. ej., por encima de un 20 %, 1 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %. La recaída se puede identificar, p. ej., utilizando los criterios de Cheson como se describen en Cheson *et al.*, *J Clin Oncol* 17:1244 (1999) y Cheson *et al.*, «Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma», *J Clin Oncol* 25:579-586 (2007). Por ejemplo, en el contexto de la LLA-B, la reaparición puede conllevar, p. ej., una reaparición de blastos en la sangre, médula ósea (>5 %) o cualquier sitio extramedular, después de una respuesta completa. Una respuesta completa, en este contexto, puede conllevar <5 % de blastos de MO. Más generalmente, en una realización, una respuesta (p. ej., respuesta completa o respuesta parcial) puede conllevar la ausencia de EMR (enfermedad mínima residual) detectable. En una realización, el periodo inicial de respuesta dura al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días; al menos 1, 2, 3 o 4 semanas; al menos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 12 meses; o al menos 1, 2, 3, 4 o 5 años.

La expresión «ruta de transducción de señales» se refiere a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señales que desempeñan una función en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. La expresión «receptor de la superficie celular» incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitir la señal a través de la membrana de una célula.

El término «sujeto» pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (p. ej., mamíferos, seres humanos).

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

En el contexto de la presente invención, «antígeno tumoral» o «antígeno de un trastorno hiperproliferativo» o «antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo» se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos

específicos. En ciertos casos, el antígeno tumoral procede de un cáncer incluidos, entre otros, melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y similares.

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

La expresión «se une específicamente» se refiere a un anticuerpo, o un ligando, que reconoce una proteína que es un compañero de unión afín y se une a esta (p. ej., una molécula estimuladora y/o coestimuladora presente en un linfocito T) presente en una muestra, pero donde el anticuerpo o ligando no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en la muestra.

Intervalos: a lo largo de esta divulgación, se pueden presentar en un formato de intervalo diversos aspectos de la invención. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no se debe interpretar como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo divulga específicamente todos los posibles subintervalos, así como también los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 divulga específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como también números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Como otro ejemplo, un intervalo tal como un 95-99 % de identidad, incluye algo con un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, e incluye subintervalos tales como un 96-99 %, 96-98 %, 96-97 %, 97-99 %, 97-98 % y 98-99 % de identidad. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Terapias

En un aspecto, la divulgación proporciona el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral descrito en el presente documento.

En un aspecto, la presente divulgación describe el tratamiento de un cáncer (p. ej. un cáncer hemático tal como LLA o LLC) suministrando al sujeto que las necesita células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) que se modifican para expresar un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento. En un caso, el cáncer que se va a tratar es una neoplasia maligna de linfocitos B. En un caso, el cáncer que se va a tratar es LLA (leucemia linfoblástica aguda), LLC (leucemia linfocítica crónica), LDLBG (linfoma difuso de linfocitos B grandes), LCM (linfoma de células del manto) o MM (mieloma múltiple).

En un aspecto, la invención se refiere al tratamiento de un cáncer que es una leucemia tal como LLA y LLC, proporcionando al sujeto que las necesita células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) que se modifican para expresar un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., CAR CD19, en donde las células cancerosas expresan CD19. En una realización, el cáncer que se va a tratar es una neoplasia maligna de linfocitos B. En una realización, el cáncer que se va a tratar es LLA (leucemia linfoblástica aguda) o LLC (leucemia linfocítica crónica).

La divulgación incluye un tipo de terapia celular donde las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) se modifican genéticamente (p. ej., mediante la transducción de un vector lentivírico) para expresar un CAR y se infunde la célula que expresa CAR al receptor que lo necesita. La célula infundida puede destruir las células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células efectoras inmunitarias modificadas con CAR (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) son capaces de replicarse *in vivo* lo que da lugar a una persistencia a largo plazo que puede conllevar un control tumoral sostenido. Las células que expresan CAR (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) generadas utilizando vectores lentivíricos tendrán una expresión estable de CAR. En diversos aspectos, las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) que se administran al paciente, o su descendencia, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración del linfocito T al paciente.

La invención también incluye un tipo de terapia celular donde las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) se modifican, p. ej., mediante ARN transcrito *in vitro*, para expresar de manera transitoria un CAR y la célula que expresa CAR se infunde a un receptor que lo necesite. Las células que expresan CAR (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) generadas mediante la transducción de ARN de CAR (p. ej., mediante transfección o electroporación) expresan de manera transitoria CAR del ARN durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días después de la transducción. La célula infundida puede destruir las células tumorales en el receptor. Por tanto, en diversos aspectos, las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) administradas al paciente están presentes durante menos de un mes, p. ej., tres semanas, dos semanas, una semana, después de la administración del linfocito T al paciente.

- 5 En un caso, la presente divulgación proporciona el tratamiento de un cáncer (p. ej. un cáncer hemático tal como LLA y LLC) suministrando al sujeto que las necesita células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) que se modifican para expresar un CAR que de manera específica actúa o se une a un antígeno tumoral (o antígeno paraneoplásico) descrito en el presente documento. En otro caso más, el tratamiento incluye alterar la fabricación de una célula que expresa CAR para enriquecer en linfocitos T vírgenes, p. ej., como se describe en el presente documento.
- 10 En un caso, las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) se modifican para expresar CAR CD19, para tratar a un sujeto que padece cáncer (p. ej., un cáncer hemático tal como LLA y LLC), en donde las células cancerosas expresan CD19. En la invención, el cáncer es una leucemia. En una realización, el cáncer que se va a tratar es LLA o LLC. Las moléculas de CAR CD19 que se van a expresar en una célula efectora inmunitaria pueden comprender cualquier dominio de unión al antígeno anti-CD19 de la técnica (p. ej., los proporcionados en la **Tabla 1 o 4**) en combinación con cualquiera de los dominios CAR descritos en el presente documento para generar un constructo de CAR completo. Por ejemplo, el constructo de CAR completo es un CAR enumerado en la **Tabla 4**. La **Tabla 4** proporciona los constructos de CAR CD19 completos generados utilizando los diversos dominios CAR (p. ej., dominios de señalización intracelular y transmembrana) descritos en el presente documento y los dominios de unión al antígeno anti-CD19 enumerados en la **Tabla 1 o 4**. Las secuencias de aminoácidos se designan (aa) y las secuencias de ácido nucleico se designan (nt).
- 20 En un aspecto, la divulgación proporciona el tratamiento de un cáncer, p. ej., un cáncer asociado con la expresión de CD19 con una terapia con células que expresan CAR (p. ej., linfocito T, linfocito NK). En la invención, el cáncer es una leucemia. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, entre otros, p. ej., una o más leucemias agudas incluidas, entre otras, p. ej., LLA-B, LLA-T, LLA; una o más leucemias crónicas incluidas, entre otras, p. ej., leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC).
- 25 Otros cánceres hemáticos o afecciones hemáticas que se pueden tratar con los métodos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, p. ej., leucemia promielocítica de linfocitos B, neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, tricoleucemia, linfoma folicular microcítico o macrocítico, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zonas marginales, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoide, macroglobulinemia de Waldenstrom y "preleucemia", que son un conjunto diverso de afecciones hemáticas que tienen en común la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y similares.
- 30 Las afecciones hemáticas mencionadas anteriormente pueden estar asociadas con la expresión de CD19. Además, una enfermedad asociada con la expresión de CD19 incluye, entre otros, p. ej., cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD19.
- 35 En una realización, la población de células efectoras inmunitarias es para su uso en métodos para tratar LLC.
- 40 En otra realización, la población de células efectoras inmunitarias es para su uso en métodos para tratar LLA.
- En otra realización, la población de células efectoras inmunitarias es para su uso en métodos para tratar LLA-B.
- 45 En un aspecto, la divulgación proporciona el tratamiento de un sujeto que padece cáncer (p. ej., un cáncer hemático tal como LLA y LLC con una célula que expresa CAR (p. ej., linfocito T, linfocito NK) (p. ej., una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK) como se describe en el presente documento, tal como, p. ej., CTL019). En una realización, el sujeto se puede tratar con una célula que expresa CAR (p. ej., linfocito T, linfocito NK) en combinación con otro agente terapéutico, p. ej., otro agente terapéutico descrito en el presente documento (p. ej., otro CAR, p. ej., otro CAR descrito en el presente documento, un CAR inhibidor, p. ej., un CAR inhibidor descrito en el presente documento; una quimioterapia; un inhibidor de cinasas (p. ej., un inhibidor de cinasas descrito en el presente documento, p. ej., un inhibidor de mTOR, un inhibidor de BTK), un inhibidor de un punto de control, p. ej., un inhibidor de un punto de control descrito el presente documento, una terapia de referencia, etc.). La combinación puede ser, p. ej., con cualquier agente descrito en el presente documento.
- 50 En algunas realizaciones, el tratamiento de un cáncer en un sujeto comprende administrar una terapia con CAR como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más ciclos de quimioterapia. En las realizaciones, los ciclos de ejemplo de la quimioterapia incluyen la inducción, consolidación, mantenimiento intermedio, intensificación retrasada y mantenimiento.
- 55 En algunas realizaciones, un primer ciclo de quimioterapia es la inducción, en la que el objetivo es eliminar tantas células cancerosas como sea posible. En las realizaciones, los sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA), un ciclo de inducción comprende el tratamiento con uno o más fármacos, tales como vincristina, dexametasona y/o polietilenglicol (PEG)-L-asparaginasa. En una realización, en los sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA de riesgo estándar), un ciclo de inducción comprende tratamiento con vincristina, dexametasona y PEG-L-asparaginasa, p. ej., con dosis de 6 mg/m², 6 mg/m² y 2500 U/m², respectivamente. En una realización, en los sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p.

ej., LLA de riesgo alto), un ciclo de inducción comprende tratamiento con vincristina, dexametasona, PEG-L-asparaginasa y daunorrubicina, p. ej., con dosis de 6 mg/m², 6 mg/m², 2500 U/m² y 100 mg/m², respectivamente.

5 En las realizaciones, un ciclo adicional de quimioterapia es de consolidación, en el que el objetivo es destruir cualesquiera células cancerosas restantes. En algunas realizaciones, se da el ciclo de consolidación a un paciente después de conseguir la remisión después del ciclo de inducción. En las realizaciones, en los sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA), un ciclo de consolidación comprende el tratamiento con uno o más fármacos, tales como vincristina, 6-mercaptapurina, ciclofosfamida, citarabina y/o PEG-L-asparaginasa. En una realización, en sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA de riesgo estándar), un ciclo de consolidación comprende el tratamiento con vincristina y 6-mercaptapurina, p. ej., con dosis de 1,5 mg/m² y 75 mg/m², respectivamente. En una realización, en sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA de riesgo alto) un ciclo de consolidación comprende el tratamiento con vincristina, 6-mercaptapurina, ciclofosfamida, citarabina y PEG-L-asparaginasa, p. ej., a dosis de 1,5 mg/m², 60 mg/m², 1 g/m², 75 mg/m² y 2500 mg/m², respectivamente.

15 En las realizaciones, un ciclo adicional de quimioterapia comprende un ciclo de mantenimiento, en el que el objetivo es reducir el riesgo a largo plazo de recaída en el cáncer, o un ciclo de mantenimiento intermedio, en el cual el objetivo es proporcionar un descanso del tratamiento intensivo. En las realizaciones, se realiza un ciclo de mantenimiento intermedio después de la inducción y, en algunos casos, después de la consolidación. En las realizaciones, se realiza un ciclo de mantenimiento intermedio antes de un ciclo de intensificación retrasado. En algunas realizaciones, se realiza un ciclo de mantenimiento intermedio después de un ciclo de intensificación retrasado. En las realizaciones, un ciclo de mantenimiento es el último ciclo de la quimioterapia, p. ej., después de la inducción, consolidación, mantenimiento intermedio y/o intensificación retrasada. En algunas realizaciones, en sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA de riesgo estándar), un ciclo de mantenimiento intermedio comprende tratamiento con vincristina y metotrexato, p. ej., a dosis de 7,5 mg/m² y 500 mg/m², respectivamente. En algunas realizaciones, en sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA de riesgo alto) un ciclo de mantenimiento intermedio comprende el tratamiento con vincristina, metotrexato y 6-mercaptapurina, p. ej., a dosis de 7,5 mg/m², 20 mg/m² y 25 mg/m², respectivamente. En las realizaciones, los sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA de riesgo estándar), un ciclo de mantenimiento comprende el tratamiento con vincristina, dexametasona, 6-mercaptapurina y metotrexato, p. ej., a dosis de 1,5 mg/m², 6 mg/m², 75 mg/m² y 20 mg/m², respectivamente. En las realizaciones, en los sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA de riesgo alto) un ciclo de mantenimiento comprende el tratamiento con vincristina, prednisona, 6-mercaptapurina y metotrexato, p. ej., a dosis de 1,5 mg/m², 40 mg/m², 75 mg/m² y 20 mg/m², respectivamente.

35 En las realizaciones, un ciclo adicional de quimioterapia comprende un ciclo de intensificación retrasado, en el que el objetivo es eliminar cualesquiera células cancerosas restantes. En las realizaciones, un ciclo de intensificación retrasado se realiza después de un ciclo de consolidación y, p. ej., después de un ciclo de mantenimiento intermedio. En las realizaciones, en los sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA de riesgo estándar), un ciclo de intensificación retrasado comprende el tratamiento con vincristina, dexametasona, doxorubicina, PEG-L-asparaginasa, ciclofosfamida, citarabina y 6-tioguanina, p. ej., a dosis de 4,5 mg/m², 10 mg/m², 75 mg/m², 2500 U/m², 1 g/m², 60 mg/m² y 60 mg/m², respectivamente. En las realizaciones, en sujetos que padecen leucemia (p. ej., LLA, p. ej., LLA de riesgo alto), un ciclo de intensificación retrasada comprende tratamiento con vincristina, dexametasona, doxorubicina, PEG-L-asparaginasa, ciclofosfamida, citarabina y 6-tioguanina, p. ej., con dosis de 7,5 mg/m², 10 mg/m², 75 mg/m², 5000 U/m², 1 g/m², 60 mg/m² y 60 mg/m², respectivamente.

45 En algunas realizaciones, se trata a un sujeto con intensidades variables de pautas quimioterápicas en función de medidas de riesgo, p. ej., para maximizar la supervivencia a la vez que se minimiza la toxicidad. En las realizaciones, se clasifica a un sujeto, p. ej., con LLA (p. ej., LLA pediátrico) en un grupo de riesgo estándar o riesgo alto, p. ej., en función del recuento de glóbulos blancos y de la edad, p. ej., basándose en la clasificación de grupos de riesgo del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés). Véase, p. ej., Smith *et al. J. Clin. Oncol.* 14.1(1996): 18-24. Por ejemplo, se clasifica a un sujeto en un grupo de riesgo estándar si el recuento de glóbulos blancos es inferior a 50 000 células por microlitro y el sujeto tiene de 1 a 10 años. Por ejemplo, se clasifica a un sujeto en un grupo de riesgo alto si el recuento de glóbulos blancos es de 50 000 células por microlitro o superior y/o el sujeto tiene 10 años de edad o más. En las realizaciones, se clasifica a un sujeto, p. ej., con LLA (p. ej., LLA pediátrico), en un grupo de riesgo muy alto como se describe en Möriche *et al. Blood* 111.9(2008):4477-89; y Pui *et al. Blood* 92.2(1998):411-5. Por ejemplo, los sujetos con LLA que tienen una o más de las siguientes características se clasifican como LLA de riesgo muy alto: un sujeto que es un lactante; un sujeto con anomalías citogenéticas adversas (p. ej., t(9;22), reordenamientos del gen MLL y baja hipodiploidia (<44 cromosomas); un sujeto que tiene una respuesta temprana lenta a la terapia inicial; un sujeto que tiene un nivel de enfermedad mínima residual (EMR) al final de un ciclo de inducción o en ciclos posteriores; un sujeto con enfermedad morfológicamente persistente después de un ciclo de inducción.

60 En una realización, el tratamiento de referencia para LLC incluye, entre otras, las terapias a modo de ejemplo descritas en el presente documento, p. ej., descritas en la **Tabla 5**, y combinaciones de estas.

Tabla 5: Terapias a modo de ejemplo para LLC

Primera línea ≥ 70 años con enfermedades asociadas	sin del(11q) o del(17p)	del(17p)	del(11q)
Obinutuzumab + clorambucilo	X	X	X
Rituxán + clorambucilo	X		X
Rituxán	X		
Clorambucilo	X		
Fludarabina± Rituxán	X	X	
Cladribina	X		
Bendamustina ± Rituxán	X		X
PCR (pentostatina, ciclofosfamida, Rituxán)	X		X
Primera línea < 70 años sin enfermedades asociadas significativas			
FCR (Fludarabina, ciclofosfamida, Rituxán)		X	X X
FR (Fludarabina, Rituxán)		X	X
PCR		X	X
Bendamustina ± Rituxán		X	X
Obinutuzumab + clorambucilo		X	X X

Segunda línea - Recaída/Refractario ≥ 70 años			
Imbruvica	X	X	X
FCR de dosis reducida	X		X
PCRR de dosis reducida	X		X
Bendamustina ± Rituxán	X		X
Ofatumumab	X	X	X
Alemutuzumab + Rituxán	X	X	X
Dosis alta de metilprednisona (HDMP) + rituximab	X	X	X
Lenalidomida + Rituxán	X	X	X
Rituximab de dosis densa	X		X
Segunda línea - Recaída/refractario < años sin enfermedades asociadas significativas			
Imbruvica	X	X	X
FCR (Fludarabina, ciclofosfamida, Rituxán)	X		X
PCR	X		X
Bendamustina ± Rituxán	X		X
Fludarabina + alemtuzumab	X		X
R-CHOP (Rituxán, ciclofosfamida, dosorrubicina, vincristina, prednisona)	X	X	X
Ofatumumab	X	X	X
OFAR (oxaliplatino, Fludara, citarabina, Rituxán)	X	X	X
HDMP + rituximab	X	X	X
Lenalidomida + Rituxán	X	X	X

5 En una realización, el tratamiento de referencia para LLC incluye (1) radioterapia, (2) quimioterapia, (3) cirugía (p. ej., extirpación del bazo), (4) terapia dirigida, (5) trasplante de células madre y combinaciones de estos. En una realización, el tratamiento de referencia comprende radioterapia externa. En una realización, el tratamiento de referencia comprende radioterapia interna (p. ej., sustancia radiactiva sellada en agujas, guías o catéteres, por ejemplo, que se colocan directamente en el cáncer o cerca de este).

En una realización, el tratamiento de referencia para LLA incluye, entre otras, las terapias a modo de ejemplo descritas en el presente documento, p. ej., descritas en la **Tabla 6**, y combinaciones de estas.

5 **Tabla 6: Terapias a modo de ejemplo para LLA**

Primera línea
RCHOP (Rituxán, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona)
RCHOP de dosis densa (categoría 3)
EPOCH con dosis ajustada (etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina) + Rituxán
Terapia de primera línea para sujetos con función ventricular izquierda deficiente o muy frágil
RCEPP (rituximab, ciclofosfamida, etopósido, prednisona, procarbazona)
RCEOP (rituximab, ciclofosfamida, etopósido, vincristina, prednisona)
RCNOP (rituximab, ciclofosfamida, mitoxantrona, vincristina, prednisona)
RCEOP (rituximab, ciclofosfamida, etopósido, vincristina, prednisona)
EPOCH con dosis ajustada (etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina) + Rituxán
Segunda línea - proceder a terapia con dosis elevada con rescate con células madre autólogas
DHAP (dexametasona, cisplatino, citarabina) ± Rituxán
ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina, cisplatino) ± Rituxán
GDP (gemcitabina, dexametasona, cisplatino) ± Rituxán
GemOx (gemcitabina, oxaliplatino) ± Rituxán
ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido) + Rituxán
MINE (mesna, ifosfamida, mitoxantrona, etopósido) ± Rituxán
Terapia de segunda línea (no son candidatos para terapia con dosis elevada)
CEPP (ciclofosfamida, etopósido, prednisona, procarbazona) ± Rituxán
CEOP (ciclofosfamida, etopósido, vincristina, prednisona) ± Rituxán
DA-EPOCH ± Rituxán
Revlimid ± Rituxán
Rituxán
GemOx ± Rituxán
GDP ± Rituxán
Bendamustina + Rituxán

10 En una realización, el tratamiento de referencia para LLA incluye (1) quimioterapia, (2) radioterapia, (3) trasplante de células madre, (4) terapia biológica, (5) terapia dirigida y combinaciones de estos.

15 En una realización, el tratamiento referencia incluye, entre otros, fludarabina con ciclofosfamida (FC); fludarabina con rituximab (FR); fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR); ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (CHOP); y combinaciones de estos. Los agentes quimioterápicos generales considerados para su uso incluyen, entre otros, anastrozol (Arimidex[®]), bicalutamida (Casodex[®]), sulfato de bleomicina (Blenoxane[®]), busulfán (Myleran[®]), busulfán para inyección (Busulfex[®]), capecitabina (Xeloda[®]), N4-pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin[®]), carmustina (BiCNU[®]), clorambucilo (Leukeran[®]), cisplatino (Platino[®]), cladribina (Leustatin[®]), ciclofosfamida (Cytosan[®] o Neosar[®]), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar-U[®]), citarabina en liposomas para inyección (DepoCyt[®]), dacarbazina (DTIC-Dome[®]), dactinomicina (actinomicina D, Cosmegan), clorhidrato de daunorrubicina (Cerubidine[®]), citrato de daunorrubicina en liposomas para inyección (DaunoXome[®]), dexametasona, docetaxel (Taxotere[®]), clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin[®], Rubex[®]), etopósido (Vepesid[®]), fosfato de fludarabina (Fludara[®]), 5-fluorouracilo (Acrucil[®], Efudex[®]), flutamida (Eulexin[®]), tezacicitabina, Gemcitabina (difluorodesoxicidina), hidroxurea (Hydrea[®]), Idarrubicina (Idamycin[®]), ifosfamida (IFEX[®]), irinotecán (Camptosar[®]), L-asparaginasa (ELSPAR[®]), leucovorina de calcio, melfalán

(Alkeran[®]), 6-mercaptopurina (Purinethol[®]), metotrexato (Folex[®]), mitoxantrona (Novantrone[®]), mylotarg, paclitaxel (Taxol[®]), phoenix (Itrio90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosán 20 con implante de carmustina (Gliadel[®]), citrato de tamoxifeno (Nolvadex[®]), tenipósido (Vumon[®]), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone[®]), clorhidrato de topotecán para inyección (Hycamptin[®]), vinblastina (Velban[®]), vincristina (Oncovin[®]), vinorelbina (Navelbine[®]), y combinaciones de estos.

En una realización, la quimioterapia comprende un antimetabolito incluidos, entre otros, antagonistas del ácido fólico (también denominados en el presente documento antifolatos), análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de la adenosina desaminasa): metotrexato (Rheumatrex[®], Trexall[®]), 5-fluorouracilo (Adrucil[®], Efudex[®], Fluoroplex[®]), floxuridina (FUDF[®]), citarabina (Cytosar-U[®], Tarabina PFS), 6-mercaptopurina (Puri-Nethol[®]), 6-tioguanina (Thioguanine Tabloid[®]), fosfato de fludarabina (Fludara[®]), pentostatina (Nipent[®]), pemetrexed (Alimta[®]), raltitrexed (Tomudex[®]), cladribina (Leustatin[®]), clofarabina (Clofarex[®], Clolar[®]), citarabina liposómica (también conocida como Ara-C Liposómica, DepoCyt[™]); decitabina (Dacogen[®]); hidroxiaurea (Hydrea[®], Droxia[™] y Mylocel[™]); mercaptopurina (Puri-Nethol[®]), pralatrexato (Foloty[™]); capecitabina (Xeloda[®]), nelarabina (Arranon[®]), azacitidina (Vidaza[®]) y gemcitabina (Gemzar[®]). Los antimetabolitos preferidos incluyen, p. ej., 5-fluorouracilo (Adrucil[®], Efudex[®], Fluoroplex[®]), floxuridina (FUDF[®]), capecitabina (Xeloda[®]), pemetrexed (Alimta[®]), raltitrexed (Tomudex[®]) y gemcitabina (Gemzar[®]), y combinaciones de estos. En una realización, el análogo de purina es fludarabina.

En una realización, la quimioterapia comprende un agente alquilante que incluye, entre otros, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, alquilsulfonatos, nitrosoureas y triazenos, mostaza de uracilo (Aminouracil Mustard[®], Chlorethaminacil[®], Demethylodopan[®], Desmethylodopan[®], Haemanthamine[®], Nordopan[®], Uracil nitrogen mustard[®], Uracilost[®], Uracilmostaza[®], Uramustin[®], Uramustine[®]), clorometina (Mustargen[®]), ciclofosfamida (Cytosan[®], Neosar[®], Clafen[®], Endoxan[®], Procytox[®], Revimmune[™]), ifosfamida (Mitoxana[®]), melfalán (Alkeran[®]), clorambucilo (Leukeran[®]), pipobromán (Amedel[®], Vercyte[®]), trietilenmelamina (Hemel[®], Hexalen[®], Hexastat[®]), trietilentioposforamina, temozolomida (Temodar[®]), tiotepa (Thioplex[®]), busulfán (Busilvex[®], Myleran[®]), carmustina (BiCNU[®]), lomustina (CeeNU[®]), estreptozocina (Zanosar[®]) y Dacarbazina (DTIC-Dome[®]) y combinaciones de estos. Los agentes alquilantes a modo de ejemplo adicionales incluyen, entre otros, Oxaliplatino (Eloxatin[®]); Temozolomida (Temodar[®] y Temodal[®]); Dactinomomicina (también conocida como actinomomicina-D, Cosmegen[®]); Melfalán (también conocido como L-PAM, L-sarcolisina y mostaza de fenilalanina, Alkeran[®]); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen[®]); Carmustina (BiCNU[®]); Bendamustina (Treanda[®]); Busulfán (Busulfex[®] y Myleran[®]); Carboplatino (Paraplatin[®]); Lomustina (también conocida como CCNU, CeeNU[®]); Cisplatino (también conocido como CDDP, Platino[®] y Platino[®]-AQ); Clorambucilo (Leukeran[®]); Ciclofosfamida (Cytosan[®] y Neosar[®]); Dacarbazina (también conocida como DTIC, DIC e imidazol carboxamida, DTIC-Dome[®]); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen[®]); Ifosfamida (Ifex[®]); Prednumustina; Procarbazina (Matulane[®]); Mecloretamina (también conocida como mostaza nitrogenada, mustina y clorhidrato de mecloretamina, Mustargen[®]); Estreptozocina (Zanosar[®]); Tiotepa (también conocido como tiofosfamida, TESP A y TSPA, Thioplex[®]); Ciclofosfamida (Endoxan[®], Cytosan[®], Neosar[®], Procytox[®], Revimmune[®]); Bendamustina HCl (Treanda[®]) y combinaciones de estos. En una realización, el agente alquilante es bendamustina. En una realización, el agente alquilante es ciclofosfamida.

En una realización, el agente quimioterápico es un inhibidor de cinasas, p. ej., un inhibidor de tirosina cinasas incluidos, entre otros, clorhidrato de erlotinib (Tarceva[®]); linifanib (*N*-[4-(3-amino-1*H*-indazol-4-il)fenil]-*N'*-(2-fluoro-5-metilfenil)urea, también conocida como ABT 869, que se puede adquirir de Genentech); malato de sunitinib (Sutent[®]); bosutinib (4-[[2,4-dicloro-5-metoxifenil]amino]-6-metoxi-7-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propoxi]quinolin-3-carbonitrilo, también conocido como SKI-606, y descrito en la Patente de EE. UU. N.º 6 780 996); dasatinib (Sprycel[®]); pazopanib (Votrient[®]); sorafenib (Nexavar[®]); zactima (ZD6474); e imatinib o mesilato de imatinib (Gilevec[®] y Gleevec[®]). En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de BTK seleccionado entre ibrutinib (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13. En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de CDK4 seleccionado entre aloisina A; flavopiridol o HMR-1275, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3*S*,4*R*)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-4-cromenona; crizotinib (PF-02341066); 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(2*R*,3*S*)-2-(hidroximetil)-1-metil-3-pirrolidinil]-4*H*-1-benzopirran-4-ona, clorhidrato (P276-00); 1-metil-5-[[2-[5-(trifluorometil)-1*H*-imidazol-2-il]-4-piridinil]oxi]-*N*-[4-(trifluorometil)fenil]-1*H*-bencimidazol-2-amina (RAF265); indisulam (E7070); roscovitina (CYC202); palbociclib (PD0332991); dinaciclib (SCH727965); *N*-[5-[[5-*tert*-butiloxazol-2-il]metil]tio]tiazol-2-il]piperidin-4-carboxamida (BMS 387032); ácido 4-[[9-cloro-7-(2,6-difluorofenil)-5*H*-pirimido[5,4-*d*][2]benzazepin-2-il]amino]benzoico (MLN8054); 5-[3-(4,6-difluoro-1*H*-bencimidazol-2-il)-1*H*-indazol-5-il]-*N*-etil-4-metil-3-piridinmetanamina (AG-024322); *N*-(piperidin-4-il)amida del ácido 4-(2,6-diclorobenzoilamino)-1*H*-pirazol-3-carboxílico (AT7519); 4-[2-metil-1-(1-metiletil)-1*H*-imidazol-5-il]-*N*-[4-(metilsulfonyl)fenil]-2-pirimidinamina (AZD5438); y XL281 (BMS908662). En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de MNK seleccionado entre CGP052088; 4-amino-3-(*p*-fluorofenilamino)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina (CGP57380); cercosporamida; ETC-1780445-2; y 4-amino-5-(4-fluoroanilino)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina.

En una realización, la terapia dirigida incluye, entre otros, un anticuerpo anti-CD20 o fragmento funcional de este, tal como, p. ej., rituximab (Riuxan[®] y MabThera[®]); tositumomab (Bexxar[®]); y ofatumumab (Arzerra[®]), y combinaciones de estos. En una realización, la terapia dirigida incluye, entre otros, un anticuerpo anti-CD52 o fragmento funcional de este tal como, p. ej., alemtuzumab (Campath[®]).

En una realización, la terapia biológica comprende inmunoterapia. Las antraciclinas de ejemplo incluyen, entre otras, doxorubicina (Adriamycin® y Rubex®); bleomicina (lenoxano®); daunorrubicina (clorhidrato de dauorrubicina, daunomicina y clorhidrato de rubidomicina, Cerubidine®); daunorrubicina liposómica (liposoma de citrato de daunorrubicina, DaunoXome®); mitoxantrona (DHAD, Novantrone®); epirubicina (Ellence™); idarrubicina (Idamycin®, Idamycin PFS®); mitomicina C (Mutamycin®); geldanamicina; herbimicina; ravidomicina; desacetilravidomicina y combinaciones de estas.

En una realización, el trasplante de células madre comprende un trasplante de células madre autógenas. En una realización, el trasplante de células madre comprende un trasplante de células madre alogénicas. En una realización, el trasplante de células madre comprende un trasplante de médula ósea alogénica. En una realización, el trasplante de células madre comprende un trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH). En una realización, las células madre hematopoyéticas proceden de diversos tejidos incluidos, entre otros, médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical y combinaciones de estas.

En un aspecto, la divulgación proporciona el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de CD19. En un aspecto, la divulgación proporciona el tratamiento de una enfermedad en donde parte del tumor es negativo para CD19 y parte del tumor es positivo para CD19. Por ejemplo, los métodos proporcionados son útiles para tratar sujetos que han sido sometidos a tratamiento por una enfermedad asociada con una expresión elevada de CD19, en donde el sujeto que ha sido sometido a tratamiento por niveles elevados de CD19 exhibe una enfermedad asociada con niveles elevados de CD19.

En un aspecto, los métodos proporcionados comprenden un vector que comprende un CAR CD19 ligado operablemente a un promotor para la expresión en células de mamífero (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK). En un aspecto, los métodos proporcionados comprenden una célula recombinante (p. ej., linfocito T o linfocito NK) que expresa un CAR CD19 para su uso en el tratamiento de tumores que sobreexpresan CD19, en donde el linfocito T recombinante que expresa el CAR CD19 se denomina célula que expresa CAR CD19. En un aspecto, una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., Linfocito T, linfocito NK) administrada de acuerdo con los métodos proporcionados es capaz de poner en contacto una célula tumoral con al menos un CAR CD19 expresado en su superficie de modo que la célula que expresa el CAR se dirige a la célula tumoral y se inhibe el crecimiento del tumor.

En un aspecto, la divulgación presenta un método para inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa CD19, que comprende poner en contacto la célula tumoral con una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK) descrita en el presente documento de modo que la célula que expresa CAR se activa en respuesta al antígeno y se dirige a la célula cancerosa, en donde se inhibe el crecimiento del tumor.

En un aspecto, la divulgación incluye un tipo de terapia celular donde los linfocitos T se modifican genéticamente para expresar un CAR y la célula que expresa CAR (p. ej., linfocito T, linfocito NK) se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede destruir las células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células modificadas con un CAR (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) son capaces de replicarse *in vivo* lo que da como resultado una persistencia a largo plazo que puede conllevar un control sostenido del tumor. En diversos aspectos, las células administradas al paciente, o su descendencia, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración de la célula al paciente.

La divulgación también incluye un tipo de terapia celular donde las células (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) están modificadas, p. ej., mediante ARN transcrito *in vitro*, para expresar de manera transitoria un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula que expresa el CAR (p. ej., linfocito T o linfocito NK) se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede destruir las células tumorales en el receptor. Por lo tanto, en varios aspectos, las células administradas al paciente están presentes durante menos de un mes, p. ej., tres semanas, dos semanas, una semana, después de la administración de la célula (p. ej., linfocito T, linfocito NK) al paciente.

Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, la respuesta inmunitaria antitumoral inducida por las células modificadas con CAR (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva, o, como alternativa puede deberse a una reacción inmunitaria directa frente a indirecta. En un aspecto, los linfocitos T transducidos con un CAR exhiben una secreción de citocinas proinflamatorias específicas y una potente actividad citolítica en respuesta a células cancerosas humanas que expresan el CD19, resisten la inhibición de CD19 soluble, median en la muerte de células vecinas y median en la regresión de un tumor humano establecido. Por ejemplo, las células tumorales sin antígeno dentro de un campo heterogéneo de un tumor que expresa CD19 pueden ser susceptibles a la destrucción indirecta por linfocitos T redirigidos a CD19 que han reaccionado previamente contra las células cancerosas positivas para el antígeno adyacentes.

En un aspecto, las células modificadas con CAR totalmente humanas (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) descritas en el presente documento pueden ser un tipo de vacuna para la inmunización *ex vivo* y/o terapia *in vivo* en un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a la inmunización *ex vivo*, ocurre al menos una de las siguientes *in vitro* antes de administrar la célula a un sujeto: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en las células o iii) crioconservación de las células.

5

En la técnica existe constancia de procedimientos *ex vivo* y estos se analizan con más detalle más adelante. En resumen, las células se aíslan de un sujeto (p. ej., un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un CAR descrito en el presente documento. La célula modificada con un CAR se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada con un CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Como alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

10

Cánceres hemáticos

15

Las afecciones de tipo cáncer hemático son tipos de cáncer tales como la leucemia y las afecciones linfoproliferativas malignas que afectan la sangre, la médula ósea y el sistema linfático.

20

La leucemia se puede clasificar como leucemia aguda y leucemia crónica. La leucemia aguda se puede clasificar, además, como leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfoide aguda (LLA). La leucemia crónica incluye leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfoide crónica (LLC). Otras afecciones relacionadas incluyen síndromes mielodisplásicos (SMD, conocidos previamente como "preleucemia") que son un conjunto diverso de afecciones hemáticas que tienen en común la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y riesgo de transformación en LMA.

25

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para tratar el cáncer. En un aspecto, el cáncer es un cáncer hemático que incluye, entre otros, un cáncer hemático que es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, las células que expresan CAR (p. ej., linfocitos T o linfocitos NK) de la divulgación se pueden utilizar para tratar cánceres y neoplasias malignas tales como, entre otros, p. ej., leucemias agudas que incluyen, entre otras, p. ej., LLA-B, LLA-T, LLA; una o más leucemias crónicas que incluyen, entre otras, p. ej., LMC, LLC; cánceres hemáticos o afecciones hemáticas adicionales que incluyen, entre otros, p. ej., leucemia promielocítica de linfocitos B, neoplasia blástica de células dendríticas plasmocitoides, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, tricoleucemia, linfoma folicular microcítico o macrocítico, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto (LCM), linfoma de zonas marginales, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström y «preleucemia» que es una colección diversa de afecciones hemáticas que tienen en común una producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y similares. La presente invención se refiere a poblaciones de células efectoras inmunitarias para su uso en un método para tratar leucemia en un sujeto pediátrico o mejorar la inmunidad antitumoral en un sujeto pediátrico que padece una leucemia.

30

35

40

La presente divulgación también proporciona la inhibición de la proliferación o la reducción de una población de células que expresan CD19, comprendiendo los métodos poner en contacto una población de células que comprenden una célula que expresa CD19 con una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK) descrita en el presente documento que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto específico, la divulgación proporciona la inhibición de la proliferación o la reducción de la población de células cancerosas que expresan CD19, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD19 con una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK) descrita en el presente documento que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, la presente divulgación proporciona la inhibición de la proliferación o la reducción de la población de células cancerosas que expresan CD19, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD19 con una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK) descrita en el presente documento que se une a la célula que expresa CD19. En ciertos aspectos, la célula que expresa CAR anti-CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK) reduce la cantidad, el número, el total o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 65 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % en un sujeto con o modelo en animales de leucemia mielóide u otro cáncer asociado con células que expresan CD19 con respecto a un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

50

55

La presente divulgación también proporciona la prevención, tratamiento y/o gestión de una enfermedad asociada con células que expresan CD19 (p. ej., un cáncer hemático o cáncer atípico que expresa CD19), comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una célula que expresa CAR (p. ej., linfocito T, linfocito NK) descrita en el presente documento que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Los ejemplos no limitantes de trastornos asociados con células que expresan CD19 incluyen trastornos autoinmunitarios (tales como el lupus), trastornos inflamatorios (tales como alergias y asma) y cánceres (tales como cánceres hemáticos o cánceres atípicos que expresan CD19).

60

La presente divulgación también proporciona la prevención, tratamiento y/o gestión de una enfermedad asociada con células que expresan CD19, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una célula que expresa

CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK) descrita en el presente documento que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

La presente divulgación proporciona la prevención de la recaída de un cáncer asociado con células que expresan CD19 (p. ej., un cáncer hemático tal como LLA y LLC), comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesita una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK) descrita en el presente documento que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK) descrito en el presente documento que se une a la célula que expresa CD19 en combinación con una cantidad eficaz de otra terapia.

Terapia combinada

Se apreciará que cualquier terapia contra el cáncer como se ha descrito anteriormente y en el presente documento se puede administrar en combinación con una o más terapias adicionales para tratar y/o reducir los síntomas de un cáncer descrito en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar simultáneamente con, antes de, o después de, una o más de otras terapias adicionales o agentes terapéuticos. En una realización, se puede usar una célula que expresa CAR descrita en la presente en combinación con otros agentes y terapias conocidos. La administración «en combinación», tal como se utiliza en el presente documento, significa que se suministran dos (o más) tratamientos diferentes al sujeto durante el transcurso de la afectación del sujeto con el trastorno, p. ej., se suministran los dos o más tratamientos después de que se le haya diagnosticado al sujeto el trastorno y antes de que el trastorno se haya curado o eliminado o se haya detenido el tratamiento por otras razones. En algunas realizaciones, el suministro de un tratamiento todavía se está produciendo cuando comienza el suministro del segundo, de modo que hay solapamiento en cuanto a la administración. Esto se denomina, en ocasiones, en el presente documento «suministro simultáneo» o «concurrente». En otras realizaciones, el suministro de un tratamiento termina antes de que comience el suministro del otro tratamiento. En algunas realizaciones de cualquier caso, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, p. ej., se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida que lo que se vería si el segundo tratamiento se administrara en ausencia del primer tratamiento, o se observa la situación análoga con el primer tratamiento. En algunas realizaciones, el suministro es tal que la reducción de un síntoma u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor de la que se observaría con un tratamiento suministrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo o más que aditivo. El suministro puede ser tal que un efecto del primer tratamiento suministrado todavía sea detectable cuando se suministra el segundo.

Una célula que expresa CAR descrita en el presente documento y el al menos un agente terapéutico adicional se pueden administrar simultáneamente, en las mismas composiciones o en composiciones separadas, o secuencialmente. Para la administración secuencial, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se puede administrar primero y el agente adicional se puede administrar en segundo lugar, o el orden de administración se puede invertir.

En aspectos adicionales, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede utilizarse en una pauta de tratamiento en combinación con cirugía, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoblivos, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación con vacuna peptídica, tal como se describe en Izumoto *et al.* 2008 *J NEUROSURG* 108:963-971.

Se puede utilizar una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un agente quimioterápico. Los agentes quimioterápicos de ejemplo incluyen una antraciclina (p. ej., doxorubicina (p. ej., doxorubicina liposómica)), un alcaloide de la vinca (p. ej., vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina), un agente alquilante (p. ej., bendamustina, ciclofosfamida, decarbazina, melfalán, ifosfamida, temozolomida), una célula inmunitaria de tipo anticuerpo (p. ej., alemtuzamab, gemtuzumab, rituximab, tositumomab), un antimetabolito (incluidos, p. ej., antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de la adenosina desaminasa (p. ej., fludarabina)), un inhibidor de mTOR, un agonista de la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides TNFR (GITR), un inhibidor del proteasoma (p. ej., aclacinomicina A, gliotoxina o bortezomib), un inmunomodulador tal como talidomida o un derivado de talidomida (p. ej., lenalidomida) y combinaciones de estos. En la presente invención, las células que expresan CAR se administran combinadas con quimioterapia que comprende ciclofosfamida y/o citarabina.

Los agentes quimioterápicos generales considerados para su uso en terapias combinadas incluyen anastrozol (Arimidex[®]), bicalutamida (Casodex[®]), sulfato de bleomicina (Blenoxane[®]), busulfán (Myleran[®]), busulfán para inyección (Busulfex[®]), capecitabina (Xeloda[®]), N4-pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin[®]), carmustina (BiCNU[®]), clorambucilo (Leukeran[®]), cisplatino (Platinol[®]), cladribina (Leustatin[®]), ciclofosfamida (Cytosan[®] o Neosar[®]), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar-U[®]), citarabina en liposomas para inyección (DepoCyt[®]), dacarbazina (DTIC-Dome[®]), dactinomicina (dactinomicina, Cosmegen), clorhidrato de daunorubicina (Cerubidine[®]), citrato de daunorubicina en liposomas para inyección (DaunoXome[®]), dexametasona, docetaxel (Taxotere[®]), clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin[®], Rubex[®]), etopósido (Vepesid[®]), fosfato de fludarabina (Fludara[®]), 5-fluorouracilo (Adrucil[®], Efudex[®]), flutamida (Eulexin[®]), tezacitibina, Gemcitabina (difluorodesoxicitidina), hidroxiaurea (Hydrea[®]), Idarubicina (Idamycin[®]),

ifosfamida (IFEX[®]), irinotecán (Camptosar[®]), L-asparaginasa (ELSPAR[®]), leucovorina de calcio, melfalán (Alkeran[®]), 6-mercaptapurina (Purinethol[®]), metotrexato (Folex[®]), mitoxantrona (Novantrone[®]), mylotarg, paclitaxel (Taxol[®]), phoenix (Itrio90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosán 20 con implante de carmustina (Gliadel[®]), citrato de tamoxifeno (Nolvadex[®]), tenipósido (Vumon[®]), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone[®]), clorhidrato de topotecán para inyección (Hycamptin[®]), vinblastina (Velban[®]), vincristina (Oncovin[®]) y vinorelbina (Navelbine[®]).

Los agentes alquilantes de ejemplo incluyen, entre otros, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, alquilsulfonatos, nitrosoureas y triazenos, mostaza de uracilo (Aminouracil Mustard[®], Chlorethaminacil[®], Demethylodopan[®], Desmethylodopan[®], Haemanthamine[®], Nordopan[®], Uracil nitrogen mustard[®], Uracillost[®], Uracilmostaza[®], Uramustin[®], Uramustine[®]), clormetina (Mustargen[®]), ciclofosfamida (Cytosan[®], Neosar[®], Clafen[®], Endoxan[®], Procitox[®], Revimmune[™]), ifosfamida (Mitoxana[®]), melfalán (Alkeran[®]), Clorambucilo (Leukeran[®]), pipobromán (Amedel[®], Vercyte[®]), trietilenmelamina (Hemel[®], Hexalen[®], Hexastat[®]), trietilentiofosforamina, Temozolomida (Temodar[®]), tiotepa (Thioplex[®]), busulfán (Busilvex[®], Myleran[®]), carmustina (BiCNU[®]), lomustina (CeeNU[®]), estreptozocina (Zanosar[®]) y Dacarbazina (DTIC-Dome[®]) y combinaciones de estos. Los agentes alquilantes a modo de ejemplo adicionales incluyen, entre otros, Oxaliplatino (Eloxatin[®]); Temozolomida (Temodar[®] y Temodal[®]); Dactinomicina (también conocida como actinomicina-D, Cosmegen[®]); Melfalán (también conocido como L-PAM, L-sarcosina y mostaza de fenilalanina, Alkeran[®]); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen[®]); Carmustina (BiCNU[®]); Bendamustina (Treanda[®]); Busulfán (Busulfex[®] y Myleran[®]); Carboplatino (Paraplatin[®]); Lomustina (también conocida como CCNU, CeeNU[®]); Cisplatino (también conocido como CDDP, Platino[®] y Platino[®]-AQ); Clorambucilo (Leukeran[®]); Ciclofosfamida (Cytosan[®] y Neosar[®]); Dacarbazina (también conocida como DTIC, DIC e imidazol carboxamida, DTIC-Dome[®]); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen[®]); Ifosfamida (Ifex[®]); Prednumustina; Procarbina (Matulane[®]); Mecloretamina (también conocida como mostaza nitrogenada, mustina y clorhidrato de mecloretamina, Mustargen[®]); Estreptozocina (Zanosar[®]); Tiotepa (también conocido como tiofosfamida, TESP A y TSPA, Thioplex[®]); Ciclofosfamida (Endoxan[®], Cytosan[®], Neosar[®], Procitox[®], Revimmune[®]); Bendamustina HCl (Treanda[®]) y combinaciones de estos.

Los inhibidores de mTOR de ejemplo incluyen, entre otros, RAD001, temsirolimus; ridaforolimus (conocido formalmente como deferolimus, dimetilfosfinato de (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-(((1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23E,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0^{4,9}]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il)propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la Publicación PCT N.º WO 03/064383); everolimus (Afinitor[®] o RAD001); rapamicina (AY22989, Sirolimus[®]); simapimod (CAS 164301-51-3); emsirolimus, (5-[2,4-bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metilpirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y N²-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartil-L-serina-(SEQ ID NO: 356), sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1) y XL765 y combinaciones de estos.

Los inmunomoduladores de ejemplo incluyen, entre otros, afutuzumab (disponible de Roche[®]); pegfilgrastim (Neulasta[®]); lenalidomida (CC-5013, Revlimid[®]); talidomida (Thalomid[®]), actimid (CC4047); e IRX-2 (mezcla de citocinas humanas que incluyen interleucina 1, interleucina 2 e interferón γ, CAS 951209-71-5, disponible de IRX Therapeutics) y combinaciones de estos.

Las antraciclinas de ejemplo incluyen, entre otras, doxorubicina (Adriamycin[®] y Rubex[®]); bleomicina (lenoxano[®]); daunorrubicina (clorhidrato de dauorrubicina, daunomicina y clorhidrato de rubidomicina, Cerubidine[®]); daunorrubicina liposómica (liposoma de citrato de daunorrubicina, DaunoXome[®]); mitoxantrona (DHAD, Novantrone[®]); epirubicina (Ellence[™]); idarrubicina (Idamycin[®], Idamycin PFS[®]); mitomicina C (Mutamycin[®]); geldanamicina; herbimicina; ravidomicina; desacetilravidomicina y combinaciones de estas.

Los alcaloides de la vinca de ejemplo incluyen, entre otros, tartrato de vinorelbina (Navelbine[®]), vincristina (Oncovin[®]) y vindesina (Eldisine[®]); vinblastina (también conocida como sulfato de vinblastina, vincalécoblastina y VLB, Alkaban-AQ[®] y Velban[®]); vinorelbina (Navelbine[®]) y combinaciones de estos.

Los inhibidores del proteasoma de ejemplo incluyen, entre otros, bortezomib (Velcade[®]); carfilzomib (PX-171-007, (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida); marizomib (NPI-0052); citrato de ixazomib (MLN-9708); delanzomib (CEP-18770); O-metil-N-[(2-metil-5-tiazolil)carbonil]-L-seril-O-metil-N-[(1S)-2-[(2R)-2-metil-2-oxiranil]-2-oxo-1-(fenilmetil)etil]-L-serinamida (ONX-0912) y combinaciones de estos.

Los agonistas de G1TR de ejemplo incluyen, entre otros, proteínas de fusión de G1TR y anticuerpos anti-G1TR (p. ej., anticuerpos anti-G1TR bivalentes), tales como, p. ej., una proteína de fusión de G1TR descrita en la Patente de EE. UU. N.º: 6 111 090, Patente Europea N.º: 090505B1, Patente de EE. UU. N.º: 8 586 023, Publicaciones PCT N.ºs: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-G1TR descrito, p. ej., en la Patente de EE. UU. N.º: 7 025 962, Patente Europea N.º: 1947183B1, Patente de EE. UU. N.º: 7 812 135, Patente de EE. UU. N.º: 8 388 967, Patente de EE. UU. N.º: 8 591 886, Patente Europea N.º: EP 1866339, Publicación PCT N.º: WO 2011/028683, Publicación PCT N.º: WO 2013/039954, Publicación PCT N.º WO2005/007190, Publicación PCT N.º: WO 2007/133822, Publicación PCT N.º: WO2005/055808, Publicación PCT N.º: WO 99/40196, Publicación PCT N.º: WO 2001/03720, Publicación PCT N.º:

WO99/20758, Publicación PCT N.º: WO2006/083289, Publicación PCT N.º: WO 2005/115451, Patente de EE. UU. N.º: 7 618 632 y Publicación PCT N.º: WO 2011/051726.

5 En una realización, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, tal como, p. ej., una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK), p. ej., CTL019 se administra a un sujeto, p. ej., un sujeto identificado como uno que responde parcialmente o que no responde, en combinación con un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, p. ej., una vía de señalización de la diana de la rapamicina, tal como RAD001. En una realización, el inhibidor de mTOR se administra antes que la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el inhibidor de mTOR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En un caso, el sujeto padece cáncer (p. ej., un cáncer hemático tal como LLA o LLC). En una realización, el sujeto padece LLA. En una realización, el sujeto padece LLC.

15 En una realización, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, tal como, p. ej., una célula que expresa CAR CD19 (p. ej., linfocito T, linfocito NK), p. ej., CTL019 se administra a un sujeto, p. ej., un sujeto identificado como uno que responde parcialmente o que no responde, en combinación con un agonista de G1TR, p. ej., un agonista de G1TR descrito en el presente documento. En una realización, el agonista de G1TR se administra antes que la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agonista de G1TR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En una realización, el sujeto padece cáncer (p. ej., un cáncer hemático tal como LLA o LLC). En una realización, el sujeto padece LLA. En una realización, el sujeto padece LLC.

20 Inhibidor de cinasas

25 En una realización, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento se puede utilizar en una pauta de tratamiento en combinación con un inhibidor de cinasas, p. ej., un inhibidor de CDK4, un inhibidor de BTK, un inhibidor de MNK, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de ITK, etc. En una realización, el sujeto es uno que responde completamente, y al sujeto se le administra una pauta de tratamiento que incluye la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un inhibidor de cinasas, p. ej., un inhibidor de cinasas descrito en el presente documento, p. ej., a una dosis o pauta posológica descritos en el presente documento. En una realización, el sujeto es uno que responde parcialmente o no responde, y al sujeto se le administra una pauta de tratamiento que incluye la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento en combinación con un inhibidor de cinasas, p. ej., un inhibidor de cinasas descrito en el presente documento, p. ej., a una dosis o pauta posológica descritos en el presente documento.

35 En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de CDK4, p. ej., un inhibidor de CDK4 descrito en el presente documento, p. ej., un inhibidor de CDK4/6, tal como, p. ej., 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-ilpiridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona, clorhidrato (también denominado palbociclib o PD0332991). En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de BTK, p. ej., un inhibidor de BTK descrito en el presente documento, tal como, p. ej., ibrutinib. En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, tal como, p. ej., rapamicina, un análogo de rapamicina, OSI-027. El inhibidor de mTOR puede ser, p. ej., un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2, p. ej., un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2 descrito en el presente documento. En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de MNK, p. ej., un inhibidor de MNK descrito en el presente documento, tal como, p. ej., 4-amino-5-(4-fluoroanilino)pirazol[3,4-*d*]pirimidina. El inhibidor de MNK puede ser, p. ej., un inhibidor de MNK1a, MNK1b, MNK2a y/o MNK2b.

45 En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de CDK4 seleccionado entre aloisina A; flavopiridol o HMR-1275, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3*S*,4*R*)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-4-cromenona; crizotinib (PF-02341066; 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(2*R*,3*S*)-2-(hidroximetil)-1-metil-3-pirrolidinil]-4*H*-1-benzopiran-4-ona, clorhidrato (P276-00); 1-metil-5-[[2-[5-(trifluorometil)-1*H*-imidazol-2-il]-4-piridinil]oxi]-*N*-[4-(trifluorometil)fenil]-1*H*-bencimidazol-2-amina (RAF265); indisulam (E7070); roscovitina (CYC202); palbociclib (PD0332991); dinaciclib (SCH727965); *N*-[5-[[[5-*tert*-butiloxazol-2-il)metil]tio]tiazol-2-il]piperidin-4-carboxamida (BMS 387032); ácido 4-[[9-cloro-7-(2,6-difluorofenil)-5*H*-pirimido[5,4-*d*]2]benzazepin-2-il]amino]benzoico (MLN8054); 5-[3-(4,6-difluoro-1*H*-bencimidazol-2-il)-1*H*-indazol-5-il]-*N*-etil-4-metil-3-piridinmetanamina (AG-024322); *N*-(piperidin-4-il)amida del ácido 4-(2,6-diclorobenzoilamino)-1*H*-pirazol-3-carboxílico (AT7519); 4-[2-metil-1-(1-metiletil)-1*H*-imidazol-5-il]-*N*-[4-(metilsulfonil)fenil]-2-pirimidinamina (AZD5438); y XL281 (BMS908662).

55 En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de CDK4, p. ej., palbociclib (PD0332991), y el palbociclib se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg (p. ej., 75 mg, 100 mg o 125 mg) al día durante un periodo de tiempo, p. ej., diariamente durante 14- 21 días de un ciclo de 28 días, o diariamente durante 7-12 días de un ciclo de 21 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de palbociclib.

60 En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de BTK seleccionado entre ibrutinib (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13.

En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de BTK, p. ej., ibrutinib (PCI-32765), y el ibrutinib se administra a una dosis de aproximadamente 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 420 mg, 440 mg, 460 mg, 480 mg, 500 mg, 520 mg, 540 mg, 560 mg, 580 mg, 600 mg (p. ej., 250 mg, 420 mg o 560 mg) diariamente durante un periodo de tiempo, p. ej., diariamente durante un ciclo de 21 días o diariamente durante un ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de ibrutinib.

En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de mTOR seleccionado entre temsirolimus; ridaforolimus dimetilfosfinato de (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2[(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*, 23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0^{4,9}]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669; everolimus (RAD001); rapamicina (AY22989); simapimod; (5-{2,4-bis[(3*S*)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[*trans*-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metilpirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-ona (PF04691502); y *N*²-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4*H*-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L- α -aspartil-L-serina- (SEQ ID NO: 356), sal interna (SF1126); y XL765.

En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de mTOR, p. ej., rapamicina, y la rapamicina se administra a una dosis de aproximadamente 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg (p. ej., 6 mg) diariamente durante un periodo de tiempo, p. ej., diariamente durante un ciclo de 21 días o diariamente durante un ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de rapamicina. En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de mTOR, p. ej., everolimus, y el everolimus se administra en una dosis de aproximadamente 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg (p. ej., 10 mg) diariamente durante un periodo de tiempo, p. ej., diariamente durante un ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de everolimus.

En una realización, el inhibidor de cinasas es un inhibidor de MNK seleccionado entre CGP052088; 4-amino-3-(*p*-fluorofenilamino)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina (CGP57380); cercosporamida; ETC-1780445-2; y 4-amino-5-(4-fluoroanilino)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina.

Combinación con una dosis baja de un inhibidor de mTOR

Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizar una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR alostérico, que incluye rapálogos tales como RAD001. La administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR (p. ej., una dosis que es insuficiente para suprimir completamente el sistema inmunitario, pero suficiente para mejorar la función inmunitaria) puede optimizar el rendimiento de las células efectoras inmunitarias, p. ej., linfocitos T o células que expresan CAR, en el sujeto. Se describen métodos para medir la inhibición de mTOR, dosis, pautas de tratamiento y composiciones farmacéuticas adecuadas en la Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2015/0140036, presentada el 13 de noviembre de 2014.

En una realización, la administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR puede dar como resultado uno o más de los siguientes:

- i) una disminución en el número de células efectoras inmunitarias positivas para PD-1;
- ii) un aumento en el número de células efectoras inmunitarias negativas para PD-1;
- iii) un aumento en la proporción de células efectoras inmunitarias negativas para PD-1/células efectoras inmunitarias positivas para PD-1;
- iv) un aumento en el número de linfocitos T vírgenes;
- v) un aumento en la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD62L^{elevado}, CD127^{elevado}, CD27⁺ y BCL2, p. ej., en los linfocitos T de memoria, p. ej., precursores de los linfocitos T de memoria;
- vi) una disminución en la expresión de KLRG1, p. ej., en linfocitos T de memoria, p. ej., precursores de linfocitos T de memoria; o
- vii) un aumento en el número de precursores de linfocitos T de memoria, p. ej., células con una cualquiera o una combinación de las siguientes características: aumento de CD62L^{elevado}, aumento de CD127^{elevado}, aumento de CD27⁺, reducción de KLRG1 y aumento de BCL2;

y en donde cualquiera de los anteriores, p. ej., i), ii), iii), iv), v), vi) o vii), ocurre, p. ej., al menos transitoriamente, p. ej., en comparación con un sujeto no tratado.

En otra realización, la administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR da como resultado una proliferación prolongada o mayor de células que expresan CAR, p. ej., en cultivo o en un sujeto, p. ej., en

5 comparación con células que expresan CAR no tratadas o un sujeto no tratado. En realizaciones, la proliferación incrementada se asocia con un incremento en el número de células que expresan CAR. En otra realización, la administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR da como resultado una muerte mayor de células cancerosas por parte de células que expresan CAR, p. ej., en cultivo o en un sujeto, p. ej., en comparación con células que expresan CAR no tratadas o un sujeto no tratado. En algunas realizaciones, una muerte de células cancerosas mayor se asocia con un descenso en el volumen tumoral.

10 En una realización, las células que expresan una molécula CAR, p. ej., una molécula CAR descrita en el presente documento, se administra combinada con una dosis baja, de potenciación inmunitaria de un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR alostérico, p. ej., RAD001, o un inhibidor de mTOR catalítico. Por ejemplo, la administración de la dosis baja, de potenciación inmunitaria, del inhibidor de mTOR se puede iniciar antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento; completar antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento; iniciar a la vez que la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento; superponer con la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento; o continuar después de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento.

20 Como alternativa, o además, la administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR puede optimizar las células efectoras inmunitarias que se van a modificar para que expresen una molécula CAR descrita en el presente documento. En tales realizaciones, la administración de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor alostérico, p. ej., RAD001, o un inhibidor catalítico, se inicia o completa antes de la recolección de células efectoras inmunitarias, p. ej., linfocitos T o linfocitos NK, que se van a modificar para que expresen una molécula CAR descrita en el presente documento, de un sujeto.

25 En otra realización, las células efectoras inmunitarias, p. ej., linfocitos T o linfocitos NK, que se van a modificar para que expresen una molécula CAR descrita en el presente documento, p. ej., después de la recolección de un sujeto, o células efectoras inmunitarias que expresan CAR, p. ej., linfocitos T o linfocitos NK, p. ej., antes de la administración a un sujeto, se pueden cultivar en presencia de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR.

30 En una realización, la administración al sujeto de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR comprende administrar, p. ej., una vez a la semana, p. ej., en una forma farmacéutica de liberación inmediata, de 0,1 a 20, de 0,5 a 10, de 2,5 a 7,5, de 3 a 6 o aproximadamente 5 mg de RAD001, o una dosis bioequivalente de este. En una realización, la administración al sujeto de una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR comprende administrar, p. ej., una vez a la semana, p. ej., en una forma farmacéutica de liberación sostenida, de 0,3 a 60, de 1,5 a 30, de 7,5 a 22,5, de 9 a 18 o aproximadamente 15 mg de RAD001, o una dosis bioequivalente de este.

35 En una realización, una dosis de un inhibidor de mTOR se asocia con, o proporciona, una inhibición de mTOR de al menos un 5 pero no más de un 90 %, al menos un 10 pero no más de un 90 %, al menos un 15, pero no más de un 90 %, al menos un 20 pero no más de un 90 %, al menos un 30 pero no más de un 90 %, al menos un 40 pero no más de un 90 %, al menos un 50 pero no más de un 90 %, al menos un 60 pero no más de un 90 %, al menos un 70 pero no más de un 90 %, al menos un 5 pero no más de un 80 %, al menos un 10 pero no más de un 80 %, al menos un 15, pero no más de un 80 %, al menos un 20 pero no más de un 80 %, al menos un 30 pero no más de un 80 %, al menos un 40 pero no más de un 80 %, al menos un 50 pero no más de un 80 %, al menos un 60 pero no más de un 80 %, al menos un 5 pero no más de un 70 %, al menos un 10 pero no más de un 70 %, al menos un 15, pero no más de un 70 %, al menos un 20 pero no más de un 70 %, al menos un 30 pero no más de un 70 %, al menos un 40 pero no más de un 70 %, al menos un 50 pero no más de un 70 %, al menos un 5 pero no más de un 60 %, al menos un 10 pero no más de un 60 %, al menos un 15, pero no más de un 60 %, al menos un 20 pero no más de un 60 %, al menos un 30 pero no más de un 60 %, al menos un 40 pero no más de un 60 %, al menos un 5 pero no más de un 50 %, al menos un 10 pero no más de un 50 %, al menos un 15, pero no más de un 50 %, al menos un 20 pero no más de un 50 %, al menos un 30 pero no más de un 50 %, al menos un 40 pero no más de un 50 %, al menos un 5 pero no más de un 40 %, al menos un 10 pero no más de un 40 %, al menos un 15, pero no más de un 40 %, al menos un 20 pero no más de un 40 %, al menos un 30 pero no más de un 40 %, al menos un 40 pero no más de un 40 %, al menos un 5 pero no más de un 30 %, al menos un 10 pero no más de un 30 %, al menos un 15, pero no más de un 30 %, al menos un 20 pero no más de un 30 %, o al menos un 25 pero no más de un 30 %.

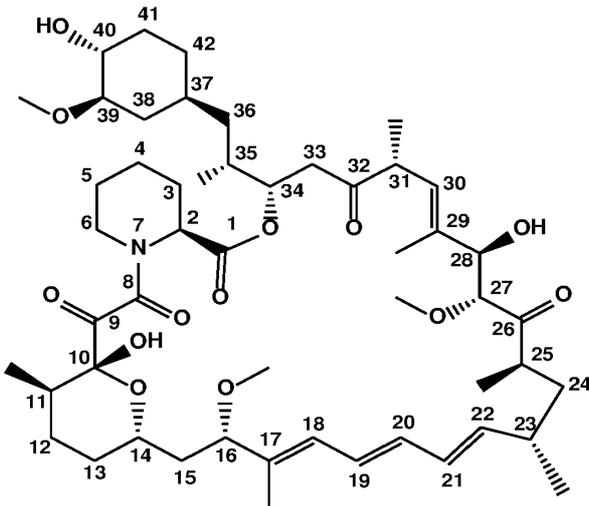
55 El grado de inhibición de mTOR se puede expresar como, o corresponde a, el grado de inhibición de la cinasa P70 S6, p. ej., el grado de inhibición de mTOR se puede determinar mediante el nivel de descenso en la actividad de la cinasa P70 S6, p. ej., mediante el descenso de la fosforilación de un sustrato de la cinasa P70 S6. El nivel de inhibición de mTOR se puede evaluar mediante varios métodos, tales como medir la actividad de la cinasa P70 S6 mediante el ensayo Boulay, como se describe en la Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2015/01240036, o como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 7 727 950; medir el nivel de S6 fosforilado mediante inmunoelectrotransferencia; o evaluar un cambio en la proporción de células efectoras inmunitarias negativas para PD1 respecto a células efectoras inmunitarias positivas para PD1.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión «inhibidor de mTOR» se refiere a un compuesto o ligando, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que inhibe la cinasa mTOR en una célula. En una realización, un inhibidor de mTOR es un inhibidor alostérico. Los inhibidores de mTOR alostéricos incluyen el compuesto tricíclico neutro

rapamicina (sirolimus), compuestos relacionados con rapamicina, es decir, compuestos que tienen una similitud funcional y estructural con rapamicina que incluyen, p. ej., derivados de rapamicina, análogos de rapamicina (también denominados rapálogos) y otros compuestos macrólidos que inhiben la actividad de mTOR. En una realización, un inhibidor de mTOR es un inhibidor catalítico.

5

La rapamicina es un antibiótico macrólido conocido producido por *Streptomyces hygroscopicus* que tiene la estructura que se muestra en la Fórmula A.



(A)

10

Véase, p. ej., McAlpine, J.B., *et al.*, *J. Antibiotics* (1991) 44: 688; Schreiber, S.L., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (1991) 113: 7433; Patente de EE. UU. N.º 3 929 992. Existen diversos esquemas de numeración propuestos para la rapamicina. Para evitar confusiones, cuando se nombran análogos de rapamicina específicos en el presente documento, los nombres se dan con referencia a la rapamicina utilizando el esquema de numeración de la fórmula A.

15

Los análogos de rapamicina útiles en la invención son, por ejemplo, análogos sustituidos en O, en los que el grupo hidroxilo en el anillo ciclohexilo de la rapamicina es reemplazado por ORi, en el que Ri es hidroxialquilo, hidroxialcoialquilo, acilaminoalquilo o aminoalquilo; p. ej., RAD001, también conocido como everolimus como se describe en los documentos US 5 665 772 y WO94/09010. Otros análogos de rapamicina adecuados incluyen los sustituidos en la posición 26 o 28. El análogo de rapamicina puede ser un epímero de un análogo mencionado anteriormente, particularmente un epímero de un análogo sustituido en la posición 40, 28 o 26, y opcionalmente se puede hidrogenar adicionalmente, p. ej., como se describe en los documentos US 6 015 815, WO95/14023 y WO99/15530, p. ej., ABT578 también conocido como zotarolimus o un análogo de rapamicina descrito en los documentos US 7 091 213, WO98/02441 y WO01/14387, p. ej., AP23573 también conocido como ridaforolimus.

25

Los ejemplos de análogos de rapamicina adecuados para su uso en la presente invención del documento US 5 665 772 incluyen, entre otros, 40-O-bencilrapamicina, 40-O-(4'-hidroximetil)bencilrapamicina, 40-O-[4'-(1,2-dihidroxi)etil]bencilrapamicina, 40-O-alilrapamicina, 40-O-[3'-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4(S)il)prop-2'-en-1'-il]rapamicina, (2'E,4'S)-40-O-(4',5'-dihidroxipent-2'-en-1'-il)rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etoxicarbonilmetilrapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina, 40-O-(3-hidroxi)propilrapamicina, 40-O-(6-hidroxi)hexilrapamicina, 40-O-[2-(2-hidroxi)etoxi]etilrapamicina, 40-O-[(3S)-2,2-dimetildioxolan-3-il]metilrapamicina, 40-O-[(2S)-2,3-dihidroxi)prop-1-il]rapamicina, 40-O-(2-acetoxi)etilrapamicina, 40-O-(2-nicotinoiloxi)etilrapamicina, 40-O-[2-(N-morfolino)acetoxi]etilrapamicina, 40-O-(2-N-imidazolilacetoxi)etilrapamicina, 40-O-[2-(N-metil-N'-piperazinil)acetoxi]etilrapamicina, 39-O-desmetil-39,40-O-O-etilenerapamicina, (26R)-26-dihidro-40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina, 40-O-(2-aminoetil)rapamicina, 40-O-(2-acetaminoetil)rapamicina, 40-O-(2-nicotinamidoetil)rapamicina, 40-O-(2-(N-metilimidazo-2'-ilcarbetoxamido)etil)rapamicina, 40-O-(2-etoxicarbonilaminoetil)rapamicina, 40-O-(2-tolilsulfonamidoetil)rapamicina y 40-O-[2-(4',5'-dicarboetoxi-1',2',3'-triazol-1'-il)etil]rapamicina.

40

Se conocen otros análogos de rapamicina útiles en la presente invención que son análogos en donde el grupo hidroxilo del anillo de ciclohexilo de la rapamicina y/o el grupo hidroxilo en la posición 28 es reemplazado por un grupo hidroxiléster, por ejemplo, análogos de rapamicina que se encuentran en el documento US RE44 768, p. ej., temsirolimus.

45

Otros análogos de rapamicina útiles en la presente invención incluyen aquellos en donde el grupo metoxi en la posición 16 es reemplazado por otro sustituyente, preferentemente alquinoxiloxi, bencilo, *orto*-metoxibencilo o clorobencilo (opcionalmente sustituido con hidroxilo) y/o en donde el grupo metoxi en la posición 39 se elimina junto con el carbono 39

de manera que el anillo de ciclohexilo de la rapamicina se convierte en un anillo de ciclopentilo que carece del grupo metoxi de la posición 39; p. ej., como se describe en los documentos WO95/16691 y WO96/41807. Los análogos se pueden modificar adicionalmente de modo que el hidroxilo en la posición 40 de la rapamicina esté alquilado y/o el carbonilo-32 esté reducido.

5 Los análogos de rapamicina del documento WO95/16691 incluyen, entre otros, 16-desmetoxi-16-(pent-2-inil)oxirrapamicina, 16-desmetoxi-16-(but-2-inil)oxirrapamicina, 16-desmetoxi-16-(propargil)oxirrapamicina, 16-desmetoxi-16-(4-hidroxibut-2-inil)oxirrapamicina, 16-desmetoxi-16-benciloxi-40-O-(2-hidroxietil)rapamicina, 16-desmetoxi-16-benciloxirrapamicina, 16-desmetoxi-16-orto-metoxibencilrapamicina, 16-desmetoxi-40-O-(2-metoxietil)-16-pent-2-inil)oxirrapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-formil-42-norrapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-hidroximetil-42-norrapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-carboxi-42-norrapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(4-metilpiperazin-1-il)carbonil-42-norrapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(morfolin-4-il)carbonil-42-norrapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-[N-metil,N-(2-piridin-2-iletel)]carbamoil-42-norrapamicina y 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(p-toluenosulfonilhidrazonometil)-42-norrapamicina.

15 Los análogos de rapamicina del documento WO96/41807 incluyen, entre otros, 32-desoxorrapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-desoxorrapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-desoxo-40-O-(2-hidroxietil)rapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxietil)rapamicina, 32(S)-dihidro-40-O-(2-metoxi)etilrapamicina y 32(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxietil)rapamicina.

20 Otro análogo de rapamicina adecuado es umirolimus tal como se describe en el documento US2005/0101624.

RAD001, conocido de otra forma como everolimus (Afinitor®), tiene el nombre químico (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-12-((1R)-2-((1S,3R,4R)-4-(2-hidroxietoxi)-3-metoxiciclohexil)-1-metiletil)-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.04,9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraeno-2,3,10,14,20-pentaona.

25 Los ejemplos adicionales de inhibidores de mTOR alostéricos incluyen sirolimus (rapamicina, AY-22989), 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]rapamicina (también denominado temsirolimus o CCI-779) y ridaforolimus (AP-23573/MK-8669). Otros ejemplos de inhibidores alostéricos de mTOR incluyen zotarolimus (ABT578) y umirolimus.

30 Como alternativa o de manera adicional, se ha observado que los inhibidores de mTOR competitivos con ATP, catalíticos tienen como diana directamente el dominio cinasa de mTOR y tienen como diana tanto mTORC1 como mTORC2. Existen también inhibidores de mTORC1 más eficaces que estos inhibidores de mTOR alostéricos como rapamicina, debido a que modulan respuestas de mTORC1 resistentes a rapamicina tales como la fosforilación de 4EBP1-T37/46 y traducción dependiente de la caperuza.

35 Los inhibidores catalíticos incluyen: BEZ235 o 2-metil-2-[4-(3-metil-2-oxo-8-quinolin-3-il-2,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-1-il)fenil]propionitrilo, o la forma salina de monotosilato. La síntesis de BEZ235 se describe en el documento WO2006/122806; CCG168 (conocido de otro modo como AZD-8055, Chresta, C.M., *et al.*, *Cancer Res*, 2010, 70(1), 288-298) que tiene el nombre químico {5-[2,4-bis-((S)-3-metilmorfolin-4-il)pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-2-metoxifenil}metanol; 3-[2,4-bis-((3S)-3-metilmorfolin-4-il)pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-N-metilbenzamida (WO09104019); 3-(2-aminobenzo[d]oxazol-5-il)-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (WO10051043 y WO2013023184); una N-(3-(N-(3-((3,5-dimetoxifenil)amino)quinoxalino-2-il)sulfamoyl)fenil)-3-metoxi-4-metilbenzamida (WO07044729 y WO12006552); PKI-587 (Venkatesan, A.M., *J. Med. Chem.*, 2010, 53, 2636-2645) que tiene el nombre químico 1-[4-[4-(dimetilamino)piperidino-1-carbonil]fenil]-3-[4-(4,6-dimorfolino-1,3,5-triazin-2-il)fenil]urea; GSK-2126458 (*ACS Med. Chem. Lett.*, 2010, 1, 39-43) que tiene el nombre químico 2,4-difluoro-N-{2-metoxi-5-[4-(4-piridazinil)-6-quinolinil]-3-piridinil}bencenosulfonamida; ; 5-(9-isopropil-8-metil-2-morfolino-9H-purin-6-il)pirimidin-2-amina (WO10114484); (E)-N-(8-(6-amino-5-(trifluorometil)piridin-3-il)-1-(6-(2-cianopropan-2-il)piridin-3-il)-3-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2(3H)ilideno)cianamida (WO12007926).

50 Ejemplos adicionales de inhibidores de mTOR catalíticos incluyen 8-(6-metoxipiridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometilfenil)-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (WO2006/122806) y Ku-0063794 (Garcia-Martinez JM, *et al.*, *Biochem J.*, 2009, 421(1), 29-42. Ku-0063794 es un inhibidor específico de la diana en mamíferos de rapamicina (mTOR). El WYE-354 es otro ejemplo de un inhibidor de mTOR catalítico (Yu K, *et al.* (2009). *Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res.* 69(15): 6232-6240).

Los inhibidores de mTOR útiles según la presente invención también incluyen profármacos, derivados, sales farmacéuticamente aceptables o análogos de estos de cualquiera de los anteriores.

60 Los inhibidores de mTOR, tales como RAD001, se pueden formular para el suministro basándose en métodos muy consolidados en la técnica en función de las dosis particulares descritas en el presente documento. En particular, la patente de EE. UU. 6 004 973 proporciona ejemplos de formulaciones que se pueden utilizar con los inhibidores de mTOR descritos en el presente documento.

Las terapias de combinación adicionales pueden incluir agentes antialérgicos, antieméticos, analgésicos, terapias complementarias.

5 Algunos pacientes pueden experimentar reacciones alérgicas a los agentes terapéuticos descritos en el presente documento y/u otro u otros agentes antineoplásicos durante o después de la administración; por lo tanto, a menudo se administran agentes antialérgicos para minimizar el riesgo de una reacción alérgica. Los agentes antialérgicos adecuados incluyen corticoesteroides tales como dexametasona (p. ej., Decadron[®]), beclometasona (p. ej., Beclovent[®]), hidrocortisona (también conocida como cortisona, succinato sódico de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona y comercializada con los nombres comerciales Ala-Cort[®], fosfato de hidrocortisona, Solu-Cortef[®], Hydrocort Acetate[®] y Lanacort[®]), prednisolona (comercializada con los nombres comerciales Delta-Cortel[®], Orapred[®], Pediapred[®] y Prelone[®]), prednisona (comercializada con los nombres comerciales Deltasone[®], Liquid Red[®], Meticorten[®] y Orasone[®]), metilprednisolona (también conocida como 6-metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, comercializada con los nombres comerciales Duralone[®], Medralone[®], Medrol[®], M-Prednisol[®] y Solu-Medrol[®]); antihistamínicos, tales como difenhidramina (p. ej., Benadryl[®]), hidroxizina y ciproheptadina; y broncodilatadores, tales como los agonistas de los receptores beta-adrenérgicos, albuterol (p. ej., Proventil[®]) y terbutalina (Brethine[®]).

20 Algunos pacientes pueden experimentar náuseas durante y después de la administración de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento y/u otro u otros agentes antineoplásicos; por lo tanto, los antieméticos se utilizan para prevenir las náuseas (parte superior del estómago) y los vómitos. Los antieméticos adecuados incluyen aprepitant (Emend[®]), ondansetrón (Zofran[®]), granisetron HCl (Kytril[®]), lorazepam (Ativan[®]), dexametasona (Decadron[®]), proclorperazina (Compazine[®]), casopitant (Rezonic[®] y Zurrisa[®]) y combinaciones de estos.

25 A menudo se prescriben medicamentos para aliviar el dolor experimentado durante el periodo de tratamiento para hacer que el paciente esté más cómodo. A menudo se utilizan analgésicos comunes de venta libre, tales como Tylenol[®]. Sin embargo, los analgésicos opioides, tales como hidrocodona/paracetamol o hidrocodona/acetaminofeno (p. ej., Vicodin[®]), morfina (p. ej., Astramorph[®] o Avinza[®]), oxycodona (p. ej., OxyContin[®] o Percocet[®]), clorhidrato de oximorfona (Opana[®]) y fentanilo (p. ej., Duragesic[®]) también son útiles para el dolor moderado o intenso.

30 En un intento de proteger las células normales de la toxicidad del tratamiento y de limitar la toxicidad a los órganos, se pueden utilizar como una terapia complementaria agentes citoprotectores (tales como neuroprotectores, antioxidantes, cardioprotectores, neutralizadores de la extravasación de antraciclina, nutrientes y similares). Los agentes citoprotectores adecuados incluyen Amifostina (EthyoI[®]), glutamina, dimezna (Tavocept[®]), mesna (Mesnex[®]), dexrazoxana (Zinecard[®] o Totect[®]), xaliproden (Xapрила[®]) y leucovorina (también conocida como leucovorina cálcica, factor de citrovorum y ácido folínico).

35 La estructura de los compuestos activos identificados con números de código, denominaciones comerciales o genéricas se puede consultar en la edición actual del compendio estándar «The Merck Index» o en bases de datos, por ejemplo, Patents International (por ejemplo, IMS World Publications).

40 Los compuestos mencionados anteriormente, que se pueden utilizar en combinación con un compuesto de la presente divulgación, se pueden preparar y administrar como se describe en la técnica, tal como en los documentos citados anteriormente.

45 También se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la presente divulgación (p. ej., un compuesto de la presente invención) o una sal farmacéuticamente aceptable de este junto con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración a un sujeto humano o animal, ya sea solo o junto con otros agentes antineoplásicos.

50 También se divulgan métodos para tratar a sujetos humanos o animales que padecen una enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer. La presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto humano o animal que necesita un tratamiento de este tipo, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación (p. ej., un compuesto de la presente divulgación) o una sal farmacéuticamente aceptable de este, ya sea solo o combinado con otros agentes antineoplásicos.

55 En particular, las composiciones se formularán juntas como un agente terapéutico combinado o se administrarán por separado.

60 En la terapia de combinación, el compuesto de la presente divulgación y otro u otros agentes antineoplásicos pueden administrarse de forma simultánea, concurrente o secuencial sin límites de tiempo específicos, en donde una administración de este tipo proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente.

65 En un caso preferido, el compuesto de la presente divulgación y el otro o los otros agentes antineoplásicos se administran generalmente de forma secuencial en cualquier orden por infusión o por vía oral. La pauta posológica puede variar dependiendo del estadio de la enfermedad, forma física del paciente, perfiles de seguridad de los fármacos individuales y

5 tolerancia de los fármacos individuales, así como también otros criterios muy conocidos por el médico especialista y médico o médicos generales que administran la combinación. El compuesto de la presente divulgación y otro u otros agentes antineoplásicos pueden administrarse con una separación unos minutos, horas, días o incluso semanas, dependiendo del ciclo particular que se utilice para el tratamiento. Además, el ciclo podría incluir la administración de un fármaco más a menudo que el otro durante el ciclo de tratamiento y con dosis diferentes por administración del fármaco.

10 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan kits que incluyen uno o más compuestos de la presente divulgación y un miembro de la combinación tal como se divulga en el presente documento. Los kits representativos incluyen (a) un compuesto de la presente divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable de este, (b) al menos un miembro de la combinación, p. ej., tal como se ha indicado anteriormente, conforme a lo cual un kit de este tipo puede comprender un prospecto u otra ficha técnica que incluye directrices para la administración.

15 Un compuesto de la presente divulgación también puede utilizarse con ventaja en combinación con procedimientos terapéuticos conocidos, p. ej., la administración de hormonas o, especialmente, radiación. Un compuesto de la presente divulgación puede utilizarse, en particular, como radiosensibilizador, especialmente para el tratamiento de tumores que presentan poca sensibilidad a la radioterapia.

Fabricación y métodos de preparación de células efectoras inmunitarias

20 En el presente documento se divulgan métodos de fabricación de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) que se pueden modificar con un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, y mezclas de reacción y composiciones que comprenden tales células.

25 En un aspecto, la divulgación presenta una célula efectora inmunitaria (p. ej., linfocito T, linfocito NK) modificada para expresar un CAR, en donde la célula efectora inmunitaria modificada muestra una propiedad antitumoral. Un antígeno preferido es un antígeno paraneoplásico (es decir, antígeno tumoral) descrito en el presente documento. En un aspecto, una célula se transforma con el CAR y el CAR se expresa en la superficie celular. En algunos casos, la célula (p. ej., linfocito T o linfocito NK) se transduce con un vector vírico que codifica un CAR. En algunos casos, el vector vírico es un vector retrovírico. En algunos casos, el vector vírico es un vector lentivírico. En tales casos, la célula puede expresar de manera estable el CAR. En otro caso, la célula (p. ej., linfocito T o linfocito NK) se transfecta con un ácido nucleico, p. ej., ARNm, ADNc, ADN, que codifica un CAR. En algunos de tales casos, la célula puede expresar de manera transitoria el CAR.

35 Además, la presente divulgación proporciona composiciones de CART y su uso en medicamentos o métodos para tratar, entre otras enfermedades, cáncer o cualquier neoplasia maligna o enfermedades autoinmunitarias que involucran células o tejidos que expresan un antígeno tumoral como se describe en el presente documento.

40 En un aspecto, el CAR de la divulgación puede utilizarse para erradicar una célula normal que expresa un antígeno tumoral como se describe en el presente documento, por lo que es aplicable para su uso como terapia de acondicionamiento celular antes del trasplante de células.

Fuentes de células efectoras inmunitarias

45 En las realizaciones, antes de la expansión y modificación genética u otras modificaciones, se puede adquirir, p. ej., obtener, una fuente de células, p. ej., linfocitos T o linfocitos citolíticos naturales (NK), p. ej., una población de linfocitos T o linfocitos NK, de un sujeto. El término «sujeto» pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (p. ej., mamíferos). Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, monos, chimpancés, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de estos. Los linfocitos T pueden obtenerse de varias fuentes, que incluyen células mononucleares de la sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores.

50 En algunas realizaciones, una población de células, p. ej., una población de células recolectadas, comprende un linfocito T o población de linfocitos T, p. ej., en diversas etapas de diferenciación. Las etapas de la diferenciación de los linfocitos T incluyen linfocitos T vírgenes, linfocitos T de memoria central madre, linfocitos T de memoria central, linfocitos T de memoria efectoras y linfocitos T efectoras terminales, de menos a más diferenciados. Después de la exposición al antígeno, los linfocitos T vírgenes proliferan y se diferencian en linfocitos T de memoria, p. ej., linfocitos T de memoria central madre y linfocitos T de memoria central, que a continuación se diferencian en linfocitos T de memoria efectoras. Tras recibir señales inflamatorias, coestimuladoras y del receptor de linfocitos T, los linfocitos T de memoria se diferencian adicionalmente en linfocitos T efectoras terminales. Véase, p. ej., *Restifo Blood*. 124.4(2014):476-77; y Joshi *et al.*, *J. Immunol.* 180.3(2008):1309-15.

60 Los linfocitos T vírgenes (T_N) se caracterizan por el siguiente patrón de expresión de marcadores de la superficie celular: CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95-. Los linfocitos T de memoria central madre (T_{SCM}) se caracterizan por el siguiente patrón de expresión de marcadores de la superficie celular: CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95+. Los linfocitos T de memoria central (T_{CM}) se caracterizan por el siguiente patrón de expresión de marcadores de la superficie celular: CCR7+,

CD62L+, CD45RO+, CD95+. Los linfocitos T de memoria efectores (T_{EM}) se caracterizan por el siguiente patrón de expresión de marcadores de la superficie celular: CCR7-, CD62L-, CD45RO+, CD95+. Los linfocitos T efectores terminales (T_{EF}) se caracterizan por el siguiente patrón de expresión de marcadores de la superficie celular: CCR7-, CD62L-, CD45RO-, CD95+. Véase, p. ej., Gattinoni *et al.*, *Nat. Med.* 17(2011):1290-7; y Flynn *et al.*, *Clin. Translat. Immunol.* 3(2014):e20.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, las células efectoras inmunitarias, p. ej., linfocitos T, pueden obtenerse de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquiera de varias técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como la separación con Ficoll™. En un aspecto preferido, se obtienen células de la sangre circulante de un individuo por aféresis. El producto de aféresis contiene típicamente linfocitos, incluidos linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y, opcionalmente, colocar las células en un tampón o medio apropiado para los pasos de procesamiento posteriores. En una realización, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado está exenta de calcio y puede estar exenta de magnesio o puede estar exenta de muchos, si no todos, cationes divalentes.

Los pasos de activación iniciales en ausencia de calcio pueden dar lugar a una activación ampliada. Como los expertos ordinarios en la técnica apreciarían fácilmente, una etapa de lavado se puede lograr mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como utilizando una centrifuga semiautomática de «flujo continuo» (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, el Baxter CytoMate o el Haemonetics Cell Saver 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en diversos tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS exento de Ca, exento de Mg, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis se pueden separar y las células resuspender directamente en medios de cultivo.

Se reconoce que los métodos de aplicación pueden utilizar condiciones de medios de cultivo que comprenden un 5 % o menos, por ejemplo, un 2 %, de suero AB humano, y pueden emplear condiciones y composiciones de medios de cultivo conocidas, por ejemplo, las descritas en Smith *et al.*, "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" *Clinical & Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi: 10. 103 8/cti. 2014.3 1.

En un aspecto, los linfocitos T se aíslan de linfocitos de la sangre periférica lisando los glóbulos rojos y provocando una depleción de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o mediante elutriación centrífuga en contraflujo.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir, p. ej., la selección de una subpoblación específica de células efectoras inmunitarias, p. ej., linfocitos T, que son una población con depleción de linfocitos T reguladores, células con depleción de CD25+, utilizando, p. ej., una técnica de selección negativa, p. ej., descrita en el presente documento. Preferentemente, la población de células con depleción de linfocitos T reguladores contiene menos de un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+.

En una realización, los linfocitos T reguladores, p. ej., linfocitos T CD25+, se eliminan de la población utilizando un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, o un ligando de unión a CD25, p. ej., IL-2. En una realización, el anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, o ligando de unión a CD25 se conjuga con un sustrato, por ejemplo, una perla, o se utiliza para recubrir de otra manera un sustrato, p. ej., una perla. En una realización, el anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, se conjuga con un sustrato como se describe en el presente documento.

En una realización, los linfocitos T reguladores, p. ej., linfocitos T CD25+, se eliminan de la población utilizando un reactivo de depleción de CD25 de Miltenyi™. En una realización, la proporción de células respecto al reactivo de depleción de CD25 es de $1e7$ células respecto a 20 μ L, o de $1e7$ células respecto a 15 μ L, o de $1e7$ células respecto a 10 μ L, o de $1e7$ células respecto a 5 μ L, o de $1e7$ células respecto a 2,5 μ L, o de $1e7$ células respecto a 1,25 μ L. En una realización, por ejemplo, para linfocitos T reguladores, p. ej., con depleción de CD25+, se utilizan más de 500 millones de células/mL. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 600, 700, 800 o 900 millones de células/mL.

En una realización, la población de células efectoras inmunitarias que va a experimentar depleción incluye aproximadamente 6×10^9 linfocitos T CD25+. En otros aspectos, la población de células efectoras inmunitarias que va a experimentar depleción incluye aproximadamente de 1×10^9 a 1×10^{10} linfocitos T CD25+ y cualquier valor entero intermedio. En una realización, la población resultante de células con depleción de linfocitos T reguladores tiene 2×10^9 linfocitos T reguladores, p. ej., células CD25+, o menos (p. ej., 1×10^9 , 5×10^8 , 1×10^8 , 5×10^7 , 1×10^7 , o menos células CD25+).

En una realización, los linfocitos T reguladores, p. ej., células CD25+, se eliminan de la población utilizando el sistema CliniMAC con un conjunto de tubos de depleción tales como, p. ej., tubos 162-01. En una realización, el sistema CliniMAC se ejecuta en una configuración de depleción tal como, p. ej., DEPLETION2.1.

Sin desear ceñirse a una teoría en particular, la disminución del nivel de reguladores negativos de las células inmunitarias (p. ej., disminución del número de células inmunitarias no deseadas, p. ej., linfocitos T_{REG}) en un sujeto antes de la aféresis o durante la fabricación de un producto de tipo célula que expresa CAR reduce significativamente el riesgo de recaídas del sujeto. Por ejemplo, en la técnica existe constancia de métodos para la depleción de los linfocitos T_{REG}. Los métodos de reducción de linfocitos T_{REG} incluyen, entre otros, ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR (un anticuerpo anti-GITR descrito en el presente documento), depleción de CD25, y combinaciones de estos.

En algunas realizaciones, los métodos de fabricación comprenden reducir el número de (p. ej., depleción de) linfocitos T_{REG} antes de la fabricación de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, los métodos de fabricación comprenden poner en contacto la muestra, p. ej., la muestra de aféresis, con un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-CD25 (o un fragmento de este, o un ligando de unión a CD25), p. ej., para conseguir la depleción de los linfocitos T_{REG} antes de producir el producto de tipo célula que expresa CAR (p. ej., linfocito T, linfocito NK).

En una realización, se pretrata a un sujeto con una o más terapias que reducen los linfocitos T_{REG} antes de la recogida de células para la producción del producto de tipo célula que expresa CAR, y de esta manera se reduce el riesgo de que el sujeto experimente recaídas con el tratamiento con células que expresan CAR. En una realización, los métodos para reducir los linfocitos T_{REG} incluyen, entre otros, la administración al sujeto de uno o más de: ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25 o una combinación de estos. La administración de uno o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, depleción de CD25, o una combinación de estos, puede realizarse antes, durante o después de una infusión del producto de tipo célula que expresa CAR.

En una realización, se pretrata a un sujeto con ciclofosfamida antes de la recogida de células para la fabricación del producto de tipo célula que expresa CAR, y de esta manera se reduce el riesgo de que el sujeto experimente recaídas con el tratamiento con células que expresan CAR. En una realización, se pretrata a un sujeto con un anticuerpo anti-GITR antes de la recogida de células para la fabricación del producto de tipo célula que expresa CAR, y de esta manera se reduce el riesgo de que el sujeto experimente recaídas con el tratamiento con células que expresan CAR.

En una realización, la población de células que se van a eliminar no son linfocitos T reguladores ni células tumorales, sino células que afectan negativamente de otra manera a la expansión y/o función de los linfocitos CART, p. ej., células que expresan CD14, CD11b, CD33, CD15 u otros marcadores expresados por células potencialmente inmunosupresoras. En una realización, se contempla que tales células se eliminen a la vez que los linfocitos T reguladores y/o células tumorales, o tras dicha depleción, o en otro orden.

En una realización, el procedimiento de fabricación de una célula que expresa CAR (p. ej., linfocito T, linfocito NK) se modifica para conseguir la depleción de los linfocitos T_{REG} antes de la fabricación del producto de tipo célula (p. ej., linfocito T, linfocito NK) que expresa CAR (p. ej., un producto de tipo CTL019). En una realización, se utiliza la depleción de CD25 para conseguir la depleción de linfocitos T_{REG} antes de la fabricación del producto de tipo célula (p. ej., linfocito T, linfocito NK) que expresa CAR (p. ej., un producto CTL019).

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir más de un paso de selección, p. ej., más de un paso de depleción. El enriquecimiento de una población de linfocitos T mediante selección negativa se puede lograr, p. ej., con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores superficiales únicos para las células seleccionadas de manera negativa. Un método es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un combinado de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de la superficie celular presentes en las células seleccionadas de manera negativa. Por ejemplo, para enriquecer en células CD4⁺ por selección negativa, un combinado de anticuerpos monoclonales puede incluir anticuerpos contra CD14, CD20, CD11bb, CD16, HLA-DR y CD8.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además la eliminación de células de la población que expresan un tumor antigénico, p. ej., un tumor antigénico que no comprende CD25, p. ej., CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 o CD11b, para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., depleción de CD25⁺, y de células con depleción de antígenos tumorales que son adecuadas para la expresión de un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento. En una realización, las células que expresan un antígeno tumoral se eliminan simultáneamente que los linfocitos T reguladores, p. ej., CD25⁺. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, y un anticuerpo anti-antígeno tumoral, o fragmento de este, se pueden unir al mismo sustrato, p. ej., perla, que se puede utilizar para eliminar las células o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, o el anticuerpo anti-antígeno tumoral, o fragmento de este, se puede unir a perlas separadas, y una mezcla de estas se puede utilizar para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de linfocitos T reguladores, p. ej., células CD25⁺, y la eliminación de las células que expresan un antígeno tumoral es secuencial y puede ocurrir, p. ej., en cualquier orden.

También se proporcionan métodos que incluyen eliminar células de la población que expresan un inhibidor de un punto de control, p. ej., un inhibidor de un punto de control descrito en el presente documento, p. ej., una o más de células PD1⁺, células LAG3⁺ y células TIM3⁺, para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de linfocitos T, p. ej., células con depleción de CD25⁺ y células con depleción de un inhibidor de un punto de control, p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1,

CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFRbeta), p. ej., como se describe en el presente documento. En una realización, las células que expresan un inhibidor de un punto de control se eliminan simultáneamente con los linfocitos T reguladores, p. ej., CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, y un anticuerpo anti-inhibidor de un punto de control, o fragmento de este, se pueden unir a la misma perla, que se puede utilizar para eliminar las células o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento de este, y el anticuerpo anti-inhibidor de un punto de control, o fragmento de este, se pueden unir a perlas separadas, y puede utilizarse una mezcla de las cuales para eliminar las células. En otras realizaciones, la eliminación de linfocitos T reguladores, p. ej., células CD25+, y la eliminación de las células que expresan un inhibidor de un punto de control es secuencial y puede ocurrir, p. ej., en cualquier orden.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir un paso de selección positiva. Por ejemplo, pueden aislarse linfocitos T mediante incubación con perlas conjugadas con anti-CD3/anti-CD28 (p. ej., 3x28), tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de los linfocitos T deseados. En una realización, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En una realización adicional, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros intermedios. En otra realización, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En otra realización más, el período de tiempo es de 10 a 24 horas, p. ej., 24 horas. Se pueden utilizar tiempos de incubación más largos para aislar linfocitos T en cualquier situación en la que haya pocos linfocitos T en comparación con otros tipos de células, tal como en el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, por sus siglas en inglés) del tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más prolongados puede aumentar la eficiencia de captura de los linfocitos T CD8+. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo en que se permite que los linfocitos T se unan a las perlas de CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la proporción de perlas respecto a linfocitos T (tal como se describe más adelante en el presente documento), se puede seleccionar preferentemente, a favor o en contra de, subpoblaciones de linfocitos T en el inicio del cultivo o en otros puntos temporales durante el proceso. Adicionalmente, al aumentar o disminuir la proporción de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, se puede seleccionar preferentemente, a favor o en contra de, subpoblaciones de linfocitos T en el inicio del cultivo o en otros puntos temporales deseados.

En una realización, se puede seleccionar una población de linfocitos T que expresa uno o más de: IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B y perforina, u otras moléculas apropiadas, p. ej., otras citocinas. Se pueden determinar métodos para el cribado de la expresión celular, p. ej., según los métodos descritos en la Publicación PCT N.º: WO 2013/126712.

Para el aislamiento de una población de células deseada mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y superficie (p. ej., partículas tales como perlas). En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (p. ej., aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las perlas. Por ejemplo, en un aspecto, se usa una concentración de 10 mil millones de células/mL, 9 mil millones/mL, 8 mil millones/mL, 7 mil millones/mL, 6 mil millones/mL o 5 mil millones/mL. En un aspecto, se usa una concentración de mil millones de células/mL. En un aspecto más, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/mL. En aspectos adicionales, pueden usarse concentraciones de 125 o 150 millones de células/mL.

El uso de concentraciones elevadas puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficaz de las células que puedan expresar débilmente antígenos diana de interés, tales como linfocitos T negativos para CD28, o de muestras en las que hay muchas células tumorales presentes (p. ej., sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Tales poblaciones de células pueden tener un valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de linfocitos T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

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

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

En una realización, una pluralidad de las células efectoras inmunitarias de la población no expresa la diacilglicerol·cinosina (DGK), p. ej., es deficiente en DGK. En una realización, una pluralidad de las células efectoras inmunitarias de la población no expresa Ikaros, p. ej., es deficiente en Ikaros. En una realización, una pluralidad de las células efectoras inmunitarias de la población no expresa DGK e Ikaros, p. ej., es deficiente en DGK e Ikaros.

Los linfocitos T para la estimulación también se pueden congelar después de un paso de lavado. Sin desear ceñirse a la teoría, el paso de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al separar granulocitos y, en cierta medida, monocitos en la población celular. Después del paso de lavado que elimina plasma y plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien muchas soluciones y parámetros de congelación son conocidos en la técnica y serán útiles en este contexto, un método conlleva el uso de PBS que contiene un 20 % de DMSO y un 8 % de albúmina de suero humano, o medios de cultivo que contienen un 10 % de Dextrano 40 y un 5 % de Dextrosa, un 20 % de Albúmina de Suero Humano y un 7,5 % de DMSO, o un 31,25 % de Plasmalyte-A, un 31,25 % de Dextrosa al 5 %, un 0,45 % de NaCl, un 10 % de Dextrano 40 y un 5 % de Dextrosa, un 20 % de Albúmina de Suero Humano y un 7,5 % de DMSO u otros medios de congelación celular adecuados que contienen, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A, las células se congelan después a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlada, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

En ciertos aspectos, las células crioconservadas se descongelan y lavan como se describe en el presente documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación utilizando los métodos de la presente divulgación.

También se contempla en el contexto de la invención la extracción de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior al momento en que se podrían necesitar las células expandidas como se describen en el presente documento. Como tal, la fuente de las células que se va a expandir se puede recoger en cualquier momento necesario y las células deseadas, tales como linfocitos T, se pueden aislar y congelar para su uso posterior en la terapia con células efectoras inmunitarias para cualquiera de varias enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia con células efectoras inmunitarias, tales como las descritas en el presente documento. En un aspecto, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En ciertos aspectos, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y congelan para su uso posterior. En determinados aspectos, los linfocitos T pueden expandirse, congelarse y usarse en un momento posterior. En ciertos aspectos, se recogen muestras de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular tal como se describe en el presente documento, pero antes de cualesquiera tratamientos. En un aspecto adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o de una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, entre otros, tratamiento con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antiviricos, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes immunoablativos, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación.

En un aspecto adicional de la presente invención, los linfocitos T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento que deja al sujeto con linfocitos T funcionales. A este respecto, se ha observado que después de ciertos tratamientos contra el cáncer, en particular los tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el período en que los pacientes normalmente se recuperarían del tratamiento, la calidad de los linfocitos T obtenidos puede ser óptima o mejorada en lo que respecta a su capacidad de expandirse *ex vivo*. Del mismo modo, después de la manipulación *ex vivo* utilizando los métodos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para un mejor injerto y expansión *in vivo*. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente invención recoger células de la sangre, incluidos linfocitos T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en ciertos aspectos, la movilización (por ejemplo, la movilización con GM-CSF) y las pautas de acondicionamiento se pueden usar para crear una condición en un sujeto en donde se favorezca la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos de células particulares, especialmente durante una ventana de tiempo definida después de la terapia. Los tipos ilustrativos de células incluyen linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

En una realización, las células efectoras inmunitarias que expresan una molécula CAR, p. ej., una molécula CAR descrita en el presente documento, se obtienen de un sujeto que ha recibido una dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR. En una realización, la población de células efectoras inmunitarias, p. ej., linfocitos T, que se va a modificar para expresar un CAR, se recolecta después de un tiempo suficiente, o después de una dosificación suficiente con la dosis baja, de potenciación inmunitaria, de un inhibidor de mTOR, de modo que el nivel de células efectoras inmunitarias negativas para PD1, p. ej., linfocitos T, o la proporción de células efectoras inmunitarias negativas para PD1, p. ej., linfocitos T/células efectoras inmunitarias positivas para PD1, p. ej., linfocitos T, en el sujeto o recolectadas del sujeto se haya incrementado, al menos de manera transitoria.

En otras realizaciones, la población de células efectoras inmunitarias, p. ej., linfocitos T, que se han modificado o se modificarán para expresar un CAR, se pueden tratar *ex vivo* por contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que incrementa el número de células efectoras inmunitarias negativas para PD1, p. ej., linfocitos T, o incrementa la proporción de células efectoras inmunitarias negativas para PD1, p. ej., linfocitos T/células efectoras inmunitarias positivas para PD1, p. ej., linfocitos T.

5 Se reconoce que los métodos de aplicación pueden utilizar condiciones de medios de cultivo que comprenden un 5 % o menos, por ejemplo, un 2 %, de suero AB humano, y pueden emplear condiciones y composiciones de medios de cultivo conocidas, por ejemplo, las descritas en Smith *et al.*, "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" *Clinical & Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi: 10.1038/cti.2014.31.

10 En una realización, una población de linfocitos T es deficiente en diacilglicerol 3-cinasa (DGK). Las células deficientes en DGK incluyen células que no expresan ARN o proteína de DGK, o tienen una reducción o inhibición de la actividad de DGK. Las células deficientes en DGK se pueden generar mediante estrategias genéticas, p. ej., administración de agentes de interferencia por ARN, por ejemplo, ARNip, ARNhc, ARNmi, para reducir o prevenir la expresión de DGK. Como alternativa, las células deficientes en DGK se pueden generar mediante tratamiento con los inhibidores de DGK descritos en el presente documento.

15 En una realización, una población de linfocitos T es deficiente en Ikaros. Las células deficientes en Ikaros incluyen células que no expresan ARN o proteína de Ikaros, o tienen una reducción o inhibición de la actividad de Ikaros, las células deficientes en Ikaros se pueden generar mediante estrategias genéticas, p. ej., administrando agentes de interferencia por ARN, p. ej., ARNip, ARNhc, miARN, para reducir o evitar la expresión de Ikaros. Como alternativa, las células deficientes en Ikaros se pueden generar mediante tratamiento con inhibidores de Ikaros, p. ej., lenalidomida.

20 En las realizaciones, una población de linfocitos T es deficiente en DGK y deficiente en Ikaros, p. ej., no expresa DGK ni Ikaros, o tiene una reducción o inhibición de la actividad de DGK e Ikaros. Las células deficientes en DGK e Ikaros de este tipo se pueden generar mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

25 En una realización, los linfocitos NK se obtienen del sujeto. En otro caso, los linfocitos NK son una línea celular NK, p. ej., la línea celular NK-92 (Conkwest).

CAR alogénico

30 En algunos casos descritos en el presente documento, la célula efectora inmunitaria puede ser una célula efectora inmunitaria alogénica, p. ej., un linfocito T o un linfocito NK. Por ejemplo, la célula puede ser un linfocito T alogénico, p. ej., un linfocito T alogénico que carece de expresión de un receptor de linfocito T (TCR) funcional y/o antígeno leucocitario humano (HLA), p. ej., HLA de clase I y/o HLA de clase II.

35 Un linfocito T que carece de un TCR funcional se puede, p. ej., modificar de manera que no exprese ningún TCR funcional en su superficie, modificar de manera que no exprese una o más subunidades que comprenden un TCR funcional (p. ej., modificar de manera que no exprese (o muestre una expresión reducida) de TCR alfa, TCR beta, TCR gamma, TCR delta, TCR épsilon y/o TCR zeta) o modificar de manera que produzca muy poco TCR funcional en su superficie. Como alternativa, el linfocito T puede expresar un TCR sustancialmente alterado, p. ej., por expresión de formas mutadas o truncadas de una o más subunidades del TCR. La expresión «TCR sustancialmente alterado» significa que este TCR no suscita una reacción inmunitaria adversa en un hospedador.

40 Un linfocito T descrito en el presente documento se puede, p. ej., modificar de manera que no exprese un HLA funcional en su superficie. Por ejemplo, un linfocito T descrito en el presente documento, se puede modificar de modo que la expresión en la superficie celular de HLA, p. ej., HLA de clase I y/o HLA de clase II, experimente una disminución regulada. En algunas realizaciones, la disminución regulada de HLA se puede lograr reduciendo o eliminando la expresión de microglobulina beta-2 (B2M).

45 En algunas realizaciones, el linfocito T puede carecer de un TCR funcional y un HLA funcional, p. ej., HLA de clase I y/o HLA de clase II.

50 Los linfocitos T modificados que carecen de un TCR y/o HLA funcionales se pueden obtener mediante cualquier medio adecuado, incluida la supresión o disminución de una o más subunidades de TCR o HLA. Por ejemplo, el linfocito T puede incluir una disminución de TCR y/o HLA utilizando ARNip, ARNhc, grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR, por sus siglas en inglés), nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN, por sus siglas en inglés) o endonucleasa con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés).

55 En algunos casos, la célula alogénica puede ser una célula que no expresa o expresa en niveles bajos una molécula inhibidora, p. ej., mediante cualquier método descrito en el presente documento. Por ejemplo, la célula puede ser una célula que no expresa o expresa con niveles bajos una molécula inhibidora, p. ej., que puede reducir la capacidad de una célula que expresa CAR para organizar una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. La inhibición de una molécula inhibidora, p. ej., por inhibición a nivel de ADN, ARN o proteínas, puede optimizar el comportamiento de una célula que expresa CAR. En algunas realizaciones, se puede utilizar un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ARNbc, p. ej., un ARNip o ARNhc, grupos

de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR), nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) o endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), p. ej., como se describe en el presente documento.

ARNip y ARNhc para inhibir TCR o HLA

5 En algunas realizaciones, se puede inhibir la expresión de TCR y/o la expresión de HLA utilizando ARNip o ARNhc que tiene como diana un ácido nucleico que codifica un TCR y/o HLA, y/o una molécula inhibidora descrita en la presente (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina, y TGFR beta), en una célula, p. ej., linfocito T. Se describen sistemas de expresión para ARNip y ARNhc, y ARNhc de ejemplo, p. ej., en los párrafos 649 y 650 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

CRISPR para inhibir TCR o HLA

15 Tal como se utilizan en el presente documento, «CRISPR» o «CRISPR con respecto a TCR y/o HLA» o «CRISPR para inhibir TCR y/o HLA» se refieren a un conjunto de grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares, o un sistema que comprende un conjunto de repeticiones de este tipo. «Cas», tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína asociada a CRISPR. Un sistema «CRISPR/Cas» se refiere a un sistema que se obtiene a partir de CRISPR y Cas que se puede utilizar para silenciar o mutar un gen de TCR y/o HLA, y/o una molécula inhibidora descrita en la presente (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina, y TGFR beta), en una célula, p. ej., linfocito T.

25 El sistema CRISPR/Cas y usos de este se describen, p. ej., en los párrafos 651-658 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

TALEN para inhibir TCR y/o HLA

30 La expresión «TALEN» o «TALEN contra HLA y/o TCR» o «TALEN para inhibir HLA y/o TCR» se refiere a una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción, una nucleasa artificial que se puede utilizar para editar el gen de HLA y/o TCR, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta), en una célula, p. ej., linfocito T.

TALEN y usos de esta se describen, p. ej., en los párrafos 659-665 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

Nucleasa con dedos de zinc para inhibir HLA y/o TCR

45 La expresión «ZFN» o «nucleasa con dedos de zinc» o «ZFN contra HLA y/o TCR» o «ZFN para inhibir HLA y/o TCR» se refiere a una nucleasa con dedos de zinc, una nucleasa artificial que se puede utilizar para editar el gen de HLA y/o TCR, y/o una molécula inhibidora descrita en el presente documento (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta), en una célula, p. ej., linfocito T.

50 Las ZFN y usos de estas se describen, p. ej., en los párrafos 666-671 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

Expresión de Telomerasas

55 Los telómeros desempeñan una función crucial en la persistencia de las células somáticas y su longitud está mantenida por la telomerasa (TERT). La longitud de los telómeros en las células de LLC puede ser muy corta (Roth *et al.*, "Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70+/CD38 chronic lymphocytic leukaemia" *British Journal of Haematology*, 143, 383-386, 28 de agosto de 2008), y puede ser aún más corta en las células que expresan CAR producidas, p. ej., linfocitos CART19, lo que limita su potencial de expansión después de la transferencia adoptiva a un paciente. La expresión de la telomerasa puede rescatar a las células que expresan CAR del agotamiento replicativo.

60 Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, en algunas realizaciones, un linfocito T terapéutico tiene una persistencia poco prolongada en un paciente, debido al acortamiento de los telómeros en el linfocito T; por consiguiente, la transfección con un gen de telomerasa puede alargar los telómeros del linfocito T y mejorar la persistencia del linfocito T en el paciente. Véase Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", *Journal of Clinical Investigation*, 117: 1466-1476 (2007).
65 Por lo tanto, en una realización, una célula efectora inmunitaria, p. ej., un linfocito T, expresa de manera ectópica una

5 subunidad de telomerasa, p. ej., la subunidad catalítica de la telomerasa, p. ej., TERT, p. ej., hTERT. En algunos aspectos, esta divulgación proporciona un método para producir una célula que expresa CAR, que comprende poner en contacto una célula con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., la subunidad catalítica de la telomerasa, p. ej., TERT, p. ej., hTERT. La célula se puede poner en contacto con el ácido nucleico antes, a la vez o después de ponerse en contacto con un constructo que codifica un CAR.

10 La expresión de la telomerasa puede ser estable (p. ej., el ácido nucleico se puede integrar en el genoma de la célula) o transitoria (p. ej., el ácido nucleico no se integra y la expresión se reduce después de un período de tiempo, p. ej., varios días). La expresión estable se puede conseguir mediante la transfección o transducción de la célula con ADN que codifica la subunidad de la telomerasa y un marcador seleccionable, y la selección de los integrantes estables. Como alternativa o en combinación, la expresión estable se puede conseguir mediante la recombinación específica del sitio, p. ej., utilizando el sistema Cre/Lox o FLP/FRT.

15 La expresión transitoria puede conllevar la transfección o transducción con un ácido nucleico, p. ej., ADN o ARN tal como ARNm. En algunas realizaciones, la transfección transitoria con ARNm evita la inestabilidad genética asociada a veces con la transfección estable con TERT. La expresión transitoria de la actividad de la telomerasa exógena se describe, p. ej., en la Solicitud Internacional WO2014/130909. En las realizaciones, la transfección con ARNm de una subunidad de la telomerasa se realizará de acuerdo con la plataforma de ARN Therapeutics™ comercializada por Moderna Therapeutics. Por ejemplo, el método puede ser un método descrito en las Patentes de EE. UU. N.ºs 8710200, 8822663, 8680069, 20 8754062, 8664194 o 8680069.

25 En una realización, hTERT tiene la secuencia de aminoácidos de la Proteína GenBank ID AAC51724.1 (Meyerson *et al.*, «hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization» *Cell* volumen 90, número 4, 22 de agosto de 1997, páginas 785-795):

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLP L A T F V R R L G P Q G W R L V Q R G D P
 A A F R A L V A Q C L V C P W D A R P P P A A P S F R Q V S C L K E L V A R V L Q R L C E R G A K N V L A F G F A
 L L D G A R G G P P E A F T T S V R S Y L P N T V T D A L R G S G A W G L L L R R V G D D V L V H L L A R C A L F V
 L V A P S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P P H A S G P R R R L G C E R A W N H S V R E A G V P L G L P A
 P G A R R R G G S A S R S L P L P K R P R R G A A P E P E R T P V G Q G S W A H P G R T R G P S D R G F C V V S P A
 R P A E E A T S L E G A L S G T R H S H P S V G R Q H H A G P P S T S R P P R P W D T P C P P V Y A E T K H F L Y S
 S G D K E Q L R P S F L L S S L R P S L T G A R R L V E T I F L G S R P W M P G T P R R L P R L P Q R Y W Q M R P L
 F L E L L G N H A Q C P Y G V L L K T H C P L R A A V T P A A G V C A R E K P Q G S V A A P E E E D T D P R R L V Q
 L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A C L R R L V P P G L W G S R H N E R R F L R N T K K F I S L G K H A K L S L Q E L
 T W K M S V R G C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T
 T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I
 P K P D G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E R A R R P G L L G A S V L G
 L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F V K V D V T G A Y D T I P Q D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C
 V R R Y A V V Q K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D A V V I E Q S S S L
 N E A S S G L F D V F L R F M C H H A V R I R G K S Y V Q C G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M E N K L F A G
 I R R D G L L L R L V D D F L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P V E D E A L
 G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S S Y A R T S I R A S L T F N R G F K A G R N M R R
 K L F G V L R L K C H S L F L D L Q V N S L Q T V C T N I Y K I L L L Q A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q V W K N P T
 F F L R V I S D T A S L C Y S I L K A K N A G M S L G A K G A A G P L P S E A V Q W L C H Q A F L L K L T R H R V T
 Y V P L L G S L R T A Q T Q L S R K L P G T T L T A L E A A A N P A L P S D F K T I L D
 (SEQ ID NO: 5)

En una realización, la hTERT tiene una secuencia al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 5. En una realización, la hTERT tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 5. En una realización, la hTERT comprende una delección (p. ej., de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el extremo N, el extremo C o ambos. En una realización, la hTERT comprende una secuencia de aminoácidos transgénica (p. ej., de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el extremo N, el extremo C o ambos.

En una realización, la hTERT está codificada por la secuencia de ácido nucleico de GenBank N.º de acceso AF018167 (Meyerson *et al.*, «hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization» *Cell* volumen 90, número 4, 22 de agosto de 1997, páginas 785-795):

10

```

1  caggcagcgt  ggtcctgctg  cgcacgtggg  aagccctggc  ccgggccacc  cccgcgatgc
61  cgcgcgctcc  ccgctgcccga  gccgtgctgc  cctgctgctg  cagccactac  cgcgaggtgc
121  tgccgctggc  caggttcgtg  cggcgctctg  ggccccaggg  ctggcggctg  gtgcagcgcg
181  gggaccgagg  ggcctttccgc  gcgctgggtg  cccagtgcct  ggtgtgctgt  ccctgggacg
241  cacggccgcc  ccccgccgcc  cctcctctcc  gccaggtgtc  ctgcctgaag  gagctgggtg
301  cccgagtgct  gcagaggctg  tgcgagcgcg  gcgcaagaa  cgtgctggcc  ttcgcttcg
361  cgtgctgga  cggggcccgc  gggggccccc  ccgaggcctt  caccaccagc  gtgcgagct
421  acctgccc  cagcgtgacc  gacgcactgc  gggggagcgg  ggcgtggggg  ctgctgttgc
481  gccgcgtggg  cgaagcgtg  ctggttcacc  tgctggcacg  ctgcgcctc  tttgtgctgg
541  tggtccag  ctgcgcctac  caggtgtgct  ggccgcctc  gtaccagctc  ggcgctgcca
601  ctgagcccg  gcccccgc  cagcctagtg  gacccogaag  gcgtctggga  tgcgaacggg
661  cctggaacca  tagcgtcagg  gagcccgggg  tccccctggg  cctgccagcc  ccgggtgcca
721  ggaggcggg  gggcagtgcc  agccgaagtc  tgccgttgcc  caagaggccc  aggcgtggcg
781  ctgcccctga  gccggagcgg  acgcccgttg  gccaggggtc  ctgggccacc  ccgggcaggg
841  cgcgtggacc  gactgaccgt  ggtttctgtg  ttgtgtcacc  tgccagacc  gccgaagaag
901  ccacctctt  ggagggtgct  ctctctggca  cgcgcactc  ccacctctc  gtggcccgcc
961  agcaccacgc  gggcccccca  tccacatcgc  ggccaaccag  tccctgggac  accccttgtc
1021  ccccggtgta  gcgagagacc  aagcacttcc  tctactctc  aggcgacaag  gagcagctgc
1081  ggccctcct  cctactcagc  tctctgagge  ccagcctgac  tggcgtctcg  aggcctctgg
1141  agaccatctt  tctgggttcc  agccctgga  tgccagggac  tccccgcagg  ttgccccgcc
1201  tgccccagcg  ctactggcaa  atgcggcccc  tgtttctgga  gctgcttggg  aaccacgcgc
1261  agtgccccta  cggggtgctc  ctcaagacgc  actgcccgtc  gcgagctgcg  gtcaccccag
1321  cagccggtgt  ctgtgcccgg  gagaagcccc  agggctctgt  ggccggcccc  gaggaggagg
1381  acacagacc  ccgtgcctcg  gtgcagctgc  tccgcaagca  cagcagcccc  tggcaggtgt
1441  acggcttctg  gccgcccctg  ctgcgcccgc  ttgtgcccc  aggcctctgg  ggcctcaggc
1501  acaacgaacg  ccgcttctc  aggaacacca  agaagtcat  ctccctgggg  aagcatgcca
1561  agctctcgt  gcaggagctg  acgtggaaga  tgagcgtgct  gggctgcgct  tggctgcgca
1621  ggagcccagg  ggttggtctg  gtccggcccg  cagagcaccg  tctgcgtgag  gagatcctgg
1681  ccaagttcct  gcactggctg  atgagtgctg  acgtcgtcga  gctgctcagg  tctttctttt
1741  atgtcacgga  gaccacgttt  caaaagaaca  ggctcttttt  ctaccggaag  agtgtctgga
1801  gcaagttgca  aagcattgga  atcagacagc  acttgaagag  ggtgcagctg  cgggagctgt
1861  cggaaagcaga  ggtcaggcag  catcggaag  ccaggcccgc  cctgctgacg  tccagactcc
1921  gcttcatccc  caagcctgac  gggctgcggc  cgattgtgaa  catggactac  gtcgtgggag
1981  ccagaacggt  ccgcagagaa  aagaggcccg  agcgtctcac  ctgcagggtg  aaggcactgt
2041  tcagcgtgct  caactacag  cgggcgcggc  gcccccgcct  cctgggcgcc  tctgtgctgg
2101  gcctggacga  tatccacagg  gccggcgcga  ccttctgctg  gcgtgtgctg  gccagggacc
2161  cgcgcctga  gctgtacttt  gtcaaggtgg  atgtgacggg  cgcgtacgac  accatcccc
2221  aggacaggct  cagggaggtc  atcgccagca  tcatcaaacc  ccagaacacg  tactcgtgct
2281  gtcggtatgc  cgtggtccag  aaggccgcgc  atgggcactg  ccgcaaggcc  tccaagagcc
2341  acgtctctac  cttgacagac  ctccagccgt  acatgcgaca  gttcgtggct  cacctgcagg
2401  agaccagccc  gctgagggat  gccgtcgtca  tcgagcagag  ctccctcctg  aatgaggcca
2461  gcagtgacct  ctccagcgtc  ttctacgct  tcatgtgcca  ccacgcctg  cgcacagggg
2521  gcaagtccta  cgtccagtc  caggggatcc  cgcagggctc  catcctctcc  acgctgctct
2581  gcagcctgtg  ctacggcgac  atggagaaca  agctgtttgc  ggggattcgg  cgggacgggc
2641  tgetcctgct  tttggtggat  gatttctgt  ttgtgacacc  tcacctcacc  cagcgaaaa
2701  ccttctcag  gaccctggtc  cgaggtgtcc  ctgagtatgg  ctgcgtgggt  aacttgcgga

```

```

2761 agacagtggt gaacttcct gtagaagac aggcctggg tggcacggc tttgttcaga
2821 tgccggcca cggctattc ccctggtgcg gcctgctgct ggataccgg accctggagg
2881 tgcagagcga ctactccagc tatgcccggg cctccatcag agccagtctc accttcaacc
2941 ggggttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggggctctg cggctgaagt
3001 gtcacagcct gttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacgggtgtc accaacatct
3061 acaagatcct cctgctgcag gogtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctcccatttc
3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tctgctgctg catctctgac acggcctccc
3181 tctgctactc catcctgaaa gccaaagaac cagggatgct gctggggggc aagggcgccg
3241 ccggcctctt gcctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc
3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tctgggggtc actcaggaca gccagacgc
3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gcccaaccgg
3421 cactgccttc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgccac agccaggccg
3481 agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccc ggctctacgt cccagggagg gagggcgccg
3541 ccacaccag gcccgaccg ctgggagctt gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct
3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc
3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc
3721 agggccagct tttcctcacc aggagccgg cttccactcc ccacatagga atagtccatc
3781 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgccctcctt tgccctccac ccccaccatc
3841 caggtggaga cctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaagggtg
3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaatggggg
3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa
4021 aaaaaaa

```

(SEQ ID NO: 8)

En una realización, la hTERT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 8. En una realización, la hTERT está codificada por un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 8.

Receptor de antígeno quimérico (CAR)

La presente invención se refiere a células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) que están modificados para contener uno o más CAR que dirigen las células efectoras inmunitarias al cáncer. Esto se logra mediante un dominio de unión al antígeno en el CAR que es específico para un antígeno paraneoplásico. Existen dos clases de antígenos paraneoplásicos (antígenos tumorales) que pueden ser la diana de los CAR descritos en el presente documento: (1) antígenos paraneoplásicos que se expresan en la superficie de las células cancerosas; y (2) antígenos paraneoplásicos que en sí mismos son intracelulares, sin embargo, un fragmento de dicho antígeno (péptido) se presenta en la superficie de las células cancerosas por MHC (complejo mayor de histocompatibilidad).

En consecuencia, una célula efectora inmunitaria, p. ej., obtenida por un método descrito en el presente documento, se puede modificar para contener un CAR que tiene como diana uno de los siguientes antígenos paraneoplásicos (antígenos tumorales): CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (también denominado subconjunto 1 de CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 y 19A24); molécula 1 similar a lectina de tipo C (CLL-1 o CLECL1); CD33; variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); maduración de linfocitos B de miembros de la familia de receptores de TNF (BCMA); antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAcα-Ser/Thr)); antígeno de membrana específico de próstata (PSMA); receptor huérfano de tipo tirosina·cinasa 1 (ROR1); tirosina·cinasa 3 de tipo Fms (FLT3); glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG72); CD38; CD44v6; antígeno carcinoembrionario (CEA); molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2); mesotelina; receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de células madre prostáticas (PSCA); proteasa serina 21 (testisina o PRSS21); receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); antígeno de Lewis(Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno embrionario 4 específico de etapa (SSEA-4); CD20; receptor de folato alfa; proteína tirosina·cinasa receptora ERBB2 (Her2/neu); Mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1); receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); molécula de adhesión de células neurales (NCAM); prostasa; fosfatasa ácida prostática (PAP); factor de elongación 2 mutado (ELF2M); efrina B2; proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP); receptor del factor insulínico de crecimiento 1 (receptor de IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); subunidad de proteasoma (prosoma, macropaina), tipo beta, 9 (LMP2); glucoproteína 100 (gp100); proteína de fusión de oncogén que consiste en la región de agrupamiento de puntos de ruptura (BCR) y el homólogo 1 del oncogén vírico de la leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl); tirosinasas; receptor 2 de efrina de tipo A (EphA2); fucosil GM1; molécula de adhesión de sialilo de Lewis (sLe); gangliósido GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2); receptor de folato beta; marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248); relacionado con el marcador endotelial tumoral 7 (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR); receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D); marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; cinasa de linfoma anaplásico (ALK); ácido polisiálico; específico de placenta 1 (PLAC1); porción de hexasacárido de glucoceramida globoH (GloboH); antígeno de diferenciación de glándula mamaria (NY-BR-1); uroplaquina 2 (UPK2); receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); panexina 3 (PANX3); receptor acoplado a proteína

G 20 (GPR20); complejo de antígeno de linfocitos 6, locus K 9 (LY6K); receptor olfativo 51E2 (OR51E2); Proteína de Marco de Lectura Alternativa TCR Gamma (TARP); proteína del tumor de Wilms (WT1); antígeno de cáncer/testículo 1 (NY-ESO-1); antígeno de cáncer/testículo 2 (LAGE-1a); antígeno 1 asociado al melanoma (MAGE-A1); gen 6 variante de translocación de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); proteína de espermatozoide 17 (SPA17); familia de antígenos X, miembro 1A (XAGE1); receptor de superficie celular de unión a angiopoyetina 2 (Tie 2); antígeno de testículo y cáncer melanoma 1 (MAD-CT-1); antígeno de testículo y cáncer melanoma 2 (MAD-CT-2); antígeno 1 relacionado con Fos; proteína tumoral p53 (p53); p53 mutada; proteína; survivina; telomerasa; antígeno tumoral de carcinoma de próstata-1 (PCTA-1 o Galectina 8), antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T 1 (MelanA o MART1); mutante de sarcoma de rata (Ras); transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT); puntos de rotura de translocación de sarcoma; inhibidor de la apoptosis de melanoma (ML-IAP); ERG (proteasa transmembrana, gen de fusión de ETS y serina 2 (TMPRSS2)); N-acetilglucosaminil transferasa V (NA17); proteína de caja emparejada Pax-3 (PAX3); receptor de andrógenos; ciclina B1; homólogo derivado del neuroblastoma del oncogén vírico de la mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN); miembro C de la familia de homólogos de Ras (RhoC); proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2); citocromo P450 1B1 (CYP1B1); similar al factor de unión a CCCTC (proteína de dedo de zinc) (BORIS o hermano del regulador de sitios impresos), antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por linfocitos T 3 (SART3); proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1); proteína tirosina cinasa específica de linfocitos (LCK); proteína de anclaje A cinasa 4 (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto de rotura 2 de X (SSX2); receptor para productos finales de glucación avanzada (RAGE-1); renal ubicuo 1 (RU1); renal ubicuo 2 (RU2); legumaina; virus del papiloma humano E6 (VPH E6); virus del papiloma humano E7 (VPH E7); carboxil esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (hsp70-2 mut); CD79a; CD79b; CD72; receptor 1 de tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos (LAIR1); fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89); miembro 2 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina leucocitaria (LILRA2); miembro f de la familia de tipo molécula CD300 (CD300LF); miembro A de la familia 12 de dominios de lectina de tipo C (CLEC12A); antígeno 2 de células estromales de la médula ósea (BST2); tipo receptor de hormona de tipo mucina que contiene módulo de tipo EGF 2 (EMR2); antígeno de linfocitos 75 (LY75); Glipicano-3 (GPC3); proteína 5 similar al receptor Fc 5 (FCRL5); y el polipéptido 1 de tipo inmunoglobulina lambda (IGLL1).

En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad por dos antígenos como máximo. Una molécula de anticuerpo biespecífico está caracterizada por una primera secuencia del dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión por un primer epítipo y una segunda secuencia del dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión por un segundo epítipo. En una realización, el primer y segundo epítopos están en el mismo antígeno, p. ej., la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). En una realización, el primer y segundo epítopos se solapan. En una realización, el primer y segundo epítopos no se solapan. En una realización, el primer y segundo epítopos están en antígenos diferentes, p. ej., proteínas diferentes (o subunidades diferentes de una proteína multimérica). En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que tienen especificidad de unión por un primer epítipo y una secuencia del dominio variable de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de la cadena ligera que tienen especificidad de unión por un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende medio anticuerpo que tiene especificidad de unión por un primer epítipo y medio anticuerpo que tiene especificidad de unión por un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende medio anticuerpo, o un fragmento de este, que tiene especificidad de unión por un primer epítipo y medio anticuerpo, o un fragmento de este, que tiene especificidad de unión por un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un scFv, o un fragmento de este, que tiene especificidad de unión por un primer epítipo y un scFv, o un fragmento de este, que tiene especificidad de unión por un segundo epítipo.

En ciertas realizaciones, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífico (p. ej., uno biespecífico o uno trispecífico). Los protocolos para generar moléculas de anticuerpos biespecíficos o heterodiméricos, y diversas configuraciones para moléculas de anticuerpos biespecíficos, se describen, p. ej., en los párrafos 455-458 del documento WO2015/142675, presentado el 13 de marzo de 2015.

En un aspecto, la molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia del dominio variable de inmunoglobulina, p. ej., un scFv, que tiene especificidad de unión para CD19, p. ej., comprende un scFv como se describe en el presente documento, o comprende las CDR de la cadena ligera y/o las CDR de la cadena pesada de un scFv descrito en el presente documento y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo en un antígeno diferente.

TCR quimérico

En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación (p. ej., anticuerpos y fragmentos contra CD19) pueden injertarse en uno o más dominios constantes de una cadena del receptor de linfocitos T («TCR»), por ejemplo, una cadena alfa de TCR o beta de TCR, para crear un TCR quimérico. Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que los TCR quiméricos señalarán a través del complejo TCR tras la unión del antígeno. Por ejemplo, un scFv tal como se divulga en el presente documento, puede injertarse en el dominio constante, p. ej., al menos una porción del dominio constante extracelular, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático, de una cadena de TCR, por ejemplo, la cadena alfa de TCR y/o la cadena beta de TCR. Como otro ejemplo, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un dominio

VL como se describe en el presente documento, puede injertarse al dominio constante de una cadena alfa de TCR, y un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un dominio VH como se describe en el presente documento, puede injertarse al dominio constante de una cadena beta de TCR (o, como alternativa, un dominio VL puede injertarse en el dominio constante de la cadena beta de TCR y un dominio VH puede injertarse en una cadena alfa de TCR). Como otro ejemplo, las CDR de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden injertarse en una cadena alfa y/o beta de TCR para crear un TCR quimérico. Por ejemplo, las CDRL divulgadas en la presente se pueden injertar en el dominio variable de una cadena alfa de TCR y las CDRH divulgadas en la presente se pueden injertar en el dominio variable de una cadena beta de TCR, o viceversa. Tales TCR quiméricos pueden producirse, p. ej., mediante métodos conocidos en la técnica (Por ejemplo, Willemsen RA *et al.*, *Gene Therapy* 2000; 7: 1369-1377; Zhang T *et al.*, *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 487-496; Aggen *et al.*, *Gene Ther.* abril de 2012;19(4):365-74).

Armazones que no son de anticuerpos

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

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

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

Las células efectoras inmunitarias pueden comprender un constructo de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión al antígeno (p. ej., anticuerpo o fragmento de anticuerpo, TCR o fragmento de TCR) que se une específicamente a un antígeno tumoral, p. ej., un antígeno tumoral descrito en el presente documento, y un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimulador y/o un dominio de señalización primario, p. ej., una cadena zeta. El dominio de señalización coestimulador se refiere a una porción del CAR que comprende al menos una parte del dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Como se describe en otro punto, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir transducir una célula, p. ej., de la población de células con depleción de linfocitos T reguladores, con un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento.

En aspectos específicos, un CAR comprende un dominio de scFv, en donde el scFv puede estar precedido por una secuencia líder opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 1 y seguido por una secuencia bisagra opcional tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 23, una región transmembrana tal como se proporciona en la SEQ ID NO: 6, un dominio de señalización intracelular que incluye la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 16 y una secuencia CD3 zeta que incluye la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10, p. ej., en donde los dominios son contiguos y están en el mismo marco de lectura para formar una única proteína de fusión.

En un aspecto, un constructo de CAR de ejemplo comprende una secuencia líder opcional (p. ej., una secuencia líder descrita en el presente documento), un dominio de unión al antígeno extracelular (p. ej., un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento), una bisagra (p. ej., una región bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (p. ej., un dominio transmembrana descrito en el presente documento) y un dominio estimulador intracelular (p. ej., un dominio estimulador intracelular descrito en el presente documento). En un aspecto, un constructo de CAR de ejemplo comprende una secuencia líder opcional (p. ej., una secuencia líder descrita en el presente documento), un dominio de unión al antígeno extracelular (p. ej., un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento), una bisagra (p. ej., una región bisagra descrita en el presente documento), un dominio transmembrana (p. ej., un dominio transmembrana descrito en el presente documento), un dominio de señalización coestimulador intracelular (p. ej., un dominio de señalización coestimulador descrito en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario intracelular (p. ej., un dominio de señalización primario descrito en el presente documento).

Se proporciona una secuencia líder de ejemplo como la SEQ ID NO: 1. Se proporciona una secuencia de bisagra/espaciador de ejemplo como la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:36 o SEQ ID NO:23. Se proporciona una secuencia del dominio transmembrana de ejemplo como la SEQ ID NO: 6. Se proporciona una secuencia del dominio de señalización intracelular de la proteína 4-1BB de ejemplo como la SEQ ID NO: 7. Se proporciona una secuencia del dominio de señalización intracelular de CD27 de ejemplo como SEQ ID NO: 16. Se proporciona una secuencia del dominio de CD3zeta de ejemplo como la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

En un aspecto, la célula efectora inmunitaria comprende un constructo de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión al antígeno, en donde la secuencia es contigua a la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular y está en el mismo marco de lectura que esta. Un dominio de señalización intracelular de ejemplo que puede utilizarse en CAR incluye, entre otros, uno o más dominios de señalización intracelular de, p. ej., CD3-zeta, CD28, CD27, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener usando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, cribando bibliotecas de células que expresan la molécula de ácido nucleico, obteniendo la molécula de ácido nucleico de un vector que se sabe que la incluye o aislando directamente de células y tejidos que la contienen, usando técnicas convencionales. Como alternativa, el ácido nucleico de interés se puede producir por vías sintéticas, en lugar de clonarse.

Los ácidos nucleicos que codifican un CAR se pueden introducir en las células efectoras inmunitarias utilizando, p. ej., un constructo de vector retroviral o lentiviral.

Los ácidos nucleicos que codifican un CAR también se pueden introducir en la célula efectora inmunitaria utilizando, p. ej., un constructo de ARN que se puede transfectar directamente en una célula. Un método para generar ARNm para su uso en la transfección conlleva la transcripción *in vitro* (IVT, por sus siglas en inglés) de un molde con cebadores diseñados especialmente, seguido de la adición de poliA, para producir un constructo que contiene la secuencia no traducida («UTR», por sus siglas en inglés) en 3' y 5' (p. ej., una UTR en 3' y/o 5' descrita en el presente documento), una caperuza en 5' (p. ej., una caperuza en 5' descrita en el presente documento) y/o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) (p. ej., un IRES descrito en el presente documento), el ácido nucleico que se va a expresar y una cola de poliA, normalmente de 50-2000 bases de longitud (p. ej., descrita en la presente, p. ej., la SEQ ID NO:35). El ARN producido de esta puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En una realización, el molde incluye secuencias para el CAR. En una realización, un vector de ARN de CAR se utiliza para transducir una célula, p. ej., un linfocito T, por electroporación.

Dominio de unión al antígeno

En un aspecto, una pluralidad de las células efectoras inmunitarias, p. ej., la población de células con depleción de linfocitos T reguladores, incluyen un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende un elemento de unión específico para la diana denominado por lo demás dominio de unión al antígeno. La elección del elemento de unión depende del tipo y del número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como marcador de la superficie celular en células diana asociadas con una patología particular. Por tanto, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión al antígeno en un CAR descrito en el presente documento incluyen los asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias y células cancerosas.

En un aspecto, la porción del CAR que comprende el dominio de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno que se tiene como diana un antígeno tumoral, p. ej., un antígeno tumoral descrito en el presente documento.

El dominio de unión al antígeno puede ser cualquier dominio que se una al antígeno, incluidos, entre otros, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento funcional de estos, incluidos, entre otros, un anticuerpo de dominio único tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de nanocuerpo derivado de camélido, y a un armazón alternativo conocido en la técnica por actuar como dominio de unión al antígeno, tal como un dominio de fibronectina recombinante, un receptor de linfocitos T (TCR) o un fragmento de este, p. ej., TCR monocatenario, y similares. En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión al antígeno proceda de la misma especie en la que se usará finalmente el CAR. Por ejemplo, para su uso en seres humanos, puede ser beneficioso que el dominio de unión a antígeno del CAR comprenda residuos humanos o humanizados para el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo anti-CD19, o fragmento de este, p. ej., un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena variable ligera enumeradas en la **Tabla 1**. La secuencia conectora que une las cadenas variable pesada y variable ligera pueden ser, p. ej., cualquiera de las secuencias conectoras descritas en el presente documento o, como alternativa, puede ser GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 104).

Tabla 1: Dominios de unión de anticuerpos anti-CD19

ES 2 948 133 T3

			SEQ ID NO:
CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQA PRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVY FCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQES GPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGV IWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS	107
CD19	huscFv2	Eivmtqspatlsfspgeratlsctasqdiskylnwyyqqkpgqaprll iyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfcqqgntl pytfgqgkkleikggggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkps ltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslksr vtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqg tltvss	108
CD19	huscFv3	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglew igviwgsettyyssslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyy cahyyyggsyamdywgqgltvtvssggggsgggsgggsgggseivmtq spatlsfspgeratlsctasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsr lhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfcqqgntlp ytfqgkkleik	109
CD19	huscFv4	Qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglew igviwgsettyyqsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyy cahyyyggsyamdywgqgltvtvssggggsgggsgggsgggseivmtq spatlsfspgeratlsctasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsr lhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfcqqgntlp ytfqgkkleik	110
CD19	huscFv5	Eivmtqspatlsfspgeratlsctasqdiskylnwyyqqkpgqaprll iyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfcqqgntl pytfgqgkkleikggggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvk pssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyy ssslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyam dywgqgltvtvss	111
CD19	huscFv6	Eivmtqspatlsfspgeratlsctasqdiskylnwyyqqkpgqaprll iyhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavyfcqqgntl pytfgqgkkleikggggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvk pssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyy qsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyam dywgqgltvtvss	112
CD19	huscFv7		113

ES 2 948 133 T3

			SEQ ID NO:
		Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgklew igviwgsettyysslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyy cakhyyyggsyamywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggse ivmtqspatlsispgeratlsctrasqdiskylnwyqqkpgqaprlli yhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlp ytfgggtkleik	
CD19	huscFv8	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgklew igviwgsettyyqsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyy cakhyyyggsyamywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggse ivmtqspatlsispgeratlsctrasqdiskylnwyqqkpgqaprlli yhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlp ytfgggtkleik	114
CD19	huscFv9	Eivmtqspatlsispgeratlsctrasqdiskylnwyqqkpgqaprll iyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlp pytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkp setlsltctvsgvslpdygvswirpppgklewigviwgsettyyns slksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamd ywgqgtlvtvss	115
CD19	Hu scFv10	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgklew igviwgsettyynsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyy cakhyyyggsyamywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggse	116
		ivmtqspatlsispgeratlsctrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliy htsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlp ytfgggtkleik	
CD19	Hu scFv11	Eivmtqspatlsispgeratlsctrasqdiskylnwyqqkpgqaprlli yhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlp ytfgggtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltc tvsgvslpdygvswirpppgklewigviwgsettyynsslksrvtis kdsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamywgqgtlvtv ss	117
CD19	Hu scFv12	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgklewi gviwgsettyynsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyyca khyyyggsyamywgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggseivmtqspa tlsispgeratlsctrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsg iparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlp ytfgggtkleik	118

			SEQ ID NO:
CD19	muCTL 019	<p>Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylwnwyqqkpdgtvklli yhtsrhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpy tfgggtkleitggggsgggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtc tvsgvslpdygvswirqprrkglewlgviwgsettyynsalksrlii kdnsksqvfllkmnslqtddtaiyycahyyggsyamywgqgtsvtv ss</p>	119
VH de anticuerpo	Secuencia	Secuencia de VL	
SSJ25-C1	<p>QVQLLESGAELVPRGSSVKISCKASGYAFSSY WMNWVKQRPGGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKF KGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYSC ARKTISSVVDYFDYWGQTTVT</p>	<p>ELVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGT NVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRF TSGSGGTDFLLTIITNVQSKDLADYFYFCQYN RYPYTSVGGGTKLEIKRRS</p>	
SEQ ID NO:	120	121	

Los constructos de CAR CD19 que contienen dominios de scFv anti-CD19 humanizados se describen en la publicación PCT WO 2014/153270.

5

Las secuencias de las secuencias CDR murinas y humanizadas de los dominios de scFv anti-CD19 se muestran en la **Tabla 7** para los dominios variables de la cadena pesada y en la **Tabla 8** para los dominios variables de la cadena ligera. "ID" representa la SEQ ID NO respectiva para cada CDR.

10

Tabla 7. CDR de dominio variable de la cadena pesada (Kabat) de anticuerpos contra CD19

Candidato	FW	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
CART19_murino		GVSLPDYGVVS	122	VIWGSETTYNSALKS	123	HYYYGGSYAMDY	127
CART19_a_humanizado	VH4	GVSLPDYGVVS	122	VIWGSETTYSSSLKS	124	HYYYGGSYAMDY	127
CART19b_humanizado	VH4	GVSLPDYGVVS	122	VIWGSETTYQSSLKS	125	HYYYGGSYAMDY	127
CART19_c_humanizado	VH4	GVSLPDYGVVS	122	VIWGSETTYNSSLKS	126	HYYYGGSYAMDY	127

Tabla 8. CDR de dominio variable de la cadena ligera de anticuerpos contra CD19

Candidato	FW	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
CART19_murino		RASQDISKYLN	128	HTSRLHS	129	QQGNTLPYT	130
CART19_a_humanizado	VK3	RASQDISKYLN	128	HTSRLHS	129	QQGNTLPYT	130
CART19_b_humanizado	VK3	RASQDISKYLN	128	HTSRLHS	129	QQGNTLPYT	130
CART19_c_humanizado	VK3	RASQDISKYLN	128	HTSRLHS	129	QQGNTLPYT	130

Cualquier CAR CD19 conocido, p. ej., el dominio de unión al antígeno CD19 de cualquier CAR CD19 conocido en la técnica, se puede utilizar de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, LG-740; el CAR CD19 descrito en la Patente de EE. UU. N.º 8 399 645, Patente de EE. UU. N.º 7 446 190; Xu *et al.*, *Leuk Lymphoma*. 2013 54(2):255-260(2012); Cruz *et al.*, *Blood* 122(17):2965-2973 (2013); Brentjens *et al.*, *Blood*, 118(18):4817-4828 (2011); Kochenderfer *et al.*, *Blood* 116(20):4099-102 (2010); Kochenderfer *et al.*, *Blood* 122 (25):4129-39(2013); y *16th Annu Meet Am Soc Gen Cell Ther* (ASGCT) (15-18 de mayo, Salt Lake City) 2013, Sumario 10.

15

20

En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo anti-BCMA, o fragmento de este, p. ej., un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena variable ligera

enumeradas en la Tabla 11. La secuencia conectora que une las cadenas variable pesada y variable ligera pueden ser, p. ej., cualquiera de las secuencias conectoras descritas en el presente documento. Los constructos de CAR anti-BCMA que contienen dominios de scFv anti-BCMA se describen en el presente documento, p. ej., en la Tabla 11 o en el documento US2016/0046724A1.

En las realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo anti-EGFRVIII, o fragmento de este, p. ej., un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena variable ligera descritas en el documento US2014/0322275A1. Los constructos de CAR anti-EGFRVIII que contienen dominios de scFv anti-EGFRVIII se describen en el presente documento, p. ej., en el documento US2014/0322275A1. En las realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo contra CD123, o fragmento de este, p. ej., un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena variable ligera descritas en el documento US2014/0322212A1 o US2016/0068601A1. Los constructos de CAR anti-CD123 que contienen dominios de scFv anti-CD123 se describen en el presente documento, p. ej., en el documento US2014/0322212A1 o US2016/0068601A1.

En las realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo anti-mesotelina, o fragmento de este, p. ej., un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena variable ligera descritas en el documento WO 2015/090230. Los constructos de CAR anti-mesotelina que contienen dominios de scFv anti-mesotelina se describen en el presente documento, p. ej., en el documento WO 2015/090230.

En las realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo anti-CLL1, o fragmento de este, p. ej., un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena variable ligera descritas en el documento US2016/0051651A1. Los constructos de CAR anti-CLL1 que contienen dominios de scFv anti-CLL1 se describen en el presente documento, p. ej., en el documento US2016/0051651A1.

En las realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo anti-CD33, o fragmento de este, p. ej., un scFv. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno comprende una cadena pesada variable y una cadena variable ligera descritas en el documento US2016/0096892A1. Los constructos de CAR anti-CD33 que contienen dominios de scFv anti-CD33 se describen en el presente documento, p. ej., en el documento US2016/0096892A1.

En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una, dos, tres (p. ej., las tres) CDR de la cadena pesada, HC CDR1, HC CDR2 and HC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente, y/o una, dos, tres (p. ej., las tres) CDR de la cadena ligera, LC CDR1, LC CDR2 and LC CDR3, de un anticuerpo enumerado anteriormente. En una realización, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo enumerado o descrito anteriormente.

En un aspecto, el dominio de unión al antígeno antitumoral es un fragmento, p. ej., un fragmento variable monocatenario (scFv). En un aspecto, el dominio de unión contra un antígeno paraneoplásico como se describe en el presente documento es un Fv, un Fab, un (Fab')₂ o un anticuerpo híbrido bifuncional (p. ej., biespecífico) (p. ej., Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de estos de la divulgación se unen a una proteína de un antígeno paraneoplásico como se describe en el presente documento con afinidad de tipo natural o potenciada.

En algunos casos, los scFv se pueden preparar de acuerdo con un método conocido en la técnica (véase, p. ej., Bird *et al.*, (1988) *Science* 242: 423-426 y Houston *et al.*, (1988) *Proc. Natl Acad. Sci. EE. UU.* 85:5879-5883). Se pueden producir moléculas de ScFv ligando las regiones VH y VL entre sí utilizando conectores polipeptídicos flexibles. Las moléculas de scFv comprenden un conector (p. ej., un conector de Ser-Gly) con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizadas. La longitud del conector puede afectar en gran medida la forma en que las regiones variables de un scFv se pliegan e interactúan. De hecho, si se emplea un conector polipeptídico corto (p. ej., entre 5-10 aminoácidos) se evita el plegamiento intracatenario. También se requiere plegamiento intercatenario para unir las dos regiones variables con el fin de formar un sitio de unión al epítipo funcional. Para consultar ejemplos de orientación del conector y tamaño, remítase, p. ej., a Hollinger *et al.* 1993 *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448, Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.ºs 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, y Publicaciones PCT N.ºs WO2006/020258 y WO2007/024715.

Un scFv puede comprender un conector de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos aminoacídicos entre sus regiones VL y VH. La secuencia conectora puede comprender cualquier aminoácido de origen natural. En algunas realizaciones, la secuencia conectora comprende los aminoácidos glicina y serina. En otra realización, la secuencia conectora comprende conjuntos de repeticiones de glicina y serina, tales como (Gly₄Ser)_n, en donde n es un número entero positivo igual a o mayor de 1 (SEQ ID NO: 26). En una realización, el conector puede ser (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 27) o (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 28). La variación en la longitud del conector puede conservar o potenciar la actividad, lo que da lugar a una eficacia superior en los estudios de actividad.

En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno es un receptor de linfocitos T («TCR»), o un fragmento de este, por ejemplo, un TCR monocatenario (scTCR). En la técnica se conocen métodos para fabricar tales TCR. Véanse, p. ej., Willemsen R. A. *et al.*, *Gene Therapy* 7: 1369-1377 (2000); Zhang T. *et al.*, *Cancer Gene Ther* 11: 487-496 (2004); Aggen *et al.*, *Gene Ther.* 19 (4): 365-74 (2012). Por ejemplo, se puede modificar un scTCR que contenga los genes Vα y Vβ a

partir de un clon de linfocitos T unido por un conector (p. ej., un péptido flexible). Este enfoque es muy útil para la diana asociada al cáncer que en sí misma es intracelular, sin embargo, el MHC presenta un fragmento de dicho antígeno (péptido) en la superficie de las células cancerosas.

5 Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, en diversas realizaciones, un CAR se puede diseñar para comprender un dominio transmembrana que esté unido al dominio extracelular del CAR. Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales adyacentes a la región de transmembrana, p. ej., uno o más aminoácidos asociados con la región extracelular de la proteína de la que procede el dominio transmembrana (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la cual procede la proteína transmembrana (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). En un aspecto, el dominio transmembrana es uno que está asociado con uno de los otros dominios del CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de la membrana superficial, p. ej., para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. En un aspecto, el dominio transmembrana tiene capacidad de homodimerización con otro CAR en la superficie celular de una célula que expresa CAR. En un aspecto diferente, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana puede modificarse o sustituirse con el fin de minimizar las interacciones con los dominios de unión del compañero de unión nativo presente en el mismo CART.

El dominio transmembrana puede proceder de una fuente natural o recombinante. Cuando la fuente es natural, el dominio puede proceder de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de señalar al dominio o los dominios intracelulares cada vez que el CAR se ha unido a una diana. Un dominio transmembrana de uso particular en esta invención puede incluir al menos la región o las regiones transmembrana de, p. ej., la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD27, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. En algunas realizaciones, un dominio transmembrana puede incluir al menos la región o las regiones transmembrana de, p. ej., KIR2DS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C.

En algunos casos, el dominio transmembrana se puede unir a la región extracelular del CAR, p. ej., el dominio de unión al antígeno del CAR, a través de una bisagra, p. ej., una bisagra de una proteína humana. Por ejemplo, en una realización, la bisagra puede ser una bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana, p. ej., una bisagra de IgG4 o una bisagra de CD8a. En una realización, la bisagra o el espaciador comprende (p. ej., consiste en) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En un aspecto, el dominio transmembrana comprende (p. ej., consiste en) un dominio transmembrana de la SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de IgG4. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos
 ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM (SEQ ID NO:36). En algunas realizaciones, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGG
 ACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA
 CCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCA
 GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGG
 GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA
 GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC
 AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG
 TGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
 CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC
 GGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA
 GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
 CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA
 GCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:37).

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de IgD. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos

5 RWPEPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET
 KTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG
 GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPQLPPQRLMALREPAAQA
 PVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG
 10 STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYYTDH (SEQ ID NO:23). En algunas realizaciones,
 la bisagra o el espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCA
 GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACT
 GGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGA
 GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC
 TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGT
 TTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGA
 GGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT
 CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCCCTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTC
 TGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG
 AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTG
 ATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCC
 AACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG
 CTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTC
 TTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACCTGTGTTGTGTC
 CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACG
 TGACTGACCATT (SEQ ID NO:24).

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

Opcionalmente, un conector oligo- o polipéptido corto, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar la unión entre el dominio transmembrana y la región citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un conector particularmente adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, el conector comprende la secuencia de aminoácidos de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 14). En algunas realizaciones, el conector está codificado por una secuencia de nucleótidos de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 19).

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

Dominio citoplasmático

El dominio o región citoplásmicos del CAR incluye un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular es generalmente responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha introducido el CAR. La expresión «función efectora» se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas. Por lo 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 realizar una función especializada. Aunque habitualmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar la cadena completa. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta, siempre que transduzca la señal de la función efectora. Por lo tanto, la expresión «dominio de señalización intracelular» pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

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

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

Un dominio de señalización primario regula la activación primaria del complejo TCR ya sea de una manera estimuladora o de una manera inhibitoria. Los dominios de señalización intracelular primarios 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 dominios de señalización intracelular primarios que contienen ITAM que son de especial uso en la invención incluyen aquellos de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En una realización, un CAR de uso en la invención comprende un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización primario de Cd3-zeta, p. ej., una secuencia de CD3-zeta descrita en el presente documento.

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

El dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o puede combinarse con cualquier otro dominio o dominios de señalización intracelulares deseados útiles en el contexto de un CAR de uso en la invención. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular de CAR puede comprender una porción de cadena zeta de CD3 y un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de la superficie celular distinta que no es un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficaz de los linfocitos frente a un antígeno. Los ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función linfocítica-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente a CD83, y similares. Por ejemplo, se ha demostrado que la coestimulación de CD27 potencia la expansión, la función efectora y la supervivencia de linfocitos CART humanos *in vitro* y aumenta la persistencia de linfocitos T humanos y la actividad antitumoral *in vivo* (Song *et al. Blood*. 2012; 119(3):696-706). Los ejemplos adicionales de tales moléculas coestimuladoras incluyen CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp30, NKp44, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103,

ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, NKG2D, NKG2C y PAG/Cbp.

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

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

En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En un aspecto, el dominio de señalización de 4-1BB es un dominio de señalización de la SEQ ID NO: 7. En un aspecto, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización de la SEQ ID NO: 9.

En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 comprende una secuencia de aminoácidos de QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO:16). En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 está codificado por una secuencia de ácido nucleico de

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC
GCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGAA
GCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:15).

Coexpresión de CAR con otras moléculas o agentes

Coexpresión de un segundo CAR

En un aspecto, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede comprender, además, un segundo CAR, p. ej., un segundo CAR que incluye un dominio de unión al antígeno diferente, p. ej., para la misma diana (p. ej., CD19) o una diana diferente (p. ej., una diana que no sea un antígeno paraneoplásico descrito en el presente documento, p. ej., CD19 o un antígeno paraneoplásico diferente descrito en el presente documento). En una realización, el segundo CAR incluye un dominio de unión al antígeno para una diana expresada en el mismo tipo de célula cancerosa que el antígeno paraneoplásico. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que tiene como diana un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador, pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que tiene como diana un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario, pero no un dominio de señalización coestimulador. Sin desear ceñirse a ninguna teoría, la colocación de un dominio de señalización coestimulador, p. ej., de 4-1BB, CD28, CD27, ICOS u OX-40, en el primer CAR, y el dominio de señalización primario, p. ej., de CD3 zeta, en el segundo CAR puede limitar la actividad CAR a las células en las que se expresan ambas dianas. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR de antígeno paraneoplásico que incluye un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno diana descrito en el presente documento, un dominio transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que tiene como diana un antígeno diana diferente (p. ej., un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario. En otra realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno diana descrito en el presente documento, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario y un segundo CAR que tiene como diana un antígeno distinto del primer antígeno diana (p. ej., un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión al antígeno contra el antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización coestimulador.

En una realización, la célula que expresa CAR comprende un XCAR descrito en el presente documento y un CAR inhibidor. En una realización, el CAR inhibidor comprende un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno que se encuentra en las células normales, pero no en las células cancerosas, p. ej., células normales que también expresan X.

5 En una realización, el CAR inhibidor comprende el dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula inhibidora. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR inhibidor puede ser un dominio intracelular de PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (por ejemplo, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, clase I de MHC, clase II de MHC, GAL9, adenosina o TGFR (p. ej., TGFRbeta).

10 En una realización, cuando la célula que expresa CAR comprende dos o más CAR diferentes, los dominios de unión al antígeno de los diferentes CAR pueden ser tales que los dominios de unión al antígeno no interactúen entre sí. Por ejemplo, una célula que expresa un primer y un segundo CAR puede tener un dominio de unión al antígeno del primer CAR, p. ej., como un fragmento, p. ej., un scFv, que no forma una asociación con el dominio de unión al antígeno del segundo CAR, p. ej., el dominio de unión al antígeno del segundo CAR es un VHH.

15 En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende moléculas de unión al antígeno de dominio único (SDAB, por sus siglas en inglés) que incluyen moléculas cuyas regiones determinantes de la complementariedad forman parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos incluyen, entre otros, dominios variables de la cadena pesada, moléculas de unión desprovistas de manera natural de cadenas ligeras, dominios únicos procedentes de anticuerpos de cadena 4 convencionales, dominios modificados y esqueletos de dominio único diferentes de aquellos procedentes de anticuerpos. Las moléculas SDAB pueden ser cualesquiera de la técnica, o cualesquiera moléculas de dominio único futuras. Las moléculas SDAB pueden proceder de cualquier especie que incluye, entre otros, ratón, ser humano, camello, llama, lamprea, pez, tiburón, cabra, conejo y bóvidos. El término también incluye moléculas de tipo anticuerpo de dominio único de especies diferentes de los tiburones y Camelidae.

20 En un aspecto, una molécula SDAB se puede obtener de una región variable de la inmunoglobulina presente en peces, tal como, por ejemplo, la que se obtiene a partir del isotipo de inmunoglobulina conocido como receptor de antígeno novedoso (NAR, por sus siglas en inglés) presente en el suero del tiburón. Los métodos para producir moléculas de dominio único que se obtienen de una región variable de NAR («IgNAR») se describen en el documento WO 03/014161 y en Streltsov (2005) *Protein Sci.* 14:2901-2909.

25 De acuerdo con otro aspecto, una molécula de SDAB es una molécula de unión al antígeno de dominio único de origen natural conocida como cadena pesada desprovista de cadenas ligeras. Se divulgan tales moléculas de dominio único en el documento WO 9404678 y en Hamers-Casterman, C. *et al.* (1993) *Nature* 363:446-448, por ejemplo. A efectos de claridad, este dominio variable que se obtiene de una molécula de cadena pesada desprovista de manera natural de la cadena ligera se conoce en la presente como un VHH o nanocuerpo para distinguirlo del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Una molécula VHH de este tipo se puede obtener de la especie Camelidae, por ejemplo, en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de Camelidae pueden producir moléculas de cadena pesada desprovistas de forma natural de la cadena ligera; las VHH de este tipo están dentro del alcance de la invención.

30 Las moléculas de SDAB pueden ser recombinantes, injertadas con CDR, humanizadas, camelizadas, desinmunizadas y/o generadas *in vitro* (p. ej., seleccionadas mediante presentación en fagos).

35 También se ha descubierto que en células que tienen una pluralidad de receptores integrados en la membrana quiméricos que comprenden un dominio de unión al antígeno las interacciones entre el dominio de unión al antígeno de los receptores pueden ser indeseables, p. ej., porque se inhibe la capacidad de uno o más de los dominios de unión al antígeno para unirse a su antígeno afín. En consecuencia, en el presente documento se divulgan células que tienen un primer y un segundo receptor integrado en la membrana quimérico de origen no natural que comprende dominios de unión al antígeno que minimizan tales interacciones. También se describen en el presente documento ácidos nucleicos que codifican un primer y un segundo receptor integrado en la membrana quimérico que no tiene un origen natural que comprende dominios de unión al antígeno que minimizan tales interacciones así como métodos para fabricar y utilizar tales células y ácidos nucleicos. En una realización, el dominio de unión al antígeno de uno del primer y el segundo receptores integrados en la membrana quiméricos que no tienen origen natural comprende un scFv, y el otro comprende un dominio de VH único, p. ej., un dominio de VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio de VH único derivado de una secuencia humana o de ratón.

40 En algunas realizaciones, la célula comprende un primer y un segundo CAR, en donde el dominio de unión al antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR no comprende un dominio ligero variable y un dominio pesado variable. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR es un scFv y el otro no es un scFv. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un único dominio de VH, p. ej., un único dominio de VH de camélido, tiburón o lamprea, o un único dominio de VH derivado de una secuencia humana o de ratón. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un nanocuerpo. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un dominio de VHH de camélido.

45 En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un scFv y el otro comprende un único dominio de VH, p. ej., un único dominio de VH de camélido, tiburón o lamprea, o un único

dominio de VH derivado de una secuencia humana o de ratón. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un scFv y el otro comprende un nanocuerpo. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un scFv y el otro comprende un dominio de VHH de camélido.

5

En algunas realizaciones, cuando está presente en la superficie de una célula, la unión del dominio de unión al antígeno del primer CAR a su antígeno afín no se ve reducida sustancialmente por la presencia del segundo CAR. En algunas realizaciones, la unión del dominio de unión al antígeno del primer CAR a su antígeno afín en presencia del segundo CAR es un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la unión del dominio de unión al antígeno del primer CAR a su antígeno afín en ausencia del segundo CAR.

10

En algunas realizaciones, cuando están presentes en la superficie de una célula, los dominios de unión al antígeno del primer CAR y del segundo CAR, se asocian entre sí menos que si ambos fueran dominios de unión al antígeno scFv. En algunas realizaciones, los dominios de unión al antígeno del primer CAR y del segundo CAR se asocian entre sí un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % menos que si ambos fueran dominios de unión al antígeno scFv.

15

Coexpresión de un agente que potencia la actividad del CAR

En otro aspecto, la célula que expresa el CAR descrita en el presente documento puede expresar además otro agente, p. ej., un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR.

20

Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de linfocitos T. Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, p. ej., PD1, pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de organizar una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina o TGFR beta.

25

En una realización, un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ARNbc, p. ej., un ARNip o ARNhc, grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR), una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) o una endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), p. ej., como se describe en el presente documento, puede utilizarse para inhibir la expresión de una molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T en la célula que expresa CAR. En una realización, el agente es un ARNhc, p. ej., un ARNhc descrito en el presente documento. En una realización, el agente que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T es inhibido dentro de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de una molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T está ligada al ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes, del CAR.

35

En una realización, una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T está ligada operablemente a un promotor, p. ej., un promotor obtenido a partir de H1 o U6, de modo que la molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T se expresa, p. ej., se expresa dentro de una célula que expresa CAR. Véanse, p. ej., Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA" Capítulo 3, en *Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA* (eds. Friedmann y Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU., 2007; Brummelkamp TR, *et al.* (2002) *Science* 296: 550-553; Miyagishi M, *et al.* (2002) *Nat. Biotechnol.* 19: 497-500. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T está presente en el mismo vector, p. ej., un vector lentivírico, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes, del CAR. En una realización de este tipo, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T está ubicada en el vector, p. ej., el vector lentivírico, en 5' o 3' respecto al ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes, del CAR. La molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T se puede transcribir en la misma dirección o en una dirección diferente al ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes del CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T está presente en un vector diferente al vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes, del CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T se expresa de manera transitoria dentro de una célula que expresa CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNbc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T está integrada de manera estable en el genoma de una célula que expresa CAR. En una realización, la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de los linfocitos T es PD-1.

60

En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, p. ej., de una molécula inhibidora tal como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos (p. ej., al menos una porción de un dominio extracelular de cualquiera de estos) y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej., que comprende un dominio coestimulador (p. ej., 41BB, CD27 o CD28, p. ej., como los descritos en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (p. ej., un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento de este (p. ej., al menos una porción de un dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej. un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento). PD1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en células mieloides, linfocitos T y linfocitos B activados (Agata *et al.* 1996 *Int. Immunol* 8:765-75). Se ha mostrado que dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 reducen de manera regulada la activación de linfocitos T tras unirse a PD1 (Freeman *et al.* 2000 *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman *et al.* 2001 *Nat Immunol* 2:261-8; Carter *et al.* 2002 *Eur J Immunol* 32:634-43). PD-L1 es abundante en los cánceres humanos (Dong *et al.* 2003 *J Mol Med* 81:281-7; Blank *et al.* 2005 *Cancer Immunol. Immunother* 54:307-314; Konishi *et al.* 2004 *Clin Cancer Res* 10:5094). La supresión inmunitaria puede invertirse inhibiendo la interacción local de PD1 con PD-L1.

En una realización, el agente comprende el dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de una molécula inhibidora, p. ej., Muerte Programada 1 (PD1), fusionada con un dominio transmembrana y dominios de señalización intracelulares tales como 41BB y CD3 zeta (a los que también se hace referencia en el presente documento como un CAR PD1). En una realización, el CAR PD1, cuando se utiliza en combinación con un XCAR descrito en el presente documento, mejora la persistencia del linfocito T. En una realización, el CAR es un CAR PD1 que comprende el dominio extracelular de PD1 indicado como subrayado en la SEQ ID NO: 105. En una realización, el CAR PD1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:105.

Malpvtallplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtgednatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaaf
pedrsqpgqdcfrfvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsrpagqfqlvttt
paprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqee
dgscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkma
eayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO:105).

En una realización, el CAR PD1 comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada a continuación (SEQ ID NO: 106).

pgwfldspdrpwnpptfspallvvtgednatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrfvrtqlp
ngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsrpagqfqlvttt
paprptpaptiasqplslr
peacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgscrfpeeeeggcelrv
kfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkgh
dglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO:106).

En una realización, el agente comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR PD1, p. ej., el CAR PD1 descrito en el presente documento. En una realización, la secuencia de ácido nucleico para el PD1 CAR se muestra a continuación, con el ECD PD1 subrayado a continuación en la SEQ ID NO: 103

atggccctcctgtcactgcctgtctccccctgcactcctgtccacgccgtagaccacccggatggttctggactctc
cgatcgcccgtggaatcccccaacctctcaccggcactcttggtgtgactgagggcgataatgcgacctcacgtgctcgttctccaa
cacctccgaatcattcgtgctgaactggtaccgcatgagcccgtcaaacagaccgacaagctcgccgcttccggaagatcggtcgc
aaccgggacaggattcgtcgttccgctgactcaactgccgaatggcagagacttcacatgagcgtggtccgcgtagggcgaacga
ctccgggacctacgtgctggagccatctcgtggcgcctaaaggcccaaatcaaaagagacttgaggccgaactgagatgaccga
gcgcagagctgaggtgccaaactgcacatccatccccatgcctcgcctcggggcagtttcagacctggtcacgaccactccggcg
 ccgccccaccgactccggcccccaactatcgcgagccagcccctgtcgtgaggccggaagcatgccgccctgccgccggaggtgc
 tgtgcataccggggattggacttcgatgcgacatctacattgggctcctctcgcggaaactgtggcgtgctccttctgtccctgtcat
 cacctgtactgcaagcggggtcgaaaaagctctgtacatttcaagcagccctcatgaggccctgcaaaccaccaggaggagg
 acggtgtcctcctgccggtccccgaaggaagaaggaggtgcgagctgcgcgtgaagttctccggagcggcagccccccgct
 ataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcgggaagagtacgatgtgctggacaagcggcgcggccg
 ggaccccgaatggcggggaagcctagaagaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgag
 gcctactccgaaattgggatgaaggagagcggcggaggggaaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccgccacca
 aggacacatagatgccctgcacatgcaggccctccccctcgc (SEQ ID NO: 103).

5 En una realización, el inhibidor de una señal inhibidora puede ser, p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se
 une a una molécula inhibidora. Por ejemplo, el agente puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une
 a PD1, PD-L1, PD-L2 o CTLA4 (p. ej., ipilimumab (al que también se hace referencia como MDX-010 y MDX-101, y
 comercializado como Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; Tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible de Pfizer,
 conocido anteriormente como ticilimumab, CP-675,206)). En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de
 10 anticuerpo que se une a TIM3. En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a
 LAG3. En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CEACAM (p. ej., CEACAM-
 1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5). En realizaciones, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR, p.
 ej., inhibidor de una molécula inhibidora, se administra combinado con un CAR alógeno, p. ej., un CAR alógeno descrito
 en la presente (p. ej., descrito en la sección de CAR alógeno de la presente).

15 PD1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD1
 se expresa en células mieloides, linfocitos T y linfocitos B activados (Agata *et al.* 1996 *Int. Immunol* 8:765-75). Se ha
 mostrado que dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 reducen de manera regulada la activación de linfocitos T tras unirse
 a PD1 (Freeman *et al.* 2000 *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman *et al.* 2001 *Nat Immunol* 2:261-8; Carter *et al.* 2002 *Eur J*
 20 *Immunol* 32:634-43). PD-L1 es abundante en los cánceres humanos (Dong *et al.* 2003 *J Mol Med* 81:281-7; Blank *et al.*
 2005 *Cancer Immunol. Immunother* 54:307-314; Konishi *et al.* 2004 *Clin Cancer Res* 10:5094). La supresión inmunitaria
 puede invertirse inhibiendo la interacción local de PD1 con PD-L1.

25 Se conocen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de PD1, PD-L1 y PD-L2 y pueden utilizarse en
 combinación con un CAR CD19 descrito en el presente documento. Por ejemplo, nivolumab (al que también se hace
 referencia como BMS-936558 o MDX1106; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG4
 completamente humano que bloquea específicamente PD1. Nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales
 humanos que se unen específicamente a PD1 se divulgan en los documentos US 8 008 449 y WO2006/121168.
 30 Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 humanizado que se une a PD1. En el
 documento WO2009/101611 se divulgan Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD1 humanizados.
 Pembrolizumab (conocido anteriormente como lambrolizumab y al que también se hace referencia como Keytruda,
 MK03475; Merck) es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG4 humanizado que se une a PD1. Pembrolizumab y otros
 anticuerpos anti-PD1 humanizados se divulgan en los documentos US 8 354 509 y WO2009/114335. MEDI4736
 (Medimmune) es un anticuerpo monoclonal humano que se une a PDL1 e inhibe la interacción del ligando con PD1.
 35 MDPL3280A (Genentech / Roche) es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 con Fc humano optimizado que se une a
 PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 se divulgan en la patente de EE. UU. N.º:
 7 943 743 y publicación de EE. UU. N.º: 20120039906. Otros agentes de unión anti-PD-L1 incluyen YW243.55.S70 (las
 regiones variables de la cadena pesada y ligera se muestran en las SEQ ID NO 20 y 21 en el documento WO2010/077634)
 y MDX-1 105 (al que también se hace referencia como BMS-936559 y, p. ej., agentes de unión anti-PD-L1 divulgados en
 el documento WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCI; Amplimmune; p. ej., divulgado en los documentos WO2010/027827
 40 y WO2011/066342), es un receptor soluble de fusión PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD1 y B7-H1. Otros
 anticuerpos anti-PD1 incluyen AMP 514 (Amplimmune), entre otros, p. ej., anticuerpos anti-PD1 divulgados en los
 documentos US 8 609 089, US 2010028330 y/o US 20120114649.

En algunas realizaciones, un inhibidor de PD1 descrito en el presente documento (p. ej., un anticuerpo PD1, p. ej., un anticuerpo PD1 descrito en el presente documento) se utiliza en combinación con un CAR CD19 descrito en el presente documento para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD19. En algunas realizaciones, un inhibidor de PD-L1 descrito en el presente documento (p. ej., un anticuerpo PD-L1, p. ej., un anticuerpo PD-L1 descrito en el presente documento) se utiliza en combinación con un CAR CD19 descrito en el presente documento para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD19. En algunas realizaciones, el sujeto tiene, o se identifica que tiene, al menos un 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de las células cancerosas, p. ej., células de LDLBG, que son CD3+/PD1+. En algunas realizaciones, el sujeto tiene, o se identifica que tiene, poblaciones sustancialmente no solapantes de células CD19+ y células PD-L1+ en un cáncer, p. ej., el microentorno del cáncer. Por ejemplo, en algunas realizaciones, menos de un 20 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % de células en el cáncer, p. ej., el microentorno del cáncer, son doblemente positivas para CD19 y PD-L1.

En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con una combinación de un CAR CD19, un inhibidor de PD1 y un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con una combinación de un CAR CD19, un inhibidor de PD1 y un inhibidor de CD3. En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con una combinación de un CAR CD19, un inhibidor de PD1, un inhibidor de PD-L1 y un inhibidor de CD3.

En algunas realizaciones, los métodos del presente documento incluyen un paso de someter a ensayo células en una muestra biológica, para CD3 y/o PD-1 (p. ej., expresión de CD3 y/o PD-1). En algunas realizaciones, los métodos incluyen un paso de someter a ensayo células en una muestra biológica para CD19 y/o PD-L1 (p. ej., expresión de CD19 y/o PD-L1). En algunas realizaciones, los métodos incluyen, p. ej., proporcionar una muestra que comprende células cancerosas y realizar un paso de detección, p. ej., mediante inmunohistoquímica, para uno o más de CD3, PD-1, CD19 o PD-L1. Los métodos pueden comprender un paso adicional de recomendar o administrar un tratamiento, p. ej., un tratamiento que comprende un CAR CD19.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de este es una molécula de anticuerpo anti-PD-1 tal como se describe en el documento US2015/0210769, titulado «Antibody Molecules to PD-1 and Uses Thereof». En una realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR (o colectivamente todas las CDR) de una región variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido entre cualquiera de BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clon-A, BAP049-Clon-B, BAP049-Clon-C, BAP049-Clon-D o BAP049-Clon-E; o como se describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0210769, o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente; o CDR estrechamente relacionadas, p. ej., CDR que son idénticas o que tienen al menos una alteración aminoacídica, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (p. ej., sustituciones, deleciones o inserciones, p. ej., sustituciones conservadoras).

En otra realización más, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en el presente documento, p. ej., un anticuerpo elegido entre cualquiera de BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clon-A, BAP049-Clon-B, BAP049-Clon-C, BAP049-Clon-D o BAP049-Clon-E; o como se describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0210769, o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

TIM3 (inmunoglobulina-3 de linfocitos T) también regula de manera negativa la función de los linfocitos T, especialmente en linfocitos T1 citotóxicos CD8+ y linfocitos auxiliares T1 CD4+ que segregan IFN-g, y desempeña una función crucial en el agotamiento de los linfocitos T. La inhibición de la interacción entre TIM3 y sus ligandos, p. ej., galectina-9 (Gal9), fosfatidilserina (PS) y HMGB1, puede aumentar la respuesta inmunitaria. En la técnica se puede disponer de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de TIM3 y sus ligandos y estos se pueden utilizar combinados con un CAR CD19 descrito en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas de bajo peso molecular o inhibidores peptídicos que tienen como diana TIM3 se unen al dominio IgV de TIM3 para inhibir la interacción con sus ligandos. En los documentos WO2013/006490 y US20100247521 se divulgan anticuerpos y péptidos que inhiben TIM3. Otros anticuerpos anti-TIM3 incluyen versiones humanizadas de RMT3-23 (divulgado en Ngiow *et al.*, 2011, *Cancer Res*, 71: 3540-3551) y el clon 8B.2C12 (divulgado en Monney *et al.*, 2002, *Nature*, 415:536-541). En el documento US20130156774 se divulgan anticuerpos biespecíficos que inhiben TIM3 y PD-1.

En una realización, el anticuerpo anti-TIM3 o fragmento de este es una molécula de anticuerpo anti-TIM3 tal como se describe en el documento US2015/0218274, titulado «Antibody Molecules to TIM3 and Uses Thereof». En una realización, la molécula de anticuerpo anti-TIM3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR (o de manera global todas las CDR) de una región variable de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido entre cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14,

5 ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 del documento US 2015/0218274; o codificado por la secuencia de nucleótidos de las Tablas 1-4; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente, o CDR estrechamente relacionadas, p. ej., CDR que son idénticas o que tienen al menos una alteración aminoacídica, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (p. ej., sustituciones, deleciones o inserciones, p. ej., sustituciones conservadoras).

10 En otra realización más, la molécula de anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en el presente documento, p. ej., un anticuerpo elegido entre cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 del documento US 2015/0218274; o codificado por la secuencia de nucleótidos de las Tablas 1-4; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

20 En otras realizaciones, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR es un inhibidor de CEACAM (p. ej., inhibidor de CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5). En una realización, el inhibidor de CEACAM es una molécula de anticuerpo anti-CEACAM. Se describen anticuerpos anti-CEACAM-1 de ejemplo en los documentos WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251 y WO 2014/022332, p. ej., un anticuerpo monoclonal 34B1, 26H7 y 5F4; o una forma recombinante de estos, como se describe, p. ej., en los documentos US 2004/0047858, US 7.132.255 y WO 99/052552. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CEACAM se une a CEACAM-5 como se describe, p. ej., en Zheng *et al. PLoS One*. 2 de septiembre de 2010;5(9). pii: e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146), o presenta reactividad cruzada con CEACAM-1 y CEACAM-5 como se describe en, p. ej., WO 2013/054331 y US 2014/0271618.

30 Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que las moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM), tales como CEACAM-1 y CEACAM-5, median, al menos en parte, en la inhibición de la respuesta inmunitaria antitumoral (véanse, p. ej., Market *et al. J Immunol*. 15 de marzo de 2002;168(6):2803-10; Market *et al. J Immunol*. 1 de noviembre de 2006;177(9):6062-71; Market *et al. Immunology*. febrero de 2009;126(2):186-200; Market *et al. Cancer Immunol Immunother*. febrero de 2010;59(2):215-30; Ortenberg *et al. Mol Cancer Ther*. junio de 2012;11(6):1300-10; Stem *et al. J Immunol*. 1 de junio de 2005;174(11):6692-701; Zheng *et al. PLoS One*. 2 de septiembre de 2010;5(9). pii: e12529). Por ejemplo, se ha descrito CEACAM-1 como un ligando heterófilo para TIM-3 y como una molécula que desempeña una función en la tolerancia de los linfocitos T y agotamiento de estos mediados por TIM-3 (véanse, p. ej., el documento WO 2014/022332; Huang, *et al.* (2014) *Nature* doi:10.1038/nature13848). En realizaciones, se ha mostrado que el bloqueo conjunto de CEACAM-1 y TIM-3 potencia una respuesta inmunitaria antitumoral en modelos de xenoinjerto de cáncer colorrectal (véanse, p. ej., el documento WO 2014/022332; Huang, *et al.* (2014), mencionado anteriormente). En otras realizaciones, el bloqueo conjunto de CEACAM-1 y PD-1 reduce la tolerancia de los linfocitos T como se ha descrito, p. ej., en el documento WO 2014/059251. Por lo tanto, se pueden utilizar inhibidores de CEACAM con los otros inmunomoduladores descritos en la presente (p. ej., inhibidores anti-PD-1 y/o anti-TIM-3) para potenciar la respuesta inmunitaria contra un cáncer, p. ej., melanoma, un cáncer de pulmón (p. ej. CPNM [siglas de cáncer de pulmón no microcítico]), un cáncer de vejiga, un cáncer de colon, un cáncer ovárico y otros cánceres tal como se describe en el presente documento.

45 LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos o CD223) es una molécula de la superficie celular expresada en linfocitos T y linfocitos B activados que ha demostrado desempeñar una función en el agotamiento de los linfocitos T CD8+. En la técnica se puede disponer de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de LAG3 y sus ligandos y estos se pueden utilizar combinados con un CAR CD19 descrito en el presente documento. Por ejemplo, BMS-986016 (Bristol-Myers Squib) es un anticuerpo monoclonal que tiene como diana LAG3. IMP701 (Immutep) es un anticuerpo antagonista contra LAG3 e IMP731 (Immutep y GlaxoSmithKline) es un anticuerpo de depleción contra LAG3. Otros inhibidores de LAG3 incluyen IMP321 (Immutep), que es una proteína de fusión recombinante de una porción soluble de LAG3 e Ig que se une a moléculas MHC de clase II y activa las células presentadoras de antígeno (APC). Se divulgan otros anticuerpos, p. ej., en el documento WO2010/019570.

55 En una realización, el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento de este es una molécula de anticuerpo anti-LAG3 tal como se describe en el documento US2015/0259420, titulado «Antibody Molecules to LAG3 and Uses Thereof». En una realización, la molécula de anticuerpo anti-LAG3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR (o colectivamente todas las CDR) de una región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido entre cualquiera de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050(Ser) (p. ej., BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050-Clon-H, BAP050-Clon-I o BAP050-Clon-J; o como se

describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0259420; o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente, o CDR estrechamente relacionadas, p. ej., CDR que son idénticas o que tienen al menos una alteración aminoacídica, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (p. ej., sustituciones, deleciones o inserciones, p. ej., sustituciones conservadoras).

En otra realización más, la molécula de anticuerpo anti-LAG3 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en el presente documento, p. ej., un anticuerpo elegido entre cualquiera de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050(Ser) (p. ej., BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser, o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050-Clon-H, BAP050-Clon-I, o BAP050-Clon-J; o como se describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0259420; o codificado por la secuencia de nucleótidos de la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., idéntica en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En otro ejemplo, en una realización, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR puede ser una molécula coestimuladora o un ligando de molécula coestimuladora. Los ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen una molécula de MHC de clase I, una proteína receptora de TNF, una proteína de tipo inmunoglobulina, un receptor de citocinas, una integrina, una molécula de activación de linfocitos de señalización (proteína SLAM), un receptor de linfocitos NK activador, BTLA, un receptor de un ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a y un ligando que se une específicamente con CD83, p. ej., como se describe en el presente documento. Los ejemplos de ligandos de moléculas coestimuladoras incluyen CD80, CD86, CD40L, ICOSL, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL y LIGHT. En algunas realizaciones, el ligando de la molécula coestimuladora es un ligando para una molécula coestimuladora diferente del dominio de la molécula coestimuladora del CAR. En algunas realizaciones, el ligando de la molécula coestimuladora es un ligando para una molécula coestimuladora que es el mismo que el dominio de la molécula coestimuladora del CAR. En una realización, el ligando de la molécula coestimuladora es 4-1BBL. En una realización, el ligando coestimulador es CD80 o CD86. En una realización, el ligando de la molécula coestimuladora es CD70. En realizaciones, una célula efectora inmunitaria que expresa CAR descrita en el presente documento se puede modificar adicionalmente para expresar una o más moléculas coestimuladoras adicionales o ligandos de moléculas coestimuladoras.

En otro aspecto, la divulgación presenta una población de células que expresan CAR, p. ej., linfocitos CART. En algunas realizaciones, la población de células que expresan CAR comprende una mezcla de células que expresan diferentes CAR. Por ejemplo, en una realización, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión al antígeno para un antígeno paraneoplásico descrito en el presente documento y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión al antígeno diferente, p. ej., dominio de unión al antígeno para un antígeno paraneoplásico diferente descrito en el presente documento, p. ej., un dominio de unión al antígeno para un antígeno paraneoplásico descrito en el presente documento que difiere del antígeno paraneoplásico al que se une el dominio de unión al antígeno del CAR expresado por la primera célula. Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión al antígeno para un antígeno paraneoplásico descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión al antígeno para una diana que no es un antígeno paraneoplásico como se describe en el presente documento. En una realización, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización intracelular primario y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario.

En otro aspecto, la divulgación presenta una población de células en donde al menos una célula de la población expresa un CAR que tiene un dominio de unión al antígeno para un antígeno paraneoplásico descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa otro agente, p. ej., un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, p. ej., PD-1, pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de organizar una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de

señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, p. ej., de una molécula inhibidora tal como PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3, y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos, y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej., que comprende un dominio coestimulador (p. ej., 41BB, CD27, OX40 o CD28, p. ej., como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (p. ej., un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD-1 o un fragmento de este, y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej., un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento).

Constructos de Ácido Nucleico que Codifican un CAR

La presente invención también se refiere a una célula efectora inmunitaria, p. ej., preparada por un método descrito al presente documento, que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más constructos de CAR descritos en el presente documento. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como un transcrito de ARN mensajero. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como un constructo de ADN. Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden ser una molécula de ADN, una molécula de ARN o una combinación de estas. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico es un vector que incluye cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente.

En un aspecto, el dominio de unión al antígeno de un CAR para su uso en la invención (p. ej., un scFv) está codificado por una molécula de ácido nucleico con una secuencia con codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero. En un aspecto, el constructo de CAR completo para su uso en la invención está codificado por una molécula de ácido nucleico en donde la secuencia completa tiene codones optimizados para la expresión en una célula de mamífero. La optimización de codones se refiere al descubrimiento de que la frecuencia de aparición de codones sinónimos (es decir, codones que codifican el mismo aminoácido) en el ADN codificante presenta un sesgo en diferentes especies. Tal degeneración de codones permite que un polipéptido idéntico sea codificado por varias secuencias de nucleótidos. Se conocen diversos métodos de optimización de codones en la técnica y éstos incluyen, p. ej., métodos divulgados en al menos las Patentes de EE. UU. con números 5 786 464 y 6 114 148.

Por consiguiente, en un aspecto, una célula efectora inmunitaria, p. ej., preparada mediante un método descrito en el presente documento, incluye una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno tumoral descrito en el presente documento, un dominio transmembrana (p. ej., un dominio transmembrana descrito en el presente documento) y un dominio de señalización intracelular (p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento) que comprende un dominio estimulador, p. ej., un dominio de señalización coestimulador (p. ej., un dominio de señalización coestimulador descrito en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (p. ej., un dominio de señalización primario descrito en el presente documento, p. ej., una cadena zeta descrita en el presente documento).

La presente invención también puede utilizar vectores en los que se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento. Los vectores obtenidos de retrovirus tales como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivíricos tienen la ventaja añadida frente a los vectores procedentes de oncoretrovirus, tales como los virus de la leucemia murina, de que pueden transducir células no proliferantes, tales como los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de una baja inmunogenicidad. Un vector retrovírico también puede ser, p. ej., un vector gammaretrovírico. Un vector gammaretrovírico puede incluir, p. ej., un promotor, una señal de empaquetamiento (ψ), un sitio de unión al cebador (PBS, por sus siglas en inglés), uno o más (p. ej., dos) repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés), y un transgén de interés, por ejemplo, un gen que codifica un CAR. Un vector gammaretrovírico puede carecer de genes estructurales víricos tales como gag, pol y env. Los vectores gammaretrovíricos de ejemplo incluyen el virus de la leucemia murina (MLV, por sus siglas en inglés), el virus formador de focos del bazo (SFFV, por sus siglas en inglés) y el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV, por sus siglas en inglés) y vectores procedentes de estos. Otros vectores gammaretrovíricos se describen, p. ej., en Tobias Maetzig *et al.*, «Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application» *Viruses*. junio de 2011; 3(6): 677-713.

En otra realización, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el CAR deseado es un vector adenovírico (A5/35). En otra realización, la expresión de los ácidos nucleicos que codifican CAR se puede lograr utilizando transposones tales como el de la bella durmiente, crisper, CAS9 y nucleasas con dedos de zinc. Véase, a continuación, June *et al.* 2009 *Nature Reviews Immunology* 9.10: 704-716.

Un vector también puede incluir, p. ej., una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de la transcripción (p. ej., gen de la Hormona de Crecimiento Bovina (BGH, por sus siglas en inglés)), un elemento que permite la replicación episómica y la replicación en procariotas (p. ej., origen de VS40 y ColE1 u otros

conocidos en la técnica) y/o elementos para permitir la selección (p. ej., gen de resistencia a la ampicilina y/o marcador de zeocina).

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

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

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

25 Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de suministro de genes. Un gen seleccionado se puede insertar en un vector y empaquetar en partículas retrovíricas utilizando técnicas conocidas en la técnica. A continuación, el virus recombinante puede aislarse y suministrarse a las células del sujeto *in vivo* o *ex vivo*. En la técnica se conocen varios sistemas retrovíricos. En algunas realizaciones, se usan vectores adenovíricos. En la técnica se conocen varios vectores adenovíricos. En una realización, se usan vectores lentivíricos.

30 Elementos promotores adicionales, p. ej., potenciadores, regulan la frecuencia del inicio de la transcripción. Típicamente, estos se ubican en la región de 30-110 pb en dirección 5' respecto al sitio de inicio, aunque se ha mostrado que varios promotores contienen también elementos funcionales en dirección 3' respecto al sitio de inicio. El espacio entre los elementos promotores con frecuencia es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven uno con respecto al otro. En el promotor de timidina·cinasa (tk), el espacio entre los elementos promotores se puede aumentar a 50 pb de separación antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece ser que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción. Los promotores de ejemplo incluyen promotores del gen IE de CMV, EF-1 α , ubiquitina C o de la fosfoglicerocinasa (PGK). En una realización, el promotor es un promotor de PGK, p. ej., un promotor de PGK truncado como se describe en el presente documento.

40 Un ejemplo de un promotor que es capaz de expresar una molécula de ácido nucleico que codifica CAR en un linfocito T de mamífero es el promotor EF1 α . El promotor EF1 α nativo impulsa la expresión de la subunidad alfa del complejo del factor de elongación 1, que es responsable del suministro enzimático de los aminoacil-ARNt al ribosoma. El promotor EF1 α se ha utilizado exhaustivamente en los plásmidos de expresión de mamíferos y ha mostrado ser eficaz para impulsar la expresión de CAR a partir de moléculas de ácido nucleico clonadas en un vector lentivírico. Véase, por ejemplo, Milone *et al.*, *Mol. Ther.* 17(8): 1453-1464 (2009). En un aspecto, el promotor EF1 α comprende la secuencia proporcionada en los Ejemplos.

50 Otro ejemplo de un promotor es la secuencia promotora del citomegalovirus (CMV) inmediata temprana. Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de impulsar niveles elevados de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica ligada operablemente a ella. Sin embargo, también se pueden utilizar otras secuencias promotoras constitutivas, que incluyen, entre otros, el promotor temprano del virus simio 40 (VS40), el virus del tumor mamario de ratones (VTMR), el promotor de repeticiones terminales largas (LTR) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor de MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor inmediato temprano del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como también promotores de genes humanos, tales como, entre otros, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor del factor de elongación 1 α , el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina·cinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de conectar la expresión de la secuencia polinucleotídica a la que está ligada operablemente cuando se desea una expresión de este tipo, o desconectar la expresión cuando no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, entre otros, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

65 Otro ejemplo de un promotor es el promotor de fosfoglicerato·cinasa (PGK). En algunas realizaciones, puede resultar deseable un promotor de PGK truncado (p. ej., un promotor de PGK con una o más, p. ej., 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300 o

400, deleciones de nucleótidos en comparación con la secuencia del promotor de PGK de tipo natural). A continuación se proporcionan las secuencias de nucleótidos de promotores de PGK de ejemplo.

Promotor de WT PGK:

5
 ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
 GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
 GGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGG
 GACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG
 AGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATA
 GTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCC
 TTCGCAGCGGCCCCCGGGTGTTCACATCGCCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTT
 GCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCTTGGT
 GCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCGCGTT
 GGGGTTGGGGCACCATAAGCT (SEQ ID NO: 357)

Promotores de PGK de ejemplo:

10 PGK100:
 ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
 GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
 GGGGTG (SEQ ID NO: 358)

15 PGK200:
 ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
 GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
 GGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGG
 GACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG
 (SEQ ID NO:359)

20 PGK300:
 ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
 GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
 GGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGG
 GACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG
 AGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATA
 GTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATCCCCG (SEQ ID
 NO:360)

PGK400:

ACCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAG
 GCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGGTGTGATGGC
 GGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGG
 5 GACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG
 AGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATA
 GTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATCCCCGCCTCGTCC
 TTCGACGGCCCCCGGGTGTTCATCGCCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTT
 GCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCAGCCG (SEQ ID NO:361)

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

Con el fin de evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones de este, el vector de expresión que se va a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células que lo expresan a partir de la población de células que se desea transfectar o infectar mediante vectores víricos. En otros aspectos, el marcador seleccionable se puede transportar en una pieza de ADN separada y utilizar en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células hospedadoras. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

Se usan genes indicadores para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de las secuencias reguladoras. En general, un gen indicador es un gen que no está presente ni se expresa en el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se pone de manifiesto por alguna propiedad fácilmente detectable, p. ej., actividad enzimática. La expresión del gen informador se somete a ensayo en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Los genes indicadores adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol·acetiltransferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína fluorescente verde (p. ej., Ui-Tei *et al.*, 2000 *FEBS Letters* 479: 79-82). Los sistemas de expresión adecuados son muy conocidos y pueden prepararse usando técnicas conocidas u obtenerse de proveedores comerciales. En general, el constructo con la región flanqueante en 5' mínima que muestra el nivel más alto de expresión del gen indicador se identifica como el promotor. Tales regiones promotoras pueden estar ligadas a un gen indicador y se pueden utilizar para evaluar a los agentes según la capacidad de modular la transcripción impulsada por el promotor.

En realizaciones, el vector puede comprender dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 y un segundo CAR, p. ej., un CAR inhibidor o un CAR que se une específicamente a un antígeno distinto de CD19. En tales realizaciones, las dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican el CAR están codificadas por una única molécula de ácido nucleico en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica. En este aspecto, los dos o más CAR pueden, p. ej., estar separados por uno o más sitios de escisión peptídica (p. ej., un sitio de autoescisión o un sustrato para una proteasa intracelular). Los ejemplos de sitios de escisión de péptidos incluyen sitios T2A, P2A, E2A o F2A.

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

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. En la técnica se conocen bien métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2012, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Un método preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedadora es la transfección con fosfato de calcio.

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores víricos, y especialmente los vectores retrovíricos, se han convertido en el método utilizado más ampliamente para insertar genes en células de mamíferos, p. ej., humanas. Otros vectores víricos pueden proceder

de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados y similares. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 350 674 y 5 585 362.

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal de ejemplo para su uso como vehículo de suministro *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (p. ej., una vesícula de membrana artificial). Se dispone de otros métodos de vanguardia de suministro dirigido de ácidos nucleicos tales como el suministro de polinucleótidos con nanopartículas dirigidas u otro sistema de suministro adecuado para tamaños submicrométricos.

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

Se pueden obtener lípidos adecuados para su uso de proveedores comerciales. Por ejemplo, se puede obtener dimiristilfosfatidilcolina («DMPC») de Sigma, St. Louis, MO; se puede obtener fosfato de dicetilo («DCP») de K & K Laboratories (Plainview, NY); se puede obtener colesterol («Choi») de Calbiochem-Behring; se puede obtener dimiristilfosfatidilglicerol («DMPG») y otros lípidos de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol pueden almacenarse a aproximadamente -20 °C. El cloroformo se usa como el único disolvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol. «Liposoma» es un término genérico que abarca diversos vehículos lipídicos simples y multilaminares formados por la generación de bicapas o agregados lipídicos encerrados. Los liposomas pueden estar caracterizados por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman de manera espontánea cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh *et al.*, 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Sin embargo, también se abarcan composiciones que tienen estructuras diferentes en solución que la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. También se contemplan complejos de Lipofectamine-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora o exponer de otra manera una célula al inhibidor de la presente divulgación, con el fin de confirmar la presencia de la secuencia de ácido nucleico recombinante en la célula hospedadora, se pueden realizar varios ensayos. Los ensayos de este tipo incluyen, por ejemplo, ensayos «biológicos moleculares» muy conocidos por los expertos en la técnica, tales como transferencia Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos «bioquímicos», tales como la detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA e inmunoelectrotransferencia) o por ensayos descritos en la presente para identificar agentes comprendidos en el alcance de la divulgación.

Estrategias para regular los receptores antigénicos quiméricos

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

En otro ejemplo, las células que expresan CAR también pueden expresar una molécula Caspasa-9 inducible (iCaspasa-9) que, después de administrar un fármaco dimerizador (p. ej., rimiducid (también denominado AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) o AP20187 (Ariad)) da lugar a la activación de la Caspasa-9 y apoptosis de las células. La molécula iCaspasa-9 contiene un dominio de unión inductor químico de la dimerización (CID, por sus siglas en inglés) que hace de mediador de la dimerización en la presencia de un CID. Esto da como resultado una disminución inducible y selectiva de células que expresan CAR. En algunos casos, la molécula iCaspasa-9 está codificada por una molécula de ácido nucleico separada del vector o de los vectores que codifican el CAR. En algunos casos, la molécula iCaspasa-9 está codificada por la misma molécula de ácido nucleico que codifica el CAR. La iCaspasa-9 puede proporcionar un interruptor de seguridad para evitar cualquier toxicidad de células que expresan CAR. Véanse, p. ej., Song *et al. Cancer Gene Ther.* 2008; 15(10):667-75; Id. de ensayo clínico N.º NCT02107963; y Di Stasi *et al. N. Engl. J. Med.* 2011; 365:1673-83.

Las estrategias alternativas para regular la terapia con CAR de la presente invención incluyen utilizar moléculas de bajo peso molecular o anticuerpos que desactivan o deshabilitan la actividad CAR, p. ej., mediante la depleción de células que expresan CAR, p. ej., mediante inducción de la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en la presente también pueden expresar un antígeno que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, por ejemplo, ADCC o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un receptor capaz de ser la diana de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los ejemplos de tales receptores incluyen EpCAM, VEGFR, integrinas (p. ej., integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha4$, $\alpha3\beta3$, $\alpha4\beta7$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\beta3$, αv), miembros de la superfamilia de receptor de TNF (p. ej., TRAIL-R1, TRAIL-R2), receptor de PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, receptor de IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD1 1, CD1 1a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/receptor de IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7, y EGFR, y versiones truncadas de estos (p. ej., versiones que conservan uno o más epítomos extracelulares pero que carecen de una o más regiones dentro del dominio citoplasmático).

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

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

En un aspecto, un RCAR comprende un conjunto de polipéptidos, normalmente dos en las realizaciones más simples, en los que los componentes de un CAR estándar descrito en el presente documento, p. ej., un dominio de unión al antígeno y un dominio de señalización intracelular, se reparten en polipéptidos o miembros separados. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos incluye un conmutador de la dimerización que, tras la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, p. ej., puede acoplar un dominio de unión al antígeno a un dominio de señalización intracelular. En una realización, un CAR para su uso en la presente invención utilizan un interruptor de la dimerización como los descritos, p. ej., en el documento WO2014127261. Se proporcionan una descripción adicional y configuraciones de ejemplo de CAR regulables de este tipo en el presente documento y en, p. ej., los párrafos 527-551 de la Publicación Internacional N.º WO 2015/090229 presentada el 13 de marzo de 2015.

Interruptores de dimerización

Los interruptores de dimerización pueden ser no covalentes o covalentes. En un interruptor de dimerización no covalente, la molécula de dimerización promueve una interacción no covalente entre los dominios de tipo interruptor. En un interruptor de dimerización covalente, la molécula de dimerización promueve una interacción covalente entre los dominios de tipo interruptor.

5 En una realización, el RCAR comprende un interruptor de dimerización basado en FKBP/FRB o FKBP/FRAP. FKBP12 (FKBP o proteína de unión a FK506) es una proteína citoplasmática abundante que actúa como la diana intracelular inicial para el fármaco inmunosupresor de tipo producto natural rapamicina. La rapamicina se une a FKBP y al homólogo de PI3K grande FRAP (RAFT, mTOR). FRB es una porción de 93 aminoácidos de FRAP que es suficiente para unirse al complejo FKBP-rapamicina (Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J. y Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4947-51.)

10 En algunas realizaciones, un interruptor basado en FKBP/FRAP, p. ej., FKBP/FRB, puede usar una molécula de dimerización, p. ej., rapamicina o un análogo de rapamicina.

15 La secuencia de aminoácidos de FKBP es la siguiente:

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFP
KRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS
SRDRNKPFKFMLGKQEV
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHAT
LVFDVELLKLETS (SEQ ID NO: 131)

20 En algunas realizaciones, un dominio de tipo interruptor FKBP puede comprender un fragmento de FKBP que tiene la capacidad de unirse a FRB, o un fragmento o análogo de este, en presencia de rapamicina o un rapálogo, p. ej., la porción subrayada de la SEQ ID NO: 131, que es:

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDS
SRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP
DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETS (SEQ ID NO: 132)

25

La secuencia de aminoácidos de FRB es la siguiente:

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER
GPQTLKETSFNQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFRR
ISK (SEQ ID NO: 133)

30

«Interruptor basado en FKBP/FRAP, p. ej., FKBP/FRB», tal como se utiliza la expresión en el presente documento, se refiere a un interruptor de dimerización que comprende: un primer dominio de tipo interruptor, que comprende un fragmento de FKBP o un análogo de este que tiene la capacidad de unirse a FRB, o un fragmento o análogo de este, en presencia de rapamicina o un rapálogo, p. ej., RAD001, y que tiene al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad respecto a, o difiere en como máximo 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 residuos aminoácidos de, la secuencia FKBP de la SEQ ID NO: 131 o 132; y un segundo dominio de tipo interruptor, que comprende un fragmento de FRB o un análogo de este que tiene la capacidad de unirse a FRB, o un fragmento o análogo de este, en presencia de rapamicina o un rapálogo, y que tiene al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad respecto a, o difiere en como máximo 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 residuos aminoácidos de, la secuencia FRB de la SEQ ID NO: 133. En una realización, un RCAR descrito en el presente documento comprende un dominio de tipo interruptor que comprende residuos aminoácidos divulgados en la SEQ ID NO: 131 (o la SEQ ID NO: 132) y un dominio de tipo interruptor comprende residuos aminoácidos divulgados en la SEQ ID NO: 133.

35

40

45 En algunas realizaciones, el interruptor de dimerización FKBP/FRB comprende un dominio de tipo interruptor FRB modificado que muestra una formación de complejo alterada, p. ej., potenciada, entre un dominio de tipo interruptor basado en FRB, p. ej., el dominio de tipo interruptor FRB modificado, un dominio de tipo interruptor basado en FKBP y la molécula de dimerización, p. ej., rapamicina o un rapálogo, p. ej., RAD001. En una realización, el dominio de tipo interruptor FRB modificado comprende una o más mutaciones, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, seleccionadas entre mutaciones en la posición o las posiciones aminoácidas L2031, E2032, S2035, R2036, F2039, G2040, T2098, W2101, D2102, Y2105 y F2108, donde el aminoácido de tipo natural está mutado a cualquier otro aminoácido de origen natural. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación en E2032, donde E2032 se muta a fenilalanina (E2032F), metionina (E2032M), arginina (E2032R), valina (E2032V), tirosina (E2032Y), isoleucina (E2032I), p. ej., la SEQ ID NO: 134, o leucina

50

(E2032L), p. ej., la SEQ ID NO: 135. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación en T2098, donde T2098 se muta a fenilalanina (T2098F) o leucina (T2098L), p. ej., la SEQ ID NO: 136. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación en E2032 y en T2098, donde E2032 se muta a cualquier aminoácido, y donde T2098 se muta a cualquier aminoácido, p. ej., la SEQ ID NO: 137. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación E2032I y una T2098L, p. ej., la SEQ ID NO: 138. En una realización, un FRB mutante comprende una mutación E2032L y una T2098L, p. ej., la SEQ ID NO: 139.

Tabla 10. FRB mutante de ejemplo que tiene una mayor afinidad por una molécula de dimerización.

Mutante de FRB	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Mutante E2032I	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	134
Mutante E2032L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKTS	135
Mutante T2098L	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	136
Mutante E2032, T2098	ILWHEMWHEGL X EASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDL X QAWDLYYHVFRISKTS	137
Mutante E2032I, T2098L	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	138
Mutante E2032L, T2098L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQ AYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKTS	139

10

CAR con receptor de linfocitos citolíticos naturales (NKR)

15

En una realización, la molécula CAR descrita en el presente documento comprende uno o más componentes de un receptor de linfocitos citolíticos naturales (NKR, por sus siglas en inglés) y de esta manera forma un CAR-NKR. El componente NKR puede ser un dominio transmembrana, un dominio bisagra o un dominio citoplasmático de cualquiera de los siguientes receptores de linfocitos citolíticos naturales: receptor de tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos (KIR, por sus siglas en inglés), p. ej., KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, DIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 y KIR3DP1; receptor de citotoxicidad natural (NCR, por

5 sus siglas en inglés), p. ej., NKp30, NKp44, NKp46; familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización (SLAM) de receptores de células inmunitarias, p. ej., CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME y CD2F-10; receptor de Fc (FcR), p. ej., CD16 y CD64; y receptores Ly49, p. ej., LY49A, LY49C. Las moléculas CAR-NKR descritas en el presente documento pueden interactuar con una molécula adaptadora o dominio de señalización intracelular, p. ej., DAP12. Las configuraciones y secuencias de ejemplo de moléculas CAR que comprenden componentes de NKR se describen en la Publicación Internacional N.º WO2014/145252.

CAR dividido

10 En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR utiliza un CAR dividido. La estrategia de CAR dividido se describe más detalladamente en las publicaciones WO2014/055442 y WO2014/055657. Brevemente, un sistema de CAR dividido comprende una célula que expresa un primer CAR que tiene un primer dominio de unión al antígeno y un dominio coestimulador (p. ej., 41BB), y la célula también expresa un segundo CAR que tiene un segundo dominio de unión al antígeno y un dominio de señalización intracelular (p. ej., CD3 zeta). Cuando la célula encuentra el primer antígeno, se activa el dominio coestimulador y la célula prolifera. Cuando la célula encuentra el segundo antígeno, se activa el dominio de señalización intracelular y comienza la actividad citolítica. Por lo tanto, la célula que expresa CAR solo está totalmente activada en presencia de ambos antígenos.

Células Efectoras Inmunitarias

20 También se describen en el presente documento células que contienen una molécula de CAR descrita en el presente documento o un ácido nucleico que codifica un CAR tal como se describe en el presente documento. También se describen en el presente documento células que han sido transfectadas o transformadas con un ácido nucleico descrito en el presente documento, p. ej., un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., tal como se describe en el presente documento. En una realización, la célula es una célula descrita en el presente documento, p. ej., un linfocito T humano, p. ej., un linfocito T humano descrito en el presente documento, o un linfocito NK humano, p. ej., un linfocito NK humano descrito en el presente documento. En una realización, el linfocito T humano es un linfocito T CD8+. En algunos casos, la célula es autóloga respecto al sujeto que se va a tratar con la célula. En algunas realizaciones, la célula es alogénica respecto al sujeto al que se le va a administrar la célula.

30 En un aspecto, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede comprender, además, un segundo CAR, p. ej., un segundo CAR que incluye un dominio de unión al antígeno diferente, p. ej., para la misma diana o una diana diferente (p. ej., una diana que no sea un antígeno tumoral descrito en el presente documento o un antígeno tumoral diferente descrito en el presente documento). En una realización, el segundo CAR incluye un dominio de unión al antígeno a una diana que expresa el mismo tipo de célula cancerosa que el antígeno tumoral. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que tiene como diana un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador, pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que tiene como diana un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario, pero no un dominio de señalización coestimulador. Sin desear ceñirse a la teoría, la colocación de un dominio de señalización coestimulador, p. ej., 4-1BB, CD28, ICOS, CD27 u OX-40, en el primer CAR, y el dominio de señalización primario, p. ej., CD3 zeta, en el segundo CAR puede limitar la actividad del CAR a las células en las que se expresan ambas dianas. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR de antígeno tumoral que incluye un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno diana descrito en el presente documento, un dominio transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que tiene como diana un antígeno diana diferente (p. ej., un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario. En otra realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno diana descrito en el presente documento, un dominio transmembrana y un dominio de señalización primario y un segundo CAR que tiene como diana un antígeno distinto del primer antígeno diana (p. ej., un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión al antígeno contra el antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización coestimulador.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una población de células que expresan CAR, p. ej., donde al menos una o más de las cuales comprende una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la población de células que expresan CAR comprende una mezcla de células que expresan diferentes CAR.

60 Por ejemplo, en una realización, la población de linfocitos CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión al antígeno para un antígeno tumoral descrito en el presente documento y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión al antígeno diferente, p. ej., un dominio de unión al antígeno para un antígeno tumoral diferente descrito en el presente documento, p. ej., un dominio de unión al antígeno para un antígeno tumoral descrito en el presente documento que difiere del antígeno tumoral al que se une el dominio de unión al antígeno del CAR expresado por la primera célula.

65 Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión al antígeno para un antígeno tumoral descrito en el presente documento, y una segunda

célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión al antígeno para una diana distinto de un antígeno tumoral como se describe en el presente documento. En una realización, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización intracelular primario y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una población de células en donde al menos una célula de la población expresa un CAR que tiene un dominio de unión al antígeno para un antígeno tumoral descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa otro agente, p. ej., un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR. En una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Las moléculas inhibidoras, p. ej.,
 10 PD-1, pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de organizar una respuesta efectora inmunitaria. Los ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC de clase I, MHC de clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFRbeta). En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, p. ej., de una molécula inhibidora tal como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3, y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos, y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej., que comprende un dominio coestimulador (p. ej., 41BB, CD27, OX40 o CD28, p. ej., como se describe en el presente documento) y/o un dominio de señalización primario (p. ej., un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD-1 o un fragmento de este, y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (p. ej., un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento).

Transfección con ARN

30 En el presente documento se divulgan métodos para producir un ARN de CAR transcrito *in vitro*. Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir introducir un constructo de ARN que codifica un CAR que se puede utilizar directamente para transfectar una célula. Un método para generar ARNm para su uso en la transfección puede conllevar la transcripción *in vitro* (IVT) de un molde con cebadores diseñados especialmente, seguido de la adición de poliA, para producir un constructo que contiene la secuencia no traducida 3' y 5' («UTR»), una caperuza 5' y/o un Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES), el ácido nucleico que se va a expresar y una cola de poliA, normalmente de una longitud de
 35 50 a 2000 bases (p. ej., SEQ ID NO: 35). El ARN producido de esta manera puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En un aspecto, el molde incluye secuencias para el CAR.

Una célula efectora inmunitaria puede incluir un CAR codificado por un ARN mensajero (ARNm). En un aspecto, el ARNm que codifica un CAR descrito en el presente documento se introduce en una célula efectora inmunitaria, p. ej., que se ha preparado mediante un método descrito en el presente documento, para la producción de una célula que expresa CAR.

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

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

Se utiliza una PCR para generar un molde para la transcripción *in vitro* de ARNm que se utiliza para la transfección. Los métodos para realizar la PCR son muy conocidos en la técnica. Los cebadores para utilizar en la PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias de las regiones del ADN que se van a utilizar como un molde para la PCR. Tal como se utiliza en el presente documento, «sustancialmente complementarias» se refiere a secuencias de nucleótidos donde una mayoría o todas las bases en la secuencia del cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias o están emparejadas de manera errónea. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de reasociarse o hibridarse con la diana de ADN pretendida en las condiciones de hibridación utilizadas para la PCR. Los cebadores se pueden diseñar para ser sustancialmente complementarios a cualquier porción del molde de ADN. Por ejemplo, los cebadores se pueden diseñar para amplificar la porción de un ácido nucleico que se transcribe normalmente en las células (el marco de lectura abierto), incluidas las UTR en 5' y 3'. Los cebadores también se pueden diseñar para amplificar una porción de un ácido nucleico que codifica un dominio particular de interés. En una realización, los cebadores están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluidas la totalidad o porciones de las UTR en 5' y 3'. Se pueden generar cebadores útiles para la PCR mediante métodos sintéticos muy conocidos en la técnica. Los «cebadores directos» son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos en el molde de ADN que están en dirección 5' respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar. «En dirección 5'» se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación 5' con respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar respecto a la hebra codificante. Los «cebadores inversos» son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a un molde de ADN bicatenario que están en dirección 3' respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar. «En dirección 3'» se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación 3' con respecto a la secuencia de ADN que se va a amplificar respecto a la hebra codificante.

Se puede usar cualquier ADN·polimerasa útil para la PCR en los métodos divulgados en el presente documento. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente en varios proveedores.

También se pueden usar estructuras químicas con la capacidad de fomentar la estabilidad y/o la eficacia de la traducción. El ARN tiene preferentemente UTR en 5' y 3'. En una realización, la UTR en 5' tiene una longitud de entre uno y 3000 nucleótidos. La longitud de las secuencias UTR en 5' y 3' que se van a añadir a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, incluidos, entre otros, diseño de cebadores para PCR que se hibridan con diferentes regiones de las UTR. Usando este enfoque, un experto en la técnica puede modificar la longitud de las UTR en 5' y 3' necesaria para lograr una eficacia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

Las UTR en 5' y 3' pueden ser las UTR en 5' y 3' de origen natural, endógenas respecto al ácido nucleico de interés. Como alternativa, las secuencias UTR que no son endógenas con respecto al ácido nucleico de interés se pueden añadir incorporando las secuencias UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualquier otra modificación del molde. El uso de secuencias UTR que no son endógenas con respecto al ácido nucleico de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficacia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que elementos ricos en AU en las secuencias UTR en 3' pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, se pueden seleccionar o diseñar UTR en 3' para aumentar la estabilidad del ARN transcrito basándose en las propiedades de UTR muy conocidas en la técnica.

En una realización, la UTR en 5' puede contener la secuencia de Kozak del ácido nucleico endógeno. Como alternativa, cuando se añade una UTR en 5' que no es endógena respecto al ácido nucleico de interés por PCR, como se ha descrito anteriormente, se puede rediseñar una secuencia de Kozak consenso añadiendo la secuencia UTR en 5'. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficiencia de la traducción de algunos transcritos de ARN, pero no parece que sean necesarias en todos los ARN para posibilitar una traducción eficiente. En la técnica se conoce la necesidad de secuencias de Kozak para muchos ARNm. En otras realizaciones, la UTR en 5' puede ser una UTR en 5' de un virus de ARN, cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras realizaciones, se pueden usar diversos análogos de nucleótidos en la UTR en 3' o 5' para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

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

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

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

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

15 El segmento de poliA/T del molde de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR utilizando un cebador inverso que contiene una cola de poliT, tal como la cola 100T (SEQ ID NO: 31) (el tamaño puede ser 50-5000 T (SEQ ID NO: 32)) o después de la PCR por cualquier otro método, incluidas, entre otras, la ligadura de ADN o la recombinación *in vitro*. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas (p. ej., SEQ ID NO: 30).

20 Las colas de poli(A) de los ARN se pueden extender aún más después de la transcripción *in vitro* con el uso de una poli(A) polimerasa, tal como la poliA-polimerasa de *E. coli* (E-PAP). En una realización, aumentar la longitud de una cola de poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos (SEQ ID NO: 34) da lugar a un aumento de aproximadamente dos veces en la eficiencia de traducción del ARN. Adicionalmente, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Una unión de este tipo puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, los análogos de ATP se pueden incorporar en la cola de poli(A) utilizando poli(A)·polimerasa. Los análogos de ATP pueden aumentar adicionalmente la estabilidad del ARN.

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

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

40 El ARN se puede introducir en células diana usando cualquiera de varios métodos diferentes, por ejemplo, métodos comercializados que incluyen, entre otros, electroporación (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo Alemania), la transfección mediada por liposomas catiónicos usando lipofección, encapsulación polimérica, transfección mediada por péptidos o sistemas de suministro biológico de partículas, tales como «pistolas génicas» (véase, por ejemplo, Nishikawa, *et al. Hum Gene Ther.*, 12(8):861-70 (2001).

Métodos de suministro no víricos

50 En algunos aspectos, se pueden utilizar métodos no víricos para suministrar un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en el presente documento a una célula o tejido en un sujeto.

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

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

65

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

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

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

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

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

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

Activación y Expansión de Células Efectoras Inmunitarias (p. ej., linfocitos T)

Las células efectoras inmunitarias tales como los linfocitos T pueden activarse y expandirse generalmente usando métodos como los descritos, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. 6 352 694; 6 534 055; 6 905 680; 6 692 964; 5 858 358; 6 887 466; 6 905 681; 7 144 575; 7 067 318; 7 172 869; 7 232 566; 7 175 843; 5 883 223; 6 905 874; 6 797 514; 6 867 041; y la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 20060121005.

Por lo general, una población de células efectoras inmunitarias, p. ej., las células con depleción de linfocitos T reguladores, se puede expandir por contacto con una superficie que tiene unido a ella un agente que estimula una señal asociada con el complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. En particular, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse como se describe en el presente documento, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o fragmento de unión al antígeno de este, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado sobre una superficie, o por contacto con un activador de la proteína cinasa C (p. ej., briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria sobre la superficie de los linfocitos T se usa un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T se puede poner en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+, se puede usar un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 que se puede utilizar incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Francia), al igual que otros métodos de uso común en la técnica (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9):13191328, 1999; Garland et al., *J. Immunol Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

En ciertos aspectos, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para el linfocito T pueden ser proporcionadas por protocolos diferentes. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada una de las señales pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando están acoplados a una superficie, los agentes se pueden acoplar a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans"). Como alternativa, un

agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En un aspecto, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En ciertos aspectos, ambos agentes pueden estar en solución. En un aspecto, los agentes pueden estar en forma soluble y después entrecruzarse con una superficie, tal como una célula que expresa receptores de Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.^{os} 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC, por sus siglas en inglés) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de linfocitos T en la presente invención.

En un aspecto, los dos agentes se inmovilizan sobre perlas, ya sea en la misma perla, es decir, en «*cis*», o en perlas separadas, es decir, en «*trans*». A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión al antígeno de este y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión al antígeno de este; y ambos agentes se coinmovilizan en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un aspecto, se utiliza una proporción de 1:1 de cada uno de los anticuerpos unidos a las perlas para la expansión de linfocitos T CD4+ y el crecimiento de linfocitos T. En ciertos aspectos de la presente invención, se utiliza una proporción de anticuerpos anti-CD3:CD28 unidos a las perlas tal que se observa un aumento en la expansión de linfocitos T en comparación con la expansión observada utilizando una proporción de 1:1. En un aspecto particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada utilizando una proporción de 1:1. En un aspecto, la proporción de anticuerpo para CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto, más anticuerpo anti-CD28 está unido a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la proporción de CD3:CD28 es inferior a uno. En ciertos aspectos, la proporción de anticuerpo anti-CD28 respecto a anticuerpo anti-CD3 unido a las perlas es superior a 2:1. En un aspecto particular, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:100 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:75 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto adicional, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:50 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:30 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto preferido, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:10 del anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se usa una proporción CD3:CD28 de 1:3 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto más, se usa una proporción CD3:CD28 de 3:1 de anticuerpo unido a perlas.

Pueden usarse proporciones de partículas respecto a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio para estimular linfocitos T u otras células diana. Como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica, la proporción de partículas respecto a células puede depender del tamaño de partícula respecto a la célula diana. Por ejemplo, las perlas de pequeño tamaño solo se pueden unir a unas pocas células, mientras que las perlas más grandes se pueden unir muchas. En ciertos aspectos, la proporción de células respecto a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero entre ellos, y en aspectos adicionales, la proporción comprende de 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero entre ellos, que también se pueden utilizar para estimular los linfocitos T. La proporción de partículas acopladas anti-CD3 y anti-CD28 respecto a los linfocitos T que dan como resultado la estimulación de linfocitos T puede variar como se ha indicado anteriormente, sin embargo, ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1 siendo una proporción preferida al menos 1:1 de partículas por linfocito T. En un aspecto, se utiliza una proporción de partículas respecto a células de 1: 1 o inferior. En un aspecto particular, una proporción de partículas:células preferida es 1:5. En aspectos adicionales, la proporción de partículas respecto a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, en un aspecto, la proporción de partículas respecto a células es de 1: 1 a 10:1 en el primer día y se añaden partículas adicionales a las células cada día o en días alternos posteriormente durante hasta 10 días, con proporciones finales de 1:1 a 1:10 (basándose en el recuento de células en el día de la adición). En un aspecto particular, la proporción de partículas respecto a células de 1: 1 en el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 en el tercer y quinto días de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden a diario o en días alternos para una proporción final de 1:1 el primer día y de 1:5 el tercer y quinto días de estimulación. En un aspecto, la proporción de partículas respecto a células es 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y quinto días de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden a diario o en días alternos para una proporción final de 1:1 el primer día y de 1:10 el tercer y quinto días de estimulación. Un experto en la técnica apreciará que pueden ser adecuadas diversas proporciones diferentes para su uso en la presente invención. En particular, las proporciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula. En un aspecto, las proporciones más típicas para su uso son próximas a 1:1, 2:1 y 3:1 el primer día.

En aspectos adicionales, las células, tales como los linfocitos T, se combinan con perlas recubiertas con agente, las perlas y las células se separan posteriormente y a continuación se cultivan las células. En un aspecto alternativo, antes del cultivo, las perlas recubiertas con agente y las células no se separan, sino que se cultivan juntas. En un aspecto adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, que da como resultado un incremento del ligamiento de los marcadores de la superficie celular, y con ello se induce la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (3x28 perlas) entren en contacto con los linfocitos T. En un aspecto, las células (por ejemplo, de 10⁴ a 10⁹ linfocitos T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS[®] M-450 CD3/CD28 T en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, por ejemplo, PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y

magnesio). De nuevo, los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente que se puede utilizar cualquier concentración de células. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo un 0,01 % de la muestra o toda la muestra (es decir, un 100 %) puede comprender la célula diana de interés. Por consiguiente, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan entre sí partículas y células (es decir, aumentar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de las células y las partículas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de aproximadamente 10 000 millones de células/mL, 9000 millones/mL, 8000 millones/mL, 7000 millones/mL, 6000 millones/mL, 5000 millones/mL o 2000 millones de células/mL. En un aspecto, se usan más de 100 millones de células/mL. En un aspecto adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/mL. En un aspecto más, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/mL. En aspectos adicionales, pueden usarse concentraciones de 125 o 150 millones de células/mL. El uso de concentraciones elevadas puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de concentraciones elevadas de células permite una captura más eficaz de las células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, tales como linfocitos T negativos para CD28. Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en ciertos aspectos. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de linfocitos T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En una realización, las células transducidas con un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en el presente documento, p. ej., un CAR CD19 descrito en el presente documento, se expanden, p. ej., mediante un método descrito en el presente documento. En una realización, las células se expanden en cultivo durante un período de varias horas (p. ej., aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 horas) a aproximadamente 14 días (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días). En una realización, las células se expanden durante un período de 4 a 9 días. En una realización, las células se expanden durante un período de 8 días o menos, p. ej., 7, 6 o 5 días. En una realización, las células se expanden en cultivo durante 5 días y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. La potencia se puede definir, p. ej., mediante diversas funciones de linfocitos T, p. ej., proliferación, eliminación de células diana, producción de citocinas, activación, migración o combinaciones de estas. En una realización, las células, p. ej., una célula CAR CD19 descrita en el presente documento, expandidas durante 5 días muestran al menos un aumento de una, dos, tres o cuatro veces en duplicaciones celulares tras la estimulación con antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las células, p. ej., las células que expresan un CAR CD19 descritas en el presente documento, se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes presentan una mayor producción de citocinas proinflamatorias, p. ej., niveles de IFN- γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En una realización, las células, p. ej., una célula CAR CD19 descrita en el presente documento, expandidas durante 5 días muestran un aumento de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, diez veces o más en pg/mL de producción de citocinas proinflamatorias, p. ej., niveles de IFN- γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo.

También pueden ser deseables varios ciclos de estimulación, de modo que el tiempo de cultivo de los linfocitos T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (p. ej., Medio Esencial Mínimo o Medio RPMI 1640 o X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluido suero (p. ej., suero bovino o humano fetal), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, entre otros, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores, tales como *N*-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea exentos de suero o complementados con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina o citocinas suficiente para el crecimiento y la expansión de linfocitos T. Se incluyen antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomina, solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se han de infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para sustentar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (p. ej., 37 °C) y una atmósfera (p. ej., aire más un 5 % de CO₂) apropiadas.

En una realización, las células se expanden en un medio apropiado (p. ej., medio descrito en el presente documento) que incluye una o más interleucinas lo que da como resultado un incremento de al menos 200 veces (p. ej., 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces) de células a lo largo de un periodo de expansión de 14 días, p. ej., según se mide mediante un método descrito en el presente documento tal como citometría de flujo. En una realización, las células se expanden en presencia de IL-15 y/o IL-7 (p. ej., IL-15 e IL-7).

Los linfocitos T que se han expuesto a tiempos de estimulación variados pueden presentar características diferentes. Por ejemplo, los productos de tipo células mononucleares de la sangre o de la sangre periférica sometida a aféresis típicos tienen una población de linfocitos T auxiliares (TH, CD4+) que es mayor que la población de linfocitos T citotóxicos o supresores (TC, CD8+). La expansión *ex vivo* de linfocitos T mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de linfocitos T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en linfocitos TH, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de linfocitos T comprende una

población cada vez mayor de linfocitos TC. Por consiguiente, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajoso infundir a un sujeto una población de linfocitos T que comprende predominantemente linfocitos TH. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto de linfocitos TC específicos para el antígeno, puede ser beneficioso expandir este subconjunto hasta un grado mayor.

5

Además, aparte de los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de forma reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, una reproducibilidad de este tipo permite adaptar un producto de linfocitos T activados para fines específicos.

10

Una vez que se construye un CAR descrito en el presente documento, se pueden utilizar diversos ensayos para evaluar la actividad de la molécula, tal como, entre otros, la capacidad de expandir linfocitos T después de la estimulación con el antígeno, mantener la expansión de linfocitos T en ausencia de reestimulación y actividades antineoplásicas en modelos *in vitro* y en animales apropiados. Los ensayos para evaluar los efectos de un CAR para su uso en la presente invención se describen con más detalle a continuación

15

Se puede utilizar el análisis por inmunoelectrotransferencia de la expresión de CAR en linfocitos T primarios para detectar la presencia de monómeros y dímeros. Véase, p. ej., Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Muy brevemente, los linfocitos T (mezcla 1:1 de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺) que expresan los CAR se expanden *in vitro* durante más de 10 días, lo cual va seguido de lisis y SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los CAR que contienen el dominio citoplásmico TCR- ζ de longitud completa y la cadena TCR- ζ endógena se detectan mediante inmunoelectrotransferencia usando un anticuerpo contra la cadena TCR- ζ . Los mismos subconjuntos de linfocitos T se utilizan para el análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras para permitir la evaluación de la formación de dímeros covalentes.

20

La expansión *in vitro* de linfocitos T CAR⁺ después de la estimulación con antígeno se puede medir mediante citometría de flujo. Por ejemplo, se estimula una mezcla de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con aAPC α CD3/ α CD28, lo cual va seguido de transducción con vectores lentivíricos que expresan GFP bajo el control de los promotores que se van a analizar. Los promotores de ejemplo incluyen promotores del gen IE de CMV, EF-1 α , ubiquitina C o de la fosfoglicerocinasa (PGK). La fluorescencia de GFP se evalúa el día 6 de cultivo en los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺ mediante citometría de flujo. Véase, p. ej., Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Como alternativa, una mezcla de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se estimulan con perlas magnéticas recubiertas con α CD3/ α CD28 el día 0, y se transducen con CAR el día 1 utilizando un vector lentivírico bicistrónico que expresa CAR junto con eGFP utilizando una secuencia de omisión ribosómica 2A. Los cultivos se reestiman con células K562 con un antígeno paraneoplásico como se describe en la presente* (K562-que expresan un antígeno paraneoplásico como se describe en la presente), células K562 de tipo natural (K562 de tipo natural) o células K562 que expresan hCD32 y 4-1BBL en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (K562-BBL-3/28) después del lavado. Se añaden 100 U/mL de IL-2 exógena a los cultivos en días alternos.

35

Los linfocitos T GFP⁺ se enumeran por citometría de flujo utilizando un recuento basado en las perlas. Véase, p. ej., Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009).

40

También se puede medir la expansión sostenida de linfocitos T CAR⁺ en ausencia de reestimulación. Véase, p. ej., Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009). Resumiendo, el volumen medio de linfocitos T (fl) se mide el día 8 de cultivo utilizando un contador de partículas Coulter Multisizer III después de la estimulación con perlas magnéticas recubiertas con α CD3/ α CD28 el día 0, y la transducción con el CAR indicado el día 1.

45

También se pueden utilizar modelos en animales para medir la actividad de una célula que expresa CAR, p. ej., como se describe en el párrafo 698 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. Se puede evaluar la respuesta al tratamiento con CAR dependiente de la dosis, p. ej., como se describe en el párrafo 699 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. La evaluación de la proliferación celular y la producción de citocinas se ha descrito previamente, p. ej., como se describe en el párrafo 700 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. La citotoxicidad se puede evaluar mediante un ensayo de liberación de 51Cr estándar, p. ej., como se describe en el párrafo 701 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. Se pueden utilizar tecnologías de obtención de imágenes para evaluar el tráfico y la proliferación específicos de los CAR en los modelos de animales portadores de tumores, p. ej., como se describe en el párrafo 702 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. También se pueden utilizar otros ensayos, incluidos los escritos en la sección de Ejemplos del presente documento, así como los conocidos en la técnica, para evaluar los CAR descritos en el presente documento.

50

55

Como alternativa, o en combinación con los métodos divulgados en el presente documento, se divulgan métodos y composiciones para uno o más de: detección y/o cuantificación de células que expresan CAR (p. ej., *in vitro* o *in vivo* (p. ej., monitorización clínica)); expansión y/o activación de células inmunitarias; y/o selección específica del CAR, que conlleva el uso de un ligando de CAR. En una realización de ejemplo, el ligando de CAR es un anticuerpo que se une a la molécula CAR, p. ej., se une al dominio de unión al antígeno extracelular de CAR (p. ej., un anticuerpo que se une al dominio de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo antidiotípico; o un anticuerpo que se une a una región constante del dominio de unión extracelular). En otros casos, el ligando de CAR es una molécula antigénica para el CAR (p. ej., una molécula antigénica para el CAR como se describe en la presente).

60

65

En un aspecto, se divulga un método para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR. Por ejemplo, el ligando de CAR puede utilizarse para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR *in vitro* o *in vivo* (p. ej., monitorización clínica de células que expresan CAR en un paciente o administración a un paciente). El método incluye:

5

proporcionar el ligando de CAR (opcionalmente, un ligando de CAR marcado, p. ej., un ligando de CAR que incluye una etiqueta, una perla, una marca radioactiva o fluorescente);

10

adquirir la célula que expresa CAR (p. ej., adquirir una muestra que contiene células que expresan CAR, tal como una muestra de producción o una muestra clínica);

15

poner en contacto la célula que expresa CAR con el ligando de CAR en condiciones donde tiene lugar la unión, y detectar de esta manera el nivel (p. ej., cantidad) de las células que expresan CAR presentes. La unión de la célula que expresa CAR con el ligando de CAR se puede detectar utilizando técnicas estándar tales como FACS, ELISA y similares.

En otro aspecto, se divulga un método para expandir y/o activar células (p. ej., células efectoras inmunitarias). El método incluye:

20

proporcionar una célula que expresa CAR (p. ej., una primera célula que expresa CAR o una célula que expresa CAR de manera transitoria);

25

poner en contacto dicha célula que expresa CAR con un ligando de CAR, p. ej., un ligando de CAR tal como se describe en el presente documento), en condiciones en las que tiene lugar la expansión y/o proliferación de células inmunitarias, y producir de esta manera la población de células activadas y/o expandidas.

En ciertas realizaciones, el ligando de CAR está presente en un sustrato (p. ej., está inmovilizado o unido a un sustrato, p. ej., un sustrato que no tiene origen natural). En algunos casos, el sustrato es un sustrato no celular. El sustrato no celular puede ser un soporte sólido elegido entre, p. ej., una placa (p. ej., una placa de microtitulación), una membrana (p. ej., una membrana de nitrocelulosa), una matriz, un chip o una perla. En las realizaciones, el ligando de CAR está presente en el sustrato (p. ej., en la superficie del sustrato). El ligando de CAR se puede inmovilizar, unir o asociar covalente o no covalentemente (p. ej., entrecruzar) al sustrato. En una realización, el ligando de CAR se une (p. ej., se une covalentemente) a una perla. En las realizaciones mencionadas anteriormente, la población de células inmunitarias se puede expandir *in vitro* o *ex vivo*. El método puede incluir además cultivar la población de células inmunitarias en presencia del ligando de la molécula CAR, p. ej., utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

30

35

En otras realizaciones, el método para expandir y/o activar las células comprende además la adición de una segunda molécula estimuladora, p. ej., CD28. Por ejemplo, el ligando de CAR y la segunda molécula estimuladora se pueden inmovilizar en un sustrato, p. ej., una o más perlas, y proporcionar de esta manera un incremento de la expansión y/o activación celulares.

40

En otro aspecto más, se proporciona un método para seleccionar una célula que expresa CAR o para enriquecerla. El método incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando de CAR tal como se describe en el presente documento; y seleccionar la célula en función de la unión del ligando de CAR.

45

En otros aspectos más, se proporciona un método para la depleción, reducción y/o muerte de una célula que expresa CAR. El método incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando de CAR tal como se describe en el presente documento; y actuar sobre la célula en función de la unión del ligando de CAR, y reducir de esta manera el número, y/o provocar la muerte, de la célula que expresa CAR. En una realización, el ligando de CAR se acopla a un agente tóxico (p. ej., una toxina o un fármaco citoablativo). En otra realización, el anticuerpo anti-idiotípico puede provocar la actividad de células efectoras, p. ej., actividad ADCC o ADC.

50

Los anticuerpos anti-CAR de ejemplo que se pueden utilizar en los métodos divulgados en el presente documento se describen, p. ej., en el documento WO 2014/190273 y en Jena *et al.*, «Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials», *PLOS* marzo de 2013 8:3 e57838.

55

En algunos aspectos y realizaciones, las composiciones y métodos del presente documento se optimizan para un subconjunto específico de linfocitos T, p. ej., tal como se describe en el documento WO 2016/019300. En algunas realizaciones, los subconjuntos optimizados de linfocitos T muestran una persistencia mejorada en comparación con un linfocito T de control, p. ej., un linfocito T de un tipo diferente (p. ej., CD8+ o CD4+) que expresa el mismo constructo.

60

En algunas realizaciones, un linfocito T CD4+ comprende un CAR descrito en el presente documento, donde el CAR comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (p. ej., optimizado para, p. ej., que da lugar a una persistencia mejorada en) un linfocito T CD4+, p. ej., un dominio de ICOS. En algunas realizaciones, un linfocito T CD8+ comprende un CAR descrito en el presente documento, donde el CAR comprende un dominio de señalización intracelular

65

adecuado para (p. ej., optimizado para, p. ej., que da lugar a una persistencia mejorada de) un linfocito T CD8+, p. ej., un dominio de 4-1BB, un dominio de CD28, u otro dominio coestimulador que no sea un dominio de ICOS. En algunas realizaciones, el CAR descrito en el presente documento comprende un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento, p. ej., un CAR que comprende un dominio de unión al antígeno.

Se describe en el presente documento un método para tratar a un sujeto, p. ej., un sujeto que padece cáncer. El método incluye administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de:

1) un linfocito T CD4+ que comprende un CAR (el CAR CD4+), que comprende:

un dominio de unión al antígeno, p. ej., un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, p. ej., un primer dominio coestimulador, p. ej., un dominio de ICOS; y

2) un linfocito T CD8+ que comprende un CAR (el CAR CD8+), que comprende:

un dominio de unión al antígeno, p. ej., un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, p. ej., un segundo dominio coestimulador, p. ej., un dominio de 4-1BB, un dominio de CD28, u otro dominio coestimulador que no es un dominio de ICOS;

en donde el CAR CD4+ y el CAR CD8+ difieren entre sí.

Opcionalmente, el método incluye, además, administrar:

3) un segundo linfocito T CD8+ que comprende un CAR (el segundo CAR CD8+) que comprende:

un dominio de unión al antígeno, p. ej., un dominio de unión al antígeno descrito en el presente documento;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, en donde el segundo CAR CD8+ comprende un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización coestimulador, no presente en el CAR CD8+ y, opcionalmente, no comprende un dominio de señalización ICOS.

Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede incluir, además, la administración de un inhibidor de BTK tal como se describe en el presente documento.

Métodos de suministro de biopolímeros

En algunas realizaciones, una o más células que expresan CAR divulgadas en el presente documento se pueden administrar o suministrar al sujeto mediante un armazón biopolimérico, p. ej., un implante biopolimérico. Los armazones biopoliméricos pueden fomentar o potenciar el suministro, la expansión y/o la dispersión de las células que expresan CAR descritas en el presente documento. Un armazón biopolimérico comprende un polímero biocompatible (p. ej., no induce sustancialmente una respuesta inflamatoria o inmunitaria) y/o un polímero biodegradable que se puede producir de forma natural o sintética. En consecuencia, en algunas realizaciones, los métodos de fabricación del presente documento incluyen un paso para poner en contacto las células que expresan CAR con un biopolímero, p. ej., un biopolímero de esta sección.

Los ejemplos de biopolímeros adecuados incluyen, entre otros, agar, agarosa, alginato, alginato/cemento de fosfato de calcio (CPC), beta-galactosidasa (β -GAL), (1,2,3,4,6-pentaacetil-a-D-galactosa), celulosa, quitina, quitosano, colágeno, elastina, gelatina, ácido hialurónico y colágeno, hidroxiapatita, poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (PHBHHx), poli(lactida), poli(caprolactona) (PCL), poli(lactida-co-glicólido) (PLG), óxido de polietileno (PEO), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), óxido de polipropileno (PPO), alcohol polivinílico (PVA), seda, proteína de soja, y aislado de proteína de soja, solo o combinado con cualquier otra composición polimérica, en cualquier concentración y en cualquier proporción. El biopolímero se puede aumentar o modificar con moléculas que fomentan la adhesión o migración, p. ej., péptidos que mimetizan colágeno que se unen al receptor de colágeno de los linfocitos, y/o moléculas estimuladoras para potenciar el

suministro, expansión o función, p. ej., actividad antineoplásica, de las células que se van a suministrar. El almacén biopolimérico puede ser inyectable, p. ej., un gel, o una composición semisólida o sólida.

5 En algunas realizaciones, las células que expresan CAR descritas en el presente documento se siembran en el almacén biopolimérico antes del suministro al sujeto. En algunas realizaciones, el almacén biopolimérico comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales descritos en el presente documento (p. ej., otra célula que expresa CAR, un anticuerpo o una molécula pequeña) o agentes que potencian la actividad de una célula que expresa CAR, p. ej., incorporados a los biopolímeros del almacén o conjugados con estos. En algunas realizaciones, el almacén biopolimérico se inyecta, p. ej., por vía intratumoral, o se implanta quirúrgicamente en el tumor o a una distancia del tumor lo suficientemente próxima para mediar en un efecto antitumoral. Se describen ejemplos adicionales de composiciones biopoliméricas y métodos para su suministro en Stephan *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2015, 33: 97-101; y el documento WO2014/110591.

15 Métodos de fabricación/producción

En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento incluyen además administrar un agente que provoca la depleción de linfocitos T tras el tratamiento con la célula (p. ej., una célula efectora inmunitaria tal como se describe en el presente documento, p. ej., una célula efectora inmunitaria que expresa CAR descrita en el presente documento), para reducir de esta manera (p. ej., provocar la depleción) las células que expresan CAR (p. ej., las células que expresan CAR CD19). Pueden utilizarse agentes de depleción de linfocitos T de este tipo eficazmente para provocar la depleción de células que expresan CAR (p. ej., células que expresan CAR CD19) para mitigar la toxicidad. En algunas realizaciones, las células que expresan CAR se fabricaron según un método del presente documento, p. ej., se sometieron a ensayo (p. ej., antes o después de la transfección o transducción) según un método del presente documento.

25 En algunas realizaciones, el agente de depleción de linfocitos T se administra una, dos, tres, cuatro o cinco semanas después de la administración de la célula, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias, descrita en el presente documento.

30 En una realización, el agente de depleción de linfocitos T es un agente que provoca la depleción de las células que expresan CAR, p. ej., induciendo citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar un antígeno (p. ej., un antígeno diana) que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, p. ej., ADCC o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en el presente documento también pueden expresar una proteína diana (p. ej., un receptor) que puede ser la diana de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los ejemplos de tales proteínas diana incluyen, entre otros, EpCAM, VEGFR, integrinas (p. ej., integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha4$, $\alpha13/4\beta3$, $\alpha4\beta7$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta$), miembros de la superfamilia de receptor de TNF (p. ej., TRAIL-R1, TRAIL-R2), receptor de PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, receptor de IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/receptor de IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 y EGFR, y versiones truncadas de estos (p. ej., versiones que conservan uno o más epítopos extracelulares pero que carecen de una o más regiones dentro del dominio citoplasmático).

45 En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR coexpresa el CAR y la proteína diana, p. ej., expresa de manera natural la proteína diana o se modifica para que exprese la proteína diana. Por ejemplo, la célula, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias, puede incluir un ácido nucleico (p. ej., vector) que comprende el ácido nucleico de CAR (p. ej., un ácido nucleico de CAR tal como se describe en el presente documento) y un ácido nucleico que codifica la proteína diana.

50 En una realización, el agente de depleción de linfocitos T es un inhibidor de CD52, p. ej., una molécula de tipo anticuerpo anti-CD52, p. ej., alemtuzumab.

55 En otras realizaciones, la célula, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias, expresa una molécula CAR tal como se describe en el presente documento (p. ej., CAR CD19) y la proteína diana reconocida por el agente de depleción de linfocitos T. En una realización, la proteína diana es CD20. En realizaciones, cuando la proteína diana es CD20, el agente de depleción de linfocitos T es un anticuerpo anti-CD20, p. ej., rituximab.

60 En realizaciones adicionales de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, los métodos incluyen además trasplantar una célula, p. ej., una célula madre hematopoyética, o médula ósea, al mamífero.

En otro aspecto, la invención puede utilizar un método para acondicionar un mamífero antes del trasplante de células. El método incluye administrar al mamífero una cantidad eficaz de la célula que comprende un ácido nucleico o polipéptido de CAR, p. ej., un ácido nucleico o polipéptido de CAR CD19. En algunas realizaciones, el trasplante de células es un trasplante de células madre, p. ej., un trasplante de células madre hematopoyéticas, o un trasplante de médula ósea. En

otras realizaciones, acondicionar un sujeto antes del trasplante de células incluye reducir el número de células que expresan la diana en un sujeto, p. ej., células normales que expresan CD19 o células cancerosas que expresan CD19.

Composiciones farmacéuticas y tratamientos

5

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además formular una célula que expresa CAR en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una célula que expresa CAR, p. ej., una pluralidad de células que expresan CAR, como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones, tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos, tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones se pueden formular, p. ej., para la administración intravenosa.

10

15

En una realización, la composición farmacéutica está sustancialmente exenta de, p. ej., no hay niveles detectables de un contaminante, p. ej., seleccionado del grupo que consiste en endotoxina, micoplasma, lentivirus competente para la replicación (LCR), p24, ácido nucleico de VSV-G, gag de VIH, perlas residuales recubiertas con anti-CD3/anti-CD28, anticuerpos de ratón, suero humano combinado, albúmina sérica bovina, suero bovino, componentes de medios de cultivo, componentes de plásmidos o células de empaquetamiento de vectores, una bacteria y un hongo. En una realización, la bacteria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, y grupo A de *Streptococcus pyogenes*.

20

25

Cuando se indica «una cantidad inmunológicamente eficaz», «una cantidad anticancerosa eficaz», «una cantidad inhibidora del cáncer eficaz» o «cantidad terapéutica», la cantidad precisa de las composiciones que se va a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y el estado del paciente (sujeto). Generalmente se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) descritas en el presente documento se puede administrar a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, en algunos casos de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosis. Las células se pueden administrar utilizando técnicas de infusión de uso común en inmunoterapia (véase, p. ej., Rosenberg *et al.*, *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988).

30

35

En algunas realizaciones, una dosis de células CAR comprende aproximadamente 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 o 5×10^8 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende al menos aproximadamente 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 o 5×10^8 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende hasta aproximadamente 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 o 5×10^8 células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende aproximadamente $1,1 \times 10^6$ - $1,8 \times 10^7$ células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende aproximadamente 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 o 5×10^9 células. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende al menos aproximadamente 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 o 5×10^9 células.

40

45

50

La dosis de los tratamientos que se va a administrar a un paciente variará según la naturaleza exacta de la afección que se esté tratando y el receptor del tratamiento. El cambio de escala de las dosis para la administración a seres humanos se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis de CAMPATH, por ejemplo, estará generalmente en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, normalmente administrada a diario durante un periodo de entre 1 y 30 días. La dosis diaria adecuada es de 1 a 10 mg al día, aunque en algunos casos se pueden utilizar dosis mayores de hasta 40 mg al día (descritas en la Patente de EE. UU. N.º 6 120 766).

55

60

En ciertos aspectos, puede resultar deseable administrar células efectoras inmunitarias activadas (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) a un sujeto y posteriormente volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) de esta y reinfundir al paciente estas células efectoras inmunitarias activadas y expandidas (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK). Este proceso se puede realizar varias veces cada pocas semanas. En ciertos aspectos, las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cm^3 a 400 cm^3 . En ciertos aspectos, las células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cm^3 , 30 cm^3 , 40 cm^3 , 50 cm^3 , 60 cm^3 , 70 cm^3 , 80 cm^3 , 90 cm^3 o 100 cm^3 .

65

La administración de las composiciones objeto se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un paciente por vía transarterial, subcutánea,

intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.) o por vía intraperitoneal, p. ej., por inyección intradérmica o subcutánea. Las composiciones de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T, linfocitos NK) se pueden inyectar directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

5 Las células efectoras inmunitarias producidas de acuerdo con los métodos del presente documento se pueden administrar a un sujeto en combinación con una molécula que disminuye la población de linfocitos T_{REG}. En la técnica se conocen métodos que disminuyen el número de (p. ej., provocan la depleción de) los linfocitos T_{REG} e incluyen, p. ej., la depleción de CD25, la administración de ciclofosfamida, la modulación de la función de GITR. Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que la reducción del número de linfocitos T_{REG} en un sujeto antes de la aféresis o antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento reduce el número de células inmunitarias no deseadas (p. ej., T_{REG}) en el microentorno del tumor y reduce el riesgo de que el sujeto recaiga. En una realización, las células que expresan un CAR descritas en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con una molécula que tiene como diana GITR y/o que modula las funciones de GITR, tal como un agonista de GITR y/o un anticuerpo para GITR que provoca la depleción de los linfocitos T reguladores (T_{REG}). En algunas realizaciones, las células que expresan CAR descritas en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con ciclofosfamida. En una realización, las moléculas de unión a GITR y/o moléculas que modulan las funciones de GITR (p. ej., agonista de GITR y/o anticuerpos de GITR que provocan la depleción de Treg) se administran antes de la administración de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En realizaciones, la ciclofosfamida se administra al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. En realizaciones, la ciclofosfamida y un anticuerpo anti-GITR se administran al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. En un caso divulgado en el presente documento, el sujeto padece cáncer (p. ej., un cáncer sólido o un cáncer hemático tal como LLA o LLC). En la invención, el sujeto padece una leucemia. En una realización, el sujeto padece LLC. En realizaciones, el sujeto padece LLA. En algunos casos, el sujeto padece un tumor sólido, p. ej., un cáncer sólido descrito en el presente documento. Los agonistas de GITR de ejemplo incluyen, p. ej., proteínas de fusión con GITR y anticuerpos anti-GITR (p. ej., anticuerpos anti-GITR bivalentes) tales como, p. ej., una proteína de fusión con GITR descrita en la Patente de EE. UU. N.º: 6 111 090, Patente europea N.º: 090505B1, Patente de EE. UU. N.º: 8 586 023, Publicaciones PCT N.ºs: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-GITR descrito, p. ej., en la Patente de EE. UU. N.º: 7 025 962, Patente europea N.º: 1947183B1, Patente de EE. UU. N.º: 7 812 135, Patente de EE. UU. N.º: 8 388 967, Patente de EE. UU. N.º: 8 591 886, Patente europea N.º: EP 1866339, Publicación PCT N.º: WO 2011/028683, Publicación PCT N.º: WO 2013/039954, Publicación PCT N.º: WO2005/007190, Publicación PCT N.º: WO 2007/133822, Publicación de PCT N.º: WO2005/055808, Publicación PCT N.º: WO 99/40196, Publicación PCT N.º: WO 2001/03720, Publicación PCT N.º: WO99/20758, Publicación PCT N.º: WO2006/083289, Publicación PCT N.º: WO 2005/115451, Patente de EE. UU. N.º: 7 618 632 y Publicación PCT N.º: WO 2011/051726.

35 En una realización, las células que expresan un CAR descritas en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con una molécula que reduce la población de linfocitos Treg. En la técnica existe constancia de métodos que reducen (p. ej., provocan la depleción de) el número de linfocitos Treg y estos incluyen, p. ej., depleción de CD25, administración de ciclofosfamida, modulación de la función de GITR. Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que la reducción del número de linfocitos Treg en un sujeto antes de la aféresis o antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento reduce el número de células inmunitarias no deseadas (p. ej., Treg) en el microentorno del tumor y reduce el riesgo de que el sujeto recaiga.

45 En una realización, una terapia descrita en el presente documento, p. ej., una célula que expresa CAR, se administra a un sujeto en combinación con una molécula que tiene como diana GITR y/o que modula las funciones de GITR, tal como un agonista de GITR y/o un anticuerpo para GITR que provoca la depleción de los linfocitos T reguladores (Treg). En algunas realizaciones, las células que expresan CAR descritas en el presente documento se administran a un sujeto en combinación con ciclofosfamida. En una realización, las moléculas de unión a GITR y/o moléculas que modulan las funciones de GITR (p. ej., agonista de GITR y/o anticuerpos de GITR que provocan la depleción de Treg) se administran antes de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, se puede administrar un agonista de GITR antes de la aféresis de las células. En algunas realizaciones, se administra ciclofosfamida al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. En realizaciones, la ciclofosfamida y un anticuerpo anti-GITR se administran al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o reinfusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. En un caso divulgado en el presente documento, el sujeto padece cáncer (p. ej., un cáncer sólido o un cáncer hemático tal como LLA o LLC). En la invención, el sujeto padece una leucemia. En una realización, el sujeto padece LLC. En realizaciones, el sujeto padece LLA. En algunos casos, el sujeto padece un tumor sólido, p. ej., un cáncer sólido descrito en el presente documento.

60 En una realización, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un agonista de GITR, p. ej., un agonista de GITR descrito en el presente documento. En una realización, el agonista de GITR se administra antes que la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En una realización, el sujeto padece LLC.

65 Los agonistas de GITR de ejemplo incluyen, p. ej., proteínas de fusión con GITR y anticuerpos anti-GITR (p. ej., anticuerpos anti-GITR bivalentes) tales como, p. ej., una proteína de fusión con GITR descrita en la Patente de EE. UU.

N.º: 6 111 090, Patente europea N.º: 090505B1, Patente de EE. UU. N.º: 8 586 023, Publicaciones PCT N.ºs: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-GITR descrito, p. ej., en la Patente de EE. UU. N.º: 7 025 962, Patente europea N.º: 1947183B1, Patente de EE. UU. N.º: 7 812 135, Patente de EE. UU. N.º: 8 388 967, Patente de EE. UU. N.º: 8 591 886, Patente europea N.º: EP 1866339, Publicación PCT N.º: WO 2011/028683, Publicación PCT N.º: WO 2013/039954, Publicación PCT N.º: WO2005/007190, Publicación PCT N.º: WO 2007/133822, Publicación PCT N.º: WO2005/055808, Publicación PCT N.º: WO 99/40196, Publicación PCT N.º: WO 2001/03720, Publicación PCT N.º: WO99/20758, Publicación PCT N.º: WO2006/083289, Publicación PCT N.º: WO 2005/115451, Patente de EE. UU. N.º: 7 618 632 y Publicación PCT N.º: WO 2011/051726.

En una realización, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento, en combinación con un inhibidor de BTK descrito en el presente documento, se administra a un sujeto en combinación con un agonista de GITR, p. ej., un agonista de GITR descrito en el presente documento. En una realización, el agonista de GITR se administra antes que la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En una realización, el sujeto padece LLC.

Constructos de CAR de ejemplo

En la Tabla 1 se proporcionan secuencias de dominios de unión anti-CD19. En la Tabla 11 se proporcionan las secuencias de dominios de unión anti-BCMA. Los constructos de CAR completo se pueden generar utilizando cualquiera de los dominios de unión al antígeno descritos en la Tabla 1 o Tabla 11 con uno o más componentes de CAR adicionales proporcionados a continuación.

- Líder (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 1)

MALPVTALLLPLALLLHAARP

- **Líder (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 12)**

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACC
C

- Bisagra de CD8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 2)
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

- **Bisagra de CDS (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 13)**

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG
TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGCGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTG
GACTTCGCCTGTGAT

- Transmembrana de CD8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 6)

IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC

- **Transmembrana (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 17)**

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCAC
CCTTTACTGC

- Dominio intracelular de 4-1BB (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 7)
KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

- **Dominio intracelular de 4-1BB (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 18)**

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGT
GAACTG

- Dominio intracelular de ICOS (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 364)
TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL

• **Dominio intracelular de ICOS (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 365)**

ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAGA
GCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA

5 • **Dominio de CD3 zeta (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 9)**

RVKFSRSADAPAYKQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLQGLSTATKDTYDALHMQLPPR

10 • **CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 20)**

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTC
TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAA
TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC
CTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

15 • **Dominio de CD3 zeta (secuencia de aminoácidos; secuencia de referencia de NCBI NM_000734.3) (SEQ ID NO:10)**

RVKFSRSADAPAYKQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLQGLSTATKDTYDALHMQLPPR

• **CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico; secuencia de referencia de NCBI NM_000734.3); (SEQ ID NO:21)**

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

25 • **Bisagra de IgG4 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO:36)**

ESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM

• **Bisagra de IgG4 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO:37)**

ES 2 948 133 T3

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCA
GCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGT
GACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACC
TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC
AAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCC
AAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACC
AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACA
GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGG
GCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAG
CCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

Promotor EF1 alfa

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGA
GAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGG
GTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGG
AGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTG
CCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACG
GGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTT
GATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAG
GAGCCCTTCGCCTCGTGTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCGC
GTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCC
ATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGA
CGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGG
CCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGG
CCTCGCGCCCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCAC

5

CAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA
ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAA
AAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGC
CGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGG
GGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTT
AGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTGGAGTTTGA
TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTAG
GTGTCGTGA (SEQ ID NO: 11).

Gly/Ser (SEQ ID NO: 25)

10

GGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO: 363): Esta secuencia puede englobar 1-6 unidades repetidas de «Gly Gly Gly Gly Ser»

15

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO: 27)

GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS

20

Gly/Ser (SEQ ID NO: 28)

GGGGS GGGGS GGGGS

Gly/Ser (SEQ ID NO: 29)

GGGS

5

PoliA (SEQ ID NO:30)

aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	300
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	360
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	420
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	480
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	540
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	600
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	660
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	720
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	780
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	840
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	900

ES 2 948 133 T3

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 400

PoliA (SEQ ID NO:35)

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 960
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1020
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860

 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2000

5

Gly/Ser (SEQ ID NO: 38): Esta secuencia puede englobar 1-10 unidades repetidas de «Gly Gly Gly Ser»

10

GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS

En la **Tabla 4** se muestran constructos de CAR CD19 de ejemplo que se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento:

15

Tabla 4: Constructos de CAR CD19

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
Dominio scFv de CAR1	39	

ES 2 948 133 T3

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS
103101	52	
scFv soluble de CAR1 - nt		atggccctccctgaccgcctgctgcttccgctggetcttctgctccacgcgcg tcggccccaaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctattctgtcagcaaggg aacaccctgccctacaccttgacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactactcttcatccc tcaagtacgcgctcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtactattgocgtaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtagctctgggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101	64	
scFv soluble de		<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskylnw yqqkpgqaprllyhtsr lhsgiparfsgsgsdyltltisslqpedfav yfcqqg ntlpytfgqgkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetls lctvs
CAR1 - aa		gvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyssslksrvtiskdnsknqvs lk lssvtaadtavyyca khyyyggsyamdywgqglvtvss <u>hhhhhhh</u>
104875	90	
CAR 1 - Completo - nt		

ES 2 948 133 T3

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
		<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgettccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacaccc tcaactacagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactactcttcatccc tcaagtacgcgctcacatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactatgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtagctctggtcaccgtgt ccagcaccactacccagcaccgagggcaccaccaccggctcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgcgtccggagggatgtagaccgcagctggggggcggctgca taccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtg cttgggggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgccgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggtagcagcgtgctggacaa gcggagaggacgggaccagaaatgggggggaagcgcgcagaaagaatccccaa agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcagatt ggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcagggcctgcgcctc gg</p>
104875	77	
CAR 1 - Completo - aa		<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlliy<u>htsrllhs</u>giparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyc<u>ggg</u> <u>ntlpyt</u>fgqgtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselstctvs gvs1p<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyssslks</u>rvtiskdnsknqvs1k lssvtaadtavyyca<u>hyyyggsyandy</u>wgggtlvtvssttppaprpptpaptias qp1slrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr klllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrffpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreeydvldkrrrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
CAR 2		
Dominio scFv de CAR2	40	

ES 2 948 133 T3

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
		eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavycqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvslklssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywgqgtlvtvss
103102	53	
CAR2 - scFv soluble - nt		atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgccccgaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccggtagcgcgcaaccctgtcttgacagcctcccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagccccggacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggtccattctggaatccctgccaggtcagcggtagcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagggaacaccctgccctacaccttgacagggcaccagctcgagattaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtccggcggaggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaaggtctctggaatggattggagtgatttggggtctgagactactactaccaatcatccctcaagtacgcggtcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggactctggtcaccgtgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103102	65	
CAR2 - scFv soluble - aa		<u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u> eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlttisslqpedfavycqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvslklssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywgqgtlvtvss <u>hhhhhhh</u>
104876	91	
CAR 2 - Completo - nt		

ES 2 948 133 T3

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR 1		
		<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgettccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccagggtcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcaactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactactaccaatcatccc tcaagtacgcgctcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa</p>
		<p>ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgactattgogctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgagccaccaccccggctcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcctgca taccggggtcttgacttcgctgcgatctacatttgggcccctctggctggtgta cttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaagcgcgggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgccggtgaaattcagccgcagcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacia gcggagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcagaaagaatccccaa agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctc gg</p>
104876	78	
CAR 2 - Completo - aa		<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlliy<u>htsrllhs</u>giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfc<u>ggg</u> <u>ntlpyt</u>fgqgkkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselstlctvs gvsllp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyyqsslks</u>rvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyyca<u>hyyyggsyandy</u>wgqgtlvtssttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr klllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeseeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreedyvldkrrrdpemggkprknpqeglynelqkdmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>

ES 2 948 133 T3

CAR 3		
Dominio scFv de CAR3	41	<p>qvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgq gtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratlsqrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcq qgntlpytfgqgkkleik</p>
103104	54	
CAR 3 - scFv soluble - nt		<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cгааaccacttactattcatcttccctgaagtacaggggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggagggc</p>
		<p>ggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccctaggcttcttatctacc acacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgcttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac</p>
103104	66	
CAR 3 - scFv soluble - aa		<p><u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycahyyyggsyamydwgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlsqrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsg tdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik<u>hhhhhhh</u></p>
104877	92	
CAR 3 - Completo - nt		

<p>CAR 3</p>	
	<p>atggctctgcccgtgaccgcaactcctcctgccactggctctgctgcttcacgcccgc tccccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctggggaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccggtgagcggagtgccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctccccgaaagggactggagtgatcggagtgatttggggtag cгааaccacttactattcatcttcctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgce gtgtattactgtgccaaagcattactactatggagggctctacgccatggactactg gggccagggaaactctggctactgtgtcatctggggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaacctgtcc cttctcccggggaacgggctacccttcttctgctgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggatcaacagaagccgggacagggccctaggettcttatctacc acacctctgcctgcatagcgggattccgcacgcttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttcgccgtctactt ctgccagcagggtaacacctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaccactactcccgtccaagggcaccaccctgccccgaccatgcctct cagccgcttccctgcgtccggagcatgtagaccgcagctggggggcgtgca taccgggggtcttgacttcgctgcgatctacatttgggcccctctggctggta cttgccgggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggctcg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaaggcggctgcgaac tgccgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacia gcccagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcgcaaaagaatccccaa agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcagatt ggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccaggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggccctgccgctc</p>
	<p>gg</p>
<p>104877</p>	<p>79</p>
<p>CAR 3 - Completo - aa</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvs wirppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdsknqvslklssvtaadta vyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsqiparfsgsgg tdytltisslqpedfavycqgntlpytfgqgtkleiktttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kkllyifkqpmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreedydvlkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeysei gmkerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p>CAR 4</p>	

ES 2 948 133 T3

CAR 3		
Dominio scFv de CAR4	42	qvqlqesgpglvkpselstlctvsgvslpdygvswirppgkglewivgset tyyqsslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamywgq gtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleik
103106	55	
CAR4 - scFv soluble - nt		atggctctgcccgtgaccgcaectcctcctgccactggctctgctgcttcacgccc tcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgctgagcggagtgctcctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaaagcattactactatggagggctcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtgaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccgggaacgggtaccctttctgtcggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccctaggcttcttattacc acacctctgcctgcatagcgggattcccgcagctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttcgccgtctactt ctgccagcaggtaaacacctgcccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac
103106	67	
CAR4 - scFv Soluble - aa		<u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpselstlctvsgvslpdygvs wirppgkglewivgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadta vyycahyyyggsyamywgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatl lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfcqgqgntlpytfgggtkleik <u>hhhhhhh</u>
104878	93	
CAR 4 -		atggctctgcccgtgaccgcaectcctcctgccactggctctgctgcttcacgccc tcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga
Completo - nt		

ES 2 948 133 T3

CAR 3		
		<p>ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctccccgaaagggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaccacttactatcaatcttcctgaagtcacgggtcaccatttcaagata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggctctacgccatggactactg gggccagggaactctggctactgtgtcatctggaggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccgggaacgggctaccctttcttctcgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggccctaggtctcttatctacc acacctctcgctgcatagcgggattcccgacgctttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttgcgcgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgccccgaccatcgectct cagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcgtgca taccggggcttgacttcgctgcgatctctacatttgggcccctctggctgga cttgcggggtcctgctgcttctactcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacia gcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaagaatccccag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggccctgcccctc gg</p>
104878	80	
CAR 4 - Completo - aa		<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp<u>dygvs</u> wirqppgkglewig<u>viwgsettyyqsslks</u>rvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycak<u>hyyyggsyamy</u>wgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlsc<u>rasqdiskyl</u>nwyqqkpgqaprlliyht<u>srlhs</u>giparfsgsgg tdytltisslqpedfavyf<u>qggntlpyt</u>fgqgtkleiktttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr klllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreeydvlkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdmaeysei gmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
CAR 5		
Dominio scFv de CAR5	43	

ES 2 948 133 T3

CAR 5		
		eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrllhs giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikggggs gggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppp
		gkglewigviwgsettyysslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyyca hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789	56	
CAR5 - scFv soluble - nt		atggccctcccagtgaccgctctgctgctgectctcgcacttcttctccatgccc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcg agagggaacccttcatgcaggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccaggccaggtcctcgcctgctgatctaccacaccagccgct ccacagcggatccccgccagatcttccgggagcgggtctggaaccgactacacc tcaccatctctctctgcagcccaggatcttcccgctctatttctgcagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtaaggtaaccaagctggaaatcaaggaggcgg aggatcaggcgggtggcgaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctg acttgtaccgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttgattcgca gcctccggggaagggtcttgaatggattgggggtgattggggatcagagactact actactcttcatcacttaagtacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789	68	
CAR5 - scFv soluble -aa		<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrllhsqiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetls tctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdnkn qvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvss <u>hhhhhhh</u>
104879	94	
CAR 5 - Completo - nt		

ES 2 948 133 T3

<p>CAR 5</p>	
	<p>atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctggetcttctgctccacgcgcg tggccccgaaattgtgatgaccagtcaccgccaactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccgacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatctctgtcagcaagg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggaggaggaagcggcggaggcgggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctcccgattacgggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggctctggaatggattggagtgatttggggctctgagactact actactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgactattg cgtaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccacccaccccgct cctaccatcgctcccagcctctgtccctgctccggaggcatgtagaccgcagc</p>
	<p>tgggtggggccgtgcatacccggggctctgacttcgctgcgatatctacatttggg ccctctggctggtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcgagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaaagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcatatgc aggccctgccgctcgg</p>
<p>104879</p>	<p>81</p>
<p>CAR 5 - Completo - aa</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlliy<u>htsrllhs</u>giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc<u>ggg</u> <u>ntlpyt</u>fgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgplvkpsetls1 tctvsgvslp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyysss1ks</u>rvtiskdnsk qvs1klssvtaadtavyyca<u>hyyyggsyandy</u>wgggtlvtssttppaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgklllyifkqpmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p>CAR 6</p>	

ES 2 948 133 T3

CAR 5		
Dominio scFv de CAR6	44	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrllhs giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikggggs gggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselsttctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99790	57	
CAR6 - scFv soluble - nt		atggccctcccagtgaccgctctgctgctgctctcgcacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcg agaggcaaccctttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccaggcaggtcctcgcctgctgatctaccacaccagccgct ccacagcggatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacacc tcaccatctcttctctgcagcccgaggatttcgcctctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaaggagggcg aggatcaggcgggtggcggaagcggaggaggtggctcggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctg acttgtaecgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttgattcgcca gcctccggggaagggtcttgaatggattggggtgattggggatcagagactactt actaccagtcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac
		caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgactattg tgccaaacattactattacggaggggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99790	69	
CAR6 - scFv soluble - aa		<u>MALPVTALLPLALLHAARP</u> eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselstt tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdskn qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss <u>hhhhhhh</u>
104880	95	
CAR6 - Completo - nt		

<p>CAR 5</p>	<p>atggccctccctgtcaccgcctgctgcttccgctggetcttctgctccacgcgc tggccccgaaattgtgatgaccagtcaccgccaactcttagcctttcaccgggtg agcgcgaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggtcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatctctgctcagcaaggg aacaccctgccctacaccttgagacaggcaccagctcgagattaaagggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggaggaggaagcggaggcggagggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtgattggggctctgagactactt actaccaatcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgtaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtta ctctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggt cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccggggctctgacttcgctgcgatatctacatttggg cccctctggctggtacttgcgggtcctgctgcttctactcgtgatcactctttac tgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagta cgactgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaaagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgcagg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg</p>
<p>104880 CAR6 - Completo - aa</p>	<p>82 MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlliy<u>htsrllhs</u>giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfc<u>ggg</u> <u>ntlpyt</u>fqqgtkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselsl</p>
	<p>tctvsgvslp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyyqsslks</u>rvtiskdnsk qvs1klssvtaadtavyycak<u>hyyyggsyamdy</u>wgggtlvtvssttppaprptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrvpvtqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapay kqqnqlynelnlgrreedyvldkrrrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>

ES 2 948 133 T3

CAR 7		
Dominio scFv de CAR7	45	<p>qvqlqesgpglvkpssetlslctctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgset tyyssslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamywgq gtlvtvssggggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlslspgeratlscrasqd iskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgtkleik</p>
100796	58	
CAR7 - scFv soluble - nt		<p>atggcactgectgtcactgcctcctgctgectctggcctccttctgcatgccgc caggcccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctcccgggaaaggcctgaatggattggtgtcatctggggttc tgaaaccactactactcatctccctgaagtcagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcagagattgtgatgactcagtca ccagccacctttctctttcaccggcgagagagcaacctgagctgtagaccag ccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gectcctgatctaccatacctcacgcctcactctggtatccccgctcggtttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgccagcagggcaataaccttccctacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccacat</p>
100796	70	
CAR7 - scFv soluble - aa		<p><u>MALPVTALLPLALLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpssetlslctctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdsknqvslklssvtaadta vyycahyyyggsyamywgqgtlvtvssggggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavvyfcqqgntlpytfgqgtkleik<u>hhhhhhh</u></p>
104881	96	
CAR 7 Completo - nt		<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcagccgc tcgccacaagtccagcttcaagaatcaggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactattcatctccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc</p>

ES 2 948 133 T3

<p>CAR 7</p>	
	<p>gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgcoatggactactg gggccagggaaactctggctactgtgtcatctggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggagggtggctccggagggtggcgaagcgaatcgtgatgaccagagc cctgcaaccctgtccctttctccgggggaacgggtaccctttcttctgctgggcac acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccta ggcttcttactaccacacctctgcctgatagcgggattcccgcacgctttagc gggctctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccagga cttcggcgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaaggccaccaccctgcc ccgaccatcgctctcagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggcgtgcataaccgggggtcttgacttcgctgagatctacatttggg cccctctggctggtacttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tghtaagcgggtcgaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgagcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcagatgctccagctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccaaaggggctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggcctgcgcctcgg</p>
<p>104881</p>	<p>83</p>
<p>CAR 7 Completo - aa</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadta vyyca<hygyggyamy< h="">wgqgtlvtvssgggsgggsgggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparf gsgsgtdytltisslqpedfavyfcggntlpytfgqgtkleiktttpaprptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrvpqtqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapay kqqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</hygyggyamy<></p>
<p>CAR 8</p>	
<p>Dominio scFv de CAR8</p>	<p>46</p> <p>qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadta vyycahygyggyamywgqgtlvtvssgggsgggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasq diskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfa vyfcggntlpytfgqgtkleik</p>

ES 2 948 133 T3

CAR 7		
100798	59	
CAR8 -		atggcactgctgtcactgcctcctgctgctctggcctccttctgcatgccgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggtgaagccgtctgaga
scFv soluble -nt		ctctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgca tggatccgccaacctcccgggaaagggcttgaatggattggtgtcatctggggttc tgaaaccacactactaccagctctccctgaagtcagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggaggagggtctggagggtgag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcagattgtgatgactcagtea ccagccaccctttctctttcaccggcgagagagcaaccctgagctgtagaccag ccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gctcctgatctaccatacctcaagccttcaactctggtatccccgctcggtttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgagtgattttctgccagcagggcaataacccttcttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcatcaccac
100798	71	
CARS - scFv soluble - aa		<u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u> qvqlqesgpglvkpselsltctvsgvslpdygvs wirpppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvs1klssvtaadta vyycahyyyggsyamdywgggtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsr1hsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik <u>hhhhhhh</u>
104882	97	
CAR 8 - Completo - nt		

ES 2 948 133 T3

<p>CAR 7</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcaacgcgc tcgccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctgggaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg ggccagggaaactctggctactgtgtcatctggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggagggtggctccggaggcgggggcagaaatcgtgatgaccagagc cctgcaaccctgtcccttctcccgggaaacgggctacccttcttctgctgggcac acaagatatctcaaaatacctcaattggatcaacagaagccgggacaggcccta ggcttcttactaccacacctctgcctcatagcgggattcccgcagccttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccagga cttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgcc ccgaccatcgcctctcagccgttccctcgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtgggcccgtgcatacccggggtcttgacttcgctcgcgatctacattggg cccctctggctggtacttgccgggtcctgctgcttctcactcgtgatcactcttac tgaagcgggtcgaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctcatgagcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg</p>
	<p>aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgca gaaagaatccccagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaaacgcagaagaggcaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggcctgcgcctcgg</p>
<p>104882 CAR 8 - Completo - aa</p>	<p>84 MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvs1klssvtaadta vyyca<hygygyandy>wgqgtlvtvssgggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwqqkpgqaprlliyhtsrllhsqiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavyfcggntlpytfgqgtkleiktttpaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapay kqqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</hygygyandy></p>

ES 2 948 133 T3

CAR 9		
Dominio scFv de CAR9	47	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikggggs gggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgtlvtvss
99789	60	
CAR9 - scFv soluble - nt		atggcccteccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcaacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagcccgcctaccctgtccctgtcaccggcg agagggcaacccttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgccctgctgatctaccacaccagccgct ccacagcggatccccgccagatttccgggagcgggtctggaaccgactacacc tcaccatctcttctctgcagcccaggatttccgctctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcgggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcgg aggatcaggcgggtggcggaagcggaggagggtggctccggaggaggaggtcccaag tgcagcttcaagaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaccctctccctg acttgtaccgtgtccgggtgagcctccccgactacggagtctcttgattcgcca gcctccggggaagggcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagactactt actacaattcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgcccgtgacaccgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctgggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac
99789	72	<u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u> eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw
CAR9 - scFv soluble - aa		yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltiisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsl ctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsk qvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss <u>hhhhhhh</u>
105974	98	
CAR 9 - Completo - nt		

<p>CAR 9</p>	
	<p>atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgcg tggcccgaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccagggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgcctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggaggagg tggcagcggaggagggtgggtccggcggaggaggaagcggaggcggaggccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgcttggatcagaca gccaccggggaagggtctggaatggattggagtatttggggctctgagactactt actacaactcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcctgtactattg cgtaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtg ctctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccggct cctaccatgcctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tggggggcctgcatacccggggcttgaacttcgctgcgatatctacatttggg ccctctggctggacttgcgggtcctgctgctttcactcgatcactctttac tgaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggacagaaccagctctacaacgaactcaatcttggcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcgggaagccgcgca gaaagaatcccgaagaggcctgtacaacgagctccaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgctcgg</p>
<p>105974</p>	<p>85</p>
<p>CAR 9 - Completo - aa</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlliy<u>htsrlhs</u>giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfc<u>ggg</u> <u>ntlpyt</u>fgqgtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslp<u>dygvs</u>wirqppgkglewig<u>viwgsettyynsslks</u>rvtiskdnsk qvs1klssvtaadtavyycak<u>hyyyggsyamdy</u>wgqgtlvtvssttppaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgkrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapay</p>
	<p>kqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p>CAR10</p>	

ES 2 948 133 T3

CAR 9		
Dominio scFv de CAR10	48	<p>qvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamydwgq gtlvtvssggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlsispgeratlsctrasqd iskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlstisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgggtkleik</p>
100796	61	
CAR10 - scFv soluble - nt		<p>atggcaactgectgtcactgccctectgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggccccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctcccggaaggcttgaatggattggtgtcatctggggttc tgaaccacctaactacaactctccctgaagtcagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgtgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggctggaggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcgagattgtgatgactcagtca ccagccacctttctctttcaccggcgagagagcaacctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gcctctgatctaccatactcaagccttcaactctggtatccccgctcggttttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgccagcagggcaataaccttcttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccacat</p>
100796	73	
CAR10 - scFv soluble - aa		<p><u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpselstctvsgvslpdygvs wirppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycahyyyggsyamydwgqgtlvtvssggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlsispgeratlsctrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytlstisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleik<u>hhhhhhh</u></p>
105975	99	
CAR 10 Completo - nt		

<p>CAR 9</p>	
	<p>atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccc tggcccgaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtccttcagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccagggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgcctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggaggaggaagcggagcgggtgggagccag tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactg acttgtactgtgagcggagtgtctctcccgattacgggggtgcttgatcagaca</p>
	<p>gccaccggggaaggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actacaactcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtgactattg cgtaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacccaccggct cctaccatcgctcccagcctctgtccctgctcggaggcatgtagaccgcagc tggggggccgtgcataccggggcttctgacttcgctgcatatctacatttggg ccctctggtggtacttgcggggtctgctgcttctactcgtgatactctttac tgaagcgcggtcggagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagta cgactgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcgggaagcgcgca gaaagaatccccagagggctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcagatgggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgagc actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcaatgc aggccctgccgctcgg</p>
<p>105975</p>	<p>86</p>
<p>CAR 10 Completo - aa</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQDISKYL</u>NW YQKPGQAPRLLIY<u>HTSRLHS</u>GIPARFSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYFC<u>QOG</u> N<u>TLPYTF</u>GQGTKLEIKGGGSGGGSGGGSGGGGQVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLP<u>DYGVS</u>WIRQPPGKLEWIG<u>VIWGSETTYNSSLS</u>KSRVTISKDNSKN QVSLKLSVTAADTAVYYCAK<u>HYYYGGSYAMDY</u>WGQGLVTVSSITTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGLVLLSLVITLY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNLQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>

ES 2 948 133 T3

CAR11		
Dominio scFv de CAR11	49	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrllhs giparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfcqqgntlpytfgggtkleikggggs gggsggggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkgle wigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycahyyyyg gsyamdywgqgtlvtvss
103101	62	
CAR11-scFv soluble - nt		Atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccc tcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagccttccaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggt
		ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatctctgtcagcaagg aacaccctgcctacaccttggaacagggcaccagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaa gcccaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgactgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacagcccggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactactacaattcatccc tcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagggtgactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtgactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctgggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat
103101	74	
CAR11-scFv soluble - aa		<u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u> eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgggtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvs gvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycahyyyyggsyamdywgqgtlvtvss <u>hhhhhhh</u>
105976	100	
CAR 11 Completo - nt		

ES 2 948 133 T3

<p>CAR11</p>	
	<p>atggctctgcccgtgaccgcaactcctcctgccactggetctgctgcttcacgcgc tgcgccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaagggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggtccggagggtggcggaaagcgaatcgtgatgacccagagc cctgcaaccctgtcccttctcccgggaacgggtacccttcttctgctgggcac acaagatatctaaaatacctcaattggtatcaacagaagcgggacaggcccta ggcttcttatctaccacacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgcttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccagga cttcgccttacttctgcccagcagggtaacaccctgcgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgcc ccgaccatgcctctcagccgttccctgctcggaggcatgtagaccgcagc tggtagggccgtgcataccggggctctgacttcgctgcatatctacatttggg ccctctggctggtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgaagcgggtcgaagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggttccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttgggtcggagagaggagta</p>
	<p>cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcga gaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaaggccacgagc actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg</p>
<p>105976</p>	<p>87</p>
<p>CAR 11 Completo - aa</p>	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDIYGV WIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTA VYYCAKHYYYGGSYAMDYWQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGGSEIVMTQS PATLSLSPGERATLSCASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARF'S GSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNLPTTFGQGTKLEIKITTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLLSLVITLY CKRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGCCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQLPPR</p>
<p>CAR12</p>	

ES 2 948 133 T3

CAR11		
Dominio scFv de CAR12	50	<p>qvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamydwgq gtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfcq qgntlpytfgggtkleik</p>
103104	63	
CAR12 - scFv soluble - nt		<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcaegccgc tcgcccacaagtcacgcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaaactctggtcactgtgtcatctggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccctaggcttcttatctacc acacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgcttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttcgcccgtctactt ctgccagcgggtaaacacctgccgtacaccttcggccagggcaccagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac</p>
103104	75	
		<p><u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvs</p>
CAR12 - scFv soluble -aa		<p>wirpppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycahyyyggsyamydwgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlsl lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsg tdytltlisslqpedfavyfcqgntlpytfgggtkleik<u>hhhhhhh</u></p>
105977	101	
CAR 12 - Completo - nt		

ES 2 948 133 T3

<p>CAR11</p>		<p>atggccctcctgtcaccgcctgetgcttccgctggetcttctgctccacgcgc tggcccgaaattgtgatgaccagtcaccgcctcttagcctttcaccggg agcgcgaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaataccttaattg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccgct ccattctggaatcctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacccc tcaatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacacctgcctacaccttgagcagggcaccagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggagggaagccaggtccaactccaagaa gcgaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctcccagattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgattggggctctgagactacttactacaactcatcc tcaagtacgcgtcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcctgtactattgcgctaacattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactgggacagggactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccagcaccgagggcaccaccccgctcctaccatcgctcc cagcctctgtcctcgctccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcctgca taccggggtcttgacttcgctcgatctacatttgggcccctctggctgga cttgcggggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggctcg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggagggaaggcggctgcgaa tgcgctgaaattcagcgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaa cagctctacaacgaactcaatcttggcggagagaggtagcagctgctggcaa gaggagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcagaaagaatcccag agggcctgtacaacgagctccaaaggataagatggcagaagcctatagcagatt ggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggccctgccgcctc gg</p>
<p>105977 CAR 12 - Completo - aa</p>	<p>88</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQDISKYL</u>N YQQKPGQAPRLLIYH<u>TSRLHS</u>GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQ<u>Q</u>G N<u>TLPYT</u>FGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GVSLPD<u>YGV</u>SWIRQPPKGLEWIGV<u>IWGSETTYNSSLK</u>SRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAKH<u>YYYGGSYAMDY</u>WGQGTLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR</p>
		<p>KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGN QLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>

ES 2 948 133 T3

<p>CTL019</p>		
<p>CTL019 - scFv soluble-marcador His - nt</p>	<p>362</p>	<p>atggccctgcccggtcacgcgtctgctgctgccccttgcctctgcttcttcatgcagc aaggccggacatccagatgacccaaaccacctcatccctctctgctctcttggag acagggtgaccatttcttgtcgccagccaggacatcagcaagtatctgaactgg tatcagcagaagccggacggaaccgtgaagctcctgatctaccatacctctcgct gcatagcggcgtgccctcacgcttctctggaagcggatcaggaaccgattattctc tcaactatttcaaactcttgagcaggaagatattgccacctatttctgccagcaggg aataccctgccctacaccttcggaggagggaccaagctcgaatcaccgggtggagg aggcagcggcggtggagggtctggtggagggtggttctgaggtgaagctgcaagaat caggccctggacttgtggcccttcacagtcctgagcgtgacttgcaaccgtgtcc ggagtctcctgccgactacggagtgtcatggatcagacaacctccacggaaagg actggaatggctcgggtgtcatctgggtagcgaactacttactacaattcagccc tcaaagcaggctgactattatcaaggacaacagcaagtcacaagcttttcttaag atgaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgtgctaagcactacta ctacggaggatcctacgctatggattactggggacaaggtacttccgtcactgtct cttcacaccatcatcaccatcaccatcac</p>
<p>CTL019 - scFv soluble-marcador His - aa</p>	<p>76</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u>diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevklqesgplvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirqprrglewlgviwgsettyynsalksrliikdnksqvfllk mnsdqtdtdaiyycahyyyggsyandywgqgtsvtvss<u>hhhhhhh</u></p>
<p>CTL019 Completo - nt</p>	<p>102</p>	<p>atggccttaccagtgaccgccttgcctcctgccgctggccttgcctgctccacgccgc caggccggacatccagatgacacagactacatcctcctgtctgctctcttggag acagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaattgg tatcagcagaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagatt acactcaggagtccatcaaggttcagtggcagtggtctggaacagattattctc tcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacaggg aataccgcttcogtacacgcttcggaggggggaccaagctggagatcacaggtggcgg tggctcggcggtggtgggtcgggtggcgcgatctgaggtgaaactgcaggagt caggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcaactgtctca gggtctcattaccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagg tctggagtggctgggagtaaatatgggtagtgaaaccacataactataattcagctc tcaaaccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaa atgaacagctctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattatta</p>

CTL019		
		<p>ctacggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgtct cctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgctcg cagccccctgtccctgcgccagaggcggtgccggccagcgggggggcgagtgca cacgagggggtggacttcgctgtgatctacatctggcgcccttggccggga cttgtggggccttctcctgtcactggttatcacctttactgcaaacggggcaga aagaaactcctgtatattcaacaaccattatgagaccagtacaaactactca agaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaggaggatgtgaac tgagagtgaagttcagcaggagcgagacgccccgcgtacaagcagggccagaac cagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaa gagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctcagg aaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgaatt gggatgaaaggcgagcgccggaggggcaagggcacgatggcctttaccagggtct cagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctc gc</p>
CTL019 Completo - aa	89	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvkllyhtsrhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnksqvflk mnsqtddtaiyycahyyyggsyamdywqgtsvtvssttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqqn qlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
Dominio scFv de CTL019	51	<p>diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvkllyhtsrhsg vpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggs ggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirpprkgle wlgviwgsettyynsalksrltiikdnksqvflkmnsqtddtaiyycahyyyg gsyamdywqgtsvtvss</p>

5 En la Tabla 11 se muestran constructos CAR anti-BCMA de ejemplo (p. ej., secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de los dominios scFv y moléculas CAR) que se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento. Se subrayan las HC CDR de la cadena pesada (HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3) y las LC CDR (LC CDR1, LC CDR2, LCCDR3). También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las secuencias variables de la cadena pesada y variables de la cadena ligera para cada scFv.

Tabla 11. Secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de dominios scFv anti-BCMA y moléculas CAR anti-BCMA

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
139103		

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
139103-aa del dominio scFv	140	<p>QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLGWVSGISRSGENTYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARSPAHYYGGMDVWQGTITVTVSSASGGGGSG GRASGGGSDIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSWTFGQGTKLEIK</p>
139103-nt del dominio scFv	141	<p>CAAGTCAACTCGTGGAACTCGGTGGAGGACTCGTCAACCCGGAAAGATCGCTTAGACTGTGCGT GTGCCGCCAGCGGGTTCACTTTCTCGAACTACGCGATGTCCTGGGTCCGCCAGGCACCCGAAA GGGACTCGGTGGGTGTCCGGCATTTCCTGGTCCGGCGAAAAATACCTACTACGCCGACTCCGTG AAGGGCCGCTTACCACTCTCAAGGGACAACAGCAAAAACACCCTGTACTTGCAAATGAACTCCC TCGGGATGAAGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGCTGCCATTACTACGGCGGAAT GGACGTCTGGGGACAGGGAACCACTGTGACTGTGACGACGCGCTCGGGTGGCGCGGCTCAGGG GGTCCGGCCTCCGGGGGGGAGGGTCCGACATCGTGCTGACCCAGTCCCCGGGAACCCTGAGCC TGAGCCCGGGAGAGCGCGCACCCTGTCATGCCGGGCATCCAGAGCATTAGCTCCTCCTTTCT CGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCCGAGGCTGCTGATCTACGGCGCTAGCAGAAGG GCTACCGGAATCCAGACCCGTTCTCCGGCTCCGGTCCGGGACCGATTTCACCCTTACTATCT CGCGCCTGGAACCTGAGGACTCCGCGCTTACTACTGCCAGCAGTACCCTCATCCCCGTCGTG GACGTTCGGACAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAG</p>
139103-aa de VH	142	<p>QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLGWVSGISRSGENTYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARSPAHYYGGMDVWQGTITVTVSS</p>
139103-aa de VL	143	<p>DIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSG SGGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSWTFGQGTKLEIK</p>
139103- aa del CAR completo	144	<p>MALPVTALLLP LALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGK GLGWVSGISRSGENTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARSPAHYYGGM DVWQGTITVTVSSASGGGGSGGRASGGGSDIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFL AWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSW TFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGQNLYNELNLRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
139103- nt del CAR completo	145	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCC AAGTGCAACTCGTGGAACTCTGGTGGAGGACTCGTGCAACCCGGAAGATCGCTTAGACTGTCGTG TGCCGCCAGCGGGTTCACCTTCTCGAACTACGCGATGTCCTGGGTCCGCCAGGCACCCGAAAG GGACTCGGTTGGGTGTCGGCATTTCCTCCGGTCCGGCGAAAATACCTACTACGCCGACTCCGTGA AGGGCCGCTTACCATCTCAAGGGACAACAGCAAAAACCCCTGTACTTGCAAATGAACTCCCT GCGGGATGAAGATACAGCCGTGACTATTGCGCCCGGTGCGCTGCCATTACTACGGCGGAATG GACGCTCGGGACAGGGAACCACTGTGACTGTGACGAGCGCTCGGGTGGCGGGCTCAGGGG GTCGGGCCCTCCGGGGGGGAGGGTCCGACATCGTGTGACCCAGTCCCGGGAAACCTGAGCCT GAGCCCGGAGAGCGCGCACCTGTCAATGCCGGGCATCCAGAGCATTAGCTCCTCCTTTCTC GCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCGGAGGCTGCTGATCTACGGCGCTAGCAGAAGG CTACCGGAATCCAGACCGGTTCTCCGGCTCCGGTCCGGGACCGATTTCACCTTACTATCTC GCGCCTGGAACCTGAGGACTCCGCGCTACTACTGCCAGCAGTACCCTCATCCCCGTCGTGG ACGTTCGGACAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCT CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGG TGGGCGGTGCAATACCGGGGTTCTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCT GGTAATGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGTACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGA AGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCCAAGTCCGCGTGAATTCAGCCG AGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTC GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCC GCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCC TATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGG GACTCAGCACCCACCAAGGACACTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCGCCCTCGG</p>
139105		
139105-aa del	146	<p><u>QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYADSV</u></p>
dominio scFv		<p><u>KGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCSVHSLAYWGQGLVTVTSASGGGSGGRRASG</u> <u>GGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSGYNLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA</u> <u>SGVPRDRFSGSGSDTFLKISRVEAEDVGVVYCMQALQTPYTFGQGTKVEIK</u></p>
139105-nt del dominio scFv	147	<p>CAAGTGCAACTCGTCAATCCGGTGGAGGTCTGGTCCAACCTGGTAGAAGCCTGAGACTGTCGT GTGCGGCCAGCGGATTCACCTTTGATGACTATGCTATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGAAA GGGCCTGGAATGGGTGTCGGGAATTAGCTGGAACCTCCGGTCCATTGGCTACCGCAGCTCCGTG AAGGGCCGCTTACCATCTCCCGGACAACGCAAGAAGTCCCTGTACTTGCAAAATGAACTCGC TCAGGGCTGAGGATACCGCGCTGTACTACTGCTCCGTGCAATCCTTCCCTGGCCTACTGGGGACA GGAACCTCTGGTCACCGTGTGAGCGCCTCCGGCGCGGGGGCTCGGGTGGACCGGGCTCGGGC GGAGGGGGTCCGACATCGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCTTGCCCGTACTCCCGGAGAGC CTGCATCCATCTCCTGCCGTCATCCAGTCCCTTCTCCACTCCAACGGATACAACCTACCTCGA CTGGTACCTCCAGAAGCCGGACAGAGCCCTCAGCTTCTGATCTACTGGGGTCAAATAGAGCC TCAGGAGTGCCGGATCGGTTACGGGATCTGGTTCGGGAACTGATTTACTCTGAAGATTTCCC CGGTGGAAGCCGAGGAGCTGGGCGTCTACTACTGTATGCAGGCGCTGCAGACCCCTATACCTT CGGCCAAGGACGAAAGTGGAGATCAAG</p>
139105-aa de VH	148	<p><u>QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYADSV</u> <u>KGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCSVHSLAYWGQGLVTVTS</u></p>
139105-aa de VL	149	<p><u>DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSGYNLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP</u> <u>DRFSGSGSDTFLKISRVEAEDVGVVYCMQALQTPYTFGQGTKVEIK</u></p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
139105- aa del CAR completo	150	<p>MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCSVHSFLAYWQQ GTLVTVSSASGGGSGGRASGGGSDIVMTQTPLSLPTPGEPAISCRSSQSLLSNGYNYLD WYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSDTFLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTF GGQTKVEIKTTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
139105- nt del CAR completo	151	<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCCTCGGCCCC AAGTGCAACTCGTCAATCCGGTGGAGGCTGGTCCAACCTGGTGAAGCCTGAGACTGTCGTG TCCGCCAGCGGATCACCTTTGATGACTATGCTATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGAAAG GGCCTGGAATGGGTGTCGGGAATTAGCTGGAACCTCCGGTCCATTGGCTACGCCGACTCCGTGA AGGCCGCTTACCATCTCCCGGACAAACGCAAGAAGTCCCTGACTTGCAAATGAACTCGCT CAGGGCTGAGGATACCGCGCTGACTACTGCTCCGTGCATTCCTTCTGGCCTACTGGGGACAG GGAACCTGGTCAACCGTGTGAGCGCTCCGGCGCGGGGGCTCGGGTGGACGGGCCTCGGGCG GAGGGGGTCCGACATCGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCTTCCCGTACTCCCGGAGAGCC TGCAATCCATCTCTGCGGTCATCCAGTCCCTTCTCCACTCCAACGGATACAACACTACCTCGAC TGGTACCTCCAGAAGCCGGACAGAGCCCTCAGCTTCTGATCTACCTGGGGTCAAATAGAGCCT CAGGAGTGCCGATCGGTTACGCGGATCTGGTTCGGGAACGATTTACTCTGAAGATTCCCG CGTGAAGCCGAGGACGTGGGGCTACTACTGTATGCAGGCGCTGCAGACCCCTATACCTTC GGCCAAAGGACGAAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCCAGGCCACCCACCCCGGCTC CTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGC CGTGCA TACCCGGGGTCTTGACTTCGCTCGGATACTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACT TGCGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGGGAAGAAGCTGC TGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTC ATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAAGTGCAGCTGAAATTCAGCCGACGCGCA GATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGACAGACAGCTTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGAGAG AGGAGTACGACGTGCTGGACAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGAGCCGCGCAG AAAGAA TCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGC GAGATTGGTATGAAAGGGGACGACAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCA GCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCCCTCGG</p>
139111		
139111-aa del dominio scFv	152	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTITVTVSSASGGGSGGRASG GGGSDIVMTQTPLSLPTPGEPAISCKSSQSLLRNDGKTPLYWYLQKAGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSDTFLKISRVEAEDVGAYCMQNIQFPSFGGGTKLEIK</p>
139111-nt del dominio scFv	153	<p>GAAGTGCAATTGTTGGAATCTGGAGGAGGACTGTGACGCTGGAGGATCACTGAGACTTTCTGT GTGCGGTGTCAGGCTTCCGCTGAGCAACCCAGGCATGAGCTGGGTGCGGAGAGCCCCGGGAA GGGTCTGGAATGGGTGTCGGGATCGTCTACTCCGTTCAACTTACTACGCCGAAGCGTGAAG GGTTCGCTTACCATTTCCCGGATAACTCCCGGAACCCCTGTACTTCAAATGAACCTCCCTGC GGCCGAGGACACCGCATCTACTACTGTTCCGCGCATGGAGGAGAGTCCGATGCTGGGGACA GGGCAC TACCGTACCGTGTGACGCGCTCCGGGGGAGGAGGCTCCGGCGGTCCGCGCTCCGGG GGGGGTGGCAGCGACATTTGATGACGCAGACTCCACTCTCGTGTCCGTGACCCCGGACAGC CCGCGTCCATCTCGTGAAGAGCTCCAGAGCCTGCTGAGGAACGACGGAAGACTCCTCTGTA</p>

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>TTGGTACCTCCAGAAGGCTGGACAGCCCCGCAACTGCTCATCTACGAAGTGTCAAATCGCTTC TCCGGGGTGCCGGATCGGTTTTCCGGCTCGGGATCGGGCACCAGCTTCACCCTGAAAAATCTCCA GGGTCGAGGCCGAGGACGTGGGAGCCTACTACTGCATGCAAAACATCCAGTTCCCTTCCCTTCGG CGCGGCACAAAGCTGGAGATTAAG</p>
139111-aa de VH	154	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQTTVTVSS</p>
139111-aa de VL	155	<p>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLRNDGKTPLYWYLQKAGQPPQLLIYEVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGAYYCMQNIQFPSFGGGTKLEIK</p>
139111- aa del CAR completo	156	<p>MALPVTALLPLALLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGK GLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQ GTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLRNDGKTPLY WYLQKAGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGAYYCMQNIQFP SFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGDCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDYDALHMQLPPR</p>
139111- nt del CAR completo	157	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTGCAATTGTTGGAATCTGGAGGAGGACTTGTGCAGCCTGGAGGATCACTGAGACTTTCGTG TCGGGTGTACAGCTTCGCCCTGAGCAACCACGGCATGAGCTGGGTGCGGAGAGCCCGGGGAAG GGCTGGAATGGGTGTCCGGGATCGTCTACTCCGGTTCAACTTACTACGCCGCAAGCGTGAAGG GTCGCTTACCATTTCGGCGGATAACTCCCGGAACACCCGTACCTCCAATGAACCTCCTGGC GCCCGAGGACACCGCCATCTACTACTGTTCGGCGCATGGAGGAGAGTCCGATGTCTGGGGACAG GGCACTACCGTGACCGTGTGAGCGCCTCGGGGGAGGAGGCTCCGGCGGTCCGCGCTCCGGGG GGGGTGGCAGCGACATGTGATGACGCACTCCACTCTCGCTGTCGGTGACCCCGGGACAGCC CGGTCCATCTCGTGCAAGAGCTCCAGAGCCTGCTGAGGAACAGCGAAAGACTCCTCTGTAT TGGTACCTCCAGAAGGCTGGACAGCCCCGCAACTGCTCATCTACGAAGTGTCAAATCGCTTCT CCGGGGTGCGGATCGGTTTTCCGGCTCGGGATCGGGCACCAGCTTACCCTGAAAAATCTCCAG GGTGAGCGCGAGGACGTGGGAGCCTACTACTGCATGCAAAACATCCAGTTCCTTCCCTTCGGC GGCGGCACAAAGCTGGAGATTAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTA CCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTCGCTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGT GCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTCGGATATCTACATTTGGGCCCCCTCGGCTGGTACTTGC GGGTCCCTGCTGCTTTCACCTGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGGGTCCGGAAGAAGCTGCTGT ACATCTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATG CCGGTTCAGAGGAGGAGGAGGAGGCGGCTGCGAAGTGCAGCTGAAATTCAGCCGAGCGCAGAT GCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACAGCTCTACAACGAACCTAATCTGGTCCGAGAGAGG AGTACGAGTGTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCGCGCAGAAA GAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAG ATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCA CCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
139100		
139100-aa del dominio scFv	158	<p>QVQLVQSGAEVRKTKASVKVSKASGYIFDNFGINWVRQAPGQGLEWMGWINPKNNNTNYAQKF QGRVTITADESTNTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGPYYYSYMDVWGQTMVTVSSASGGGGSG GRASGGGSDIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSSQSLLSNGYLNWYLQKPGQSPQLLIY GSKRASGVPDRFSGSGSGTDFLHITRVGAEDVGVYYCMQALQTPYTFGGQTKLEIK</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
139100-nt del dominio scFv	159	<p>CAAGTCCAACCTCGTCCAGTCCGGCCGAGAAAGTCAGAAAACCGGTGCTAGCGTGAAAGTGTCCCT GCAAGGCCTCCGGCTACATTTTCGATAACTTCGGAATCAACTGGGTCAGACAGGCCCGGGCCA GGGGCTGGAATGGATGGGATGGATCAACCCCAAGAACAACAACCAACTACGCACAGAAGTTC CAGGGCCGGTACTATCACCGCCGATGAATCGACCAATACCGCTACATGGAGGTGTCTCCC TCCGGTCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGCGCGAGGGGCCATACTACTACCAAAGCTACAT GGACGTCTGGGACAGGGAACCATGGTGACCGTGTTCATCCGCCTCCGGTGGGAGGCCTCCGGG GGGCGGGCTTCAGGAGCGGAGGAAGCGATATTGTGATGACCCAGACTCCGCTTAGCCTGCCCG TGACTCCTGGAGAACCGGCCTCCATTTCTGCGCGTCTCGCAATCACTCCTGCATTCCAACGG TTACAACCTACCTGAATTGGTACCTCCAGAAGCCTGGCCAGTCGCCCCAGTTGCTGATCTATCTG GGCTCGAAGCGGCCTCCGGGTGCTGACCGGTTTAGCGGATCTGGGAGCGGCACGGACTTCA CTCTCCACATCACCCGCGTGGGAGCGGAGGACGTGGGAGTGTACTACTGTATGCAGGCCGTGCA GACTCCGTACACATTCCGACAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG</p>
139100-aa de VH	160	<p><u>QVQLVQSGAEVRK</u>TGASVKV<u>SCKASGYIFDN</u>FGINWVRQAPGQGLEWMGWINPKNNNTNYAQKF <u>QGRVTITADES</u>TNTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGPYYYQSYMDVWGQGTMTVTVSS</p>
139100-aa de VL	161	<p>DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLNWYLQKPGQSPQLLIYLGSKRASGVP DRFSGSGSGTDFTLHITRVGAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK</p>
139100- aa del	162	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVRKKGASVKVSKASGYIFDNFGINWVRQAPGQ GLEWMGWINPKNNNTNYAQKFQGRVTITADESNTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGPYYYQSYM</p>
CAR completo		<p>DVWGQGTMTVTVSSASGGGGSGGRASGGGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNG YNYLNWYLQKPGQSPQLLIYLGSKRASGVPDRFSGSGSGTDFTLHITRVGAEDVGVYYCMQALQ TPYTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGDCSRFPPEEEGGCELRVK FSRSADAPAYKQGQNLQYNEINLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
139100- nt del CAR completo	163	

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCC AAGTCCAACTCGTCCAGTCCGGCGCAGAAGTCAGAAAAACCGGTGCTAGCGTGAAGTGTCTCG CAAGGCCTCCGGCTACATTTTCGATAAAGTTCGGAATCAACTGGGTGACACAGGCCCCGGGCCAG GGGCTGGAATGGATGGATGGATCAACCCCAAGAACAACAACACCAACTACGCACAGAAGTTC AGGGCCCGTACTATCACCCCGATGAATCGACCAATACCGCTACATGGAGGTGTCTCCCT GCGGTCCGAGGACTGCGGTGTATTACTGCGCGAGGGGCCATACTACTACCAAAGCTACATG GACGCTCGGGACAGGGAACCATGGTGACCGTGTATCCGCCCTCCGGTGGTGGAGGCTCCGGGG GCGGGCTTCAGGAGGCGGAGGAAGCGATATTGTGATGACCCAGACTCCGCTTAGCCTGCCCGT GACTCCTGGAGAACCGGCCCTCATTTCCTGCCGGTCTCGCAATCACTCCTGCATTCCAACGGT TACAAC TACCTGAATTGGTACCTCCAGAAGCTGGCCAGTGCCTCCAGTGTGATCTATCTGG GCTCGAAGCGCCCTCCGGGGTGCCTGACCGGTTTAGCGGATCTGGGAGCGGCACGGACTTCAC TCTCCACATCACCCCGTGGGAGCGGAGGAGCTGGGAGTGTACTACTGTATGCAGGCGCTGCAG ACTCCGTACACATTCGACAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCGGAGG CACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCTCTGTCCCTCCGAGGATGTAGACC CGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTCGGATATCTACATTTGGGCC CCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTCTGCTGCTTTCCTACTCGTATCACTCTTACTGTAAGCGCG GTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGA GGAGGACGGCTTTCATGCCGGTTCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCCCGTGA TTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCTTACAGCAGGGGAGAAACAGCTTACAAACGAACTCA ATCTTGGTCCGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACCGGACCCAGAAATGGG CGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCCGTGTACACAGCTCCAAAGGATAAAGATG GCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGAC TGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCC GCCTCGG</p>
139101		
139101-aa del dominio scFv	164	<p><u>QVQLQESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSDAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTTYADSV</u> <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLDSSGYYARGPRYWQGTTLTVSVSASGGG</u> <u>GSGGRASGGGSDIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYGAS</u> <u>TLASGVPARFSGSGSTHFTLTINSLQSEDSATYYCQSYKRASFGQGTKEIK</u></p>
139101-nt del dominio scFv	165	<p>CAAGTGCAACTTCAAGAATCAGGCGGAGGACTCGTGCAGCCCGGAGGATCATTGCGGCTCTCGT GCGCCGCTCGGGCTTACCTTCTCGAGCGACGCCATGACTGGGTCCGCCAGGCCCGGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGCTGTGATTTCCGGCTCCGGGGAACTACGTACTACGCCGATCCCGTG AAAGGTTCGTTCACTATCTCCCGGACAAACAGCAAGAACCCTTTATCTGCAAAATGAATCCC TCCGCGCGGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCAAGCTGGACTCCTCCGGGCTACTACTATG CCGGGTCCGAGATACTGGGGACAGGGAACCTTCGTGACCGTGTCTCCCGCTCCGGCGGAGGA GGTTCGGGAGGGCGGGCTCCGGCGGCGGGTTCGGACATCCAGCTGACCCAGTCCCATCCT CACTGAGCGCAAGCGTGGGGACAGAGTACCATTTACATGCAGGGCGTCCAGAGCATCAGCTC CTACCTGAACCTGGTACCAACAGAAGCTGGAAAGGCTCCTAAGCTGTTGATCTACGGGGCTCG ACCCTGGCATCCGGGGTCCCGCGAGGTTTAGCGGAAGCGGTAGCGGCACTCACTTCACTCTGA CCATTAACAGCTCCAGTCCGAGGATTCAGCCACTTACTACTGTCAGCAGTCTACAAGCGGGC CAGCTTCGGACAGGGCACTAAGGTCGAGATCAAG</p>
139101-aa de VH	166	<p><u>QVQLQESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSDAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGTTYADSV</u> <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLDSSGYYARGPRYWQGTTLTVSVS</u></p>
139101-aa de VL	167	<p><u>DIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYGASTLASGVPARFSG</u> <u>SGSTHFTLTINSLQSEDSATYYCQSYKRASFGQGTKEIK</u></p>
139101- aa del CAR completo	168	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDAMTWVRQAPGK GLEWVSVLSGSGGTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRRAEDTAVYYCAKLDSSGYYA <u>RGPRIWQGT</u>LTVTVSSASGGGSGGRASGGGSDIQLTQSPSSLSASVGRVITICRASQSISS <u>YLNWYQKPKAPKLLIYGASTLASGVPARFSGSGSGTHFTLTINSLQSEDSATYYCQQSYKRA</u> <u>SFGQGT</u>KVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR</p>
139101- nt del CAR completo	169	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCCTCGGCCCC AAGTGCAACTTCAAGAATCAGCGGAGGACTCGTGCAGCCCGGAGGATCATTGCGGCTCTCGTG CGCCGCCCTCGGGCTTACCTTCTCGAGCGACGCCATGACCTGGGTCGCCAGGCCCGGGGAAG GGGCTGGAATGGGTGTCTGTGATTTCCGGCTCCGGGGAACTACGTACTACGCCGATTCCGTTGA</p>
		<p>AAGGTCGCTTCACTATCTCCCGGACAAACAGCAAGAACACCCCTTATCTGCAAAATGAATCCCT CCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGCTGGACTCCTCGGGCTACTACTATGCC CGGGGTCCGAGATACTGGGACAGGGAACCCCTCGTGACCGTGTCTCCGCGTCCGGCGGAGGAG GGTCGGGAGGGCGGGCCTCCGGCGCGGCGGTTCGGACATCCAGCTGACCCAGTCCCCATCCTC ACTGAGCGCAAGCGTGGGCGACAGAGTCACCATACATGCAGGGCGTCCAGAGCATCAGCTCC TACCTGAACTGGTACCAACAGAAGCCTGGAAAAGGCTCCTAAGCTGTGATCTACGGGGCTTCGA CCCTGGCATCCGGGTGCCCGCAGGTTTAGCGGAAGCGGTAGCGGCACCTCACTTCACTCTGAC CATTAAACAGCCTCCAGTCCGAGGATTACGCCACTTACTACTGTACAGAGTCTACAAGCGGGCC AGCTTCGGACAGGGCACTAAGTTCGAGATCAAGACCCTACCCAGCACCGAGCCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGG TGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTTGCATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCT GGTACTTGGCGGGTCTGTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGA AGCTGCTGTACATCTTAAAGCAACCCCTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTTATGCGCGTTCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTCCGCGGTGAAATTCAGCCGC AGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACCTCAATCTGGTC GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACCGGGAAGAAATGGCGGGGAGCC GCGCAGAAAGAA TCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCAAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCC TATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGG GACTCAGCACCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
139102		
139102-aa del dominio scFv	170	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSNYGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKF <u>QGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGP</u>YYYYMDVWGKGMVTVSSASGGGSGGR ASGGGGSEIVMTQSPSLPVTPEPASI SCRSSQSLLYSNGYNYVDWYLQKPGQSPQLLIYLGSL NRASGVPDRFSGSGSTDFKLIQISRVEAEDVGIYYCMQGRQFPYSGFGQGTKEIK</p>
139102-nt del dominio scFv	171	<p>CAAGTCCAAGTGGTCCAGAGCGGTGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGAGCGAGCGTGAAGTGTCTT GCAAGGCTTCCGGGTACACCTTCTCCAAGTACGGCATCACTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGACA GGCCTGGAATGGATGGGTGGATTTCCGCGTACAACGGCAATACGAAGTACGCTCAGAAAGTTC CAGGGTAGAGTGACCATGACTAGGAACACCTCCATTTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCC TGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGACTATTGCGCCCGGGACATACTACTACTACATGGATGT TGGGGGAAGGGGACTATGGTACCGTGTATCCGCTCCGGGAGCGGGGATCAGGAGGACGC GCCTCTGGTGGTGGAGATCGGAGATCGTGATGACCCAGAGCCCTCTCTCTTCCCGGTGACTC CTGGGGAGCCGCATCCATTTATGCGGAGCTCCAGTCACTTCTACTCCAACGGCTATAA CTACGTGGATTGGTACTCCAAAAGCCGGCCAGAGCCCGCAGCTGTGATCTACTGGGCTCG AACAGGGCCACGGGAGTGCCTGACCGGTTCCTGGGTCCGGAAGCGGGACCGACTCAAGTGC AAATCTCGAGAGTGGAGCCGAGGACGTGGGAATCTACTACTGTATGCAGGGCCGCCAGTTCC GTACTCGTTCGGACAGGGCACCAAGTGGAAATCAAG</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
139102-aa de VH	172	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGPYYYMDVWVGKGTMTVSS</u></p>
139102-aa de VL	173	<p><u>EIVMTQSPFLSLPVTGPEPASICRSSQSLLYSNGYNYVDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD^FKLQISRVEAEDVGIYYCMQGRQFPYSGQGTKEIK</u></p>
139102- aa del CAR completo	174	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGPYYYMDVWGRKGTMTVSSASGGGSGGRASGGGGSEIVMTQSPFLSLPVTGPEPASICRSSQSLLYSNGYNYVDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD^FKLQISRVEAEDVGIYYCMQGRQFPYSGQGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL^LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF^SRSADAPAYKQGQNL^YNELN^LGRREYD^VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK^HDGLYQGLSTATKDTYDALHM^QALPPR</u></p>
139102- nt del CAR completo	175	<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCGGCTCGGCCCAAGTCCAAGTCCAGAGCCGGTGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGAGCGAGCGTGAAGTGTCCCTGCAAGGCTTCCGGGTACACCTTCTCCAAGTACGGCATCACTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGACAGGGCTGGAATGGATGGGGTGGATTTCCGCGTACAACGGCAATACGAACACGCTCAGAAGTCCAGGGTAGAGTGACCATGACTAGGAACACCTCCATTTCCACCGCTACATGGAAGTGTCTCCCTCCGCGAGCGAGGACACCGCCGTGACTATTGCGCCCGGGGACCATACTACTACTACATGGATGCTGGGGAAAGGGACTATGGTCAACCGTGTATCCGCTCGGGAGCGGGGATCAGGAGGACGGCCCTCTGGTGGTGGGAGGATCGGAGATCGTGATGACCCAGAGCCCTCTCTCCTTGCCCGTACTCCGGGAGCCCGCATCCATTTTCAAGCCGAGCTCCAGTCACTTCTACTCCAACGGCTATAACACGTTGGATTGGTACCTCCAAAAGCCGGGCCAGAGCCCGAGCTGTGATCTACTGGGCTCGAACAGGGCCAGCGAGTGCCGTGACCGGTTCTCCGGTCCGGGAGCGGGACCGACTTCAAGCTGCAAACTCGAGAGTGGAGCCGAGGACGTGGGAATCTACTACTGATGCAAGGCCCGCAGTTCCGTACTCGTTCGGACAGGGCACCAAGTGGAAATCAAGACCACTACCCAGCAGCCAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCCTGTCCCTGCGTCCGGAGGATGTAGACCCGCGAGTGGTGGGCGGTGCATACCCGGGCTTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTG</p>
		<p>GCTGGTACTTGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGGGTCCGGAAGAAGTGTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCATGAGGCCGTGTCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCTTACAAGCAGGGGAGAACAGCTTACAACGAACTCAATCTGTGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAACCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAACCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAAGGCCCTGCGCCCTCG</p>
139104		
139104-aa del dominio scFv	176	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNRSNTLYLQMNLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQTTVTVSSASGGGSGGRASG GGGSEIVLTQSPATLSVSPGESATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRASGIPDRFSG SGGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYGSLLTFGGGTKVEIK</p>
<p>139104-nt del dominio scFv</p>	<p>177</p>	<p>GAAGTGCAATTGCTCGAACTGGAGGAGGTCTGGTGCAACCTGGAGGATCACTTCGCCTGTCCCT GCGCCGTGTCGGGCTTTGCCCTGTCCAACCATGGAATGAGCTGGGTCCGCCGCGCCGGGGAA GGGCCTCGAATGGGTGTCCGGCATGCTCTACTCCGGCTCCACCTACTACGCCGCGTCCGTGAAG GGCCGGTTCACGATTTACGGGACAACCTCGCGGAACACCCCTGTACCTCCAATGAATTCCTTC GGCCGGAGGATACTGCCATCTACTACTGCTCCGCCACCGTGGCGAATCCGACGCTCTGGGGCCA GGAACACCCGTGACCGTGTCCAGCGCGTCCGGGGGAGGAGGAAGCGGGGTAGAGCATCGGGT GGAGCGGATCAGAGATCGTGTCTGACCCAGTCCCCGCCACCTTGAGCGTGTACCAGGAGAGT CCGCCACCCGTGTCATGCCGCGCCAGCCAGTCCGTGTCTCCAACCTGGCTTGGTACCAGCAGAA GCGGGGCGAGGCCCTAGACTCCTGATCTATGGGGCGTCCGCCGGCATCTGGAATTCCTCGAT AGGTTACGCGGATCGGGCTCGGGCACTGACTTCACTCTGACCATCTCCTCGTGCAGCCGAGG ACGTGGCTGTGTACTACTGTACGAGTACGGAAGTCCCTGACTTTCGGTGGCGGGACCAAAGT CGAGATTAAG</p>
<p>139104-aa de VH</p>	<p>178</p>	<p>EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNRSNTLYLQMNLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQTTVTVSS</p>
<p>139104-aa de VL</p>	<p>179</p>	<p>EIVLTQSPATLSVSPGESATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRASGIPDRFSG SGGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYGSLLTFGGGTKVEIK</p>
<p>139104- aa del CAR completo</p>	<p>180</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGK LEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMNLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQ GTTVTVSSASGGGSGGRASGGGSEIVLTQSPATLSVSPGESATLSCRASQSVSSNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRASGIPDRFSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYGSLLTFGGGTKV EIKTTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQBEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK QQQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSIEIMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
<p>139104- nt del CAR completo</p>	<p>181</p>	

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTGCAATTGCTCGAAACTGGAGGAGGTCTGGTGCAACCTGGAGGATCACTTCGCCTGTCTG CGCCGTGTCGGGCTTTGCCCTGTCCAACCATGGAATGAGCTGGGTCCGCCGCGCGCCGGGAAG GGCTCGAATGGGTGTCGGCATCGTCTACTCCGGCTCCACCTACTACGCCGCGTCCGTGAAGG GCCGGTTCACGATTTACCGGGACAACCTCGCGGAACACCCTGTACCTCCAAATGAATTCCTTTCG GCCGGAGGATACTGCCATCTACTACTGCTCCGCCACGGTGGCGAATCCGACGTCTGGGCCAG GGAACCACCGTGACCGTGTCCAGCGCTCCGGGGAGGAGGAAGCGGGGTAGAGCATCGGGTG GAGGCGGATCAGAGATCGTGTGACCCAGTCCCGGCCACCTTGAGCGTGTACCAGGAGAGTC CGCCACCCTGTCTATGCCCGCCAGCCAGTCCGTGTCTCCAACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAG CCGGGGCAGGCCCTAGACTCCTGATCTATGGGGCGTCGACCCGGGCATCTGGAATTCGCCGATA GGTTCAGCGGATCGGGTCCGGCAGTACTTACTCTGACCATCTCCTCGCTGCAAGCCGAGGA CGTGGCTGTGTACTACTGTGACGAGTACGGAAGCTCCCTGACTTTCGGTGGCGGGACCAAAGTC GAGATTAAGACCACTACCCAGCACCAGGCCACCCACCCCGCTCCTACCATCGCCTCCCAGC CTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGTGGTGGGGCGTGCATACCCGGGGTCT TGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGTCTGTGTCTT TCACTCGTATCACTCTTACTGTAAGCGCGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAAC CCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCAGAGAGG GGAGGAAGGCGGCTGCGAATGCGCGTGAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAG CAGGGGAGAACCGACTTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGG ACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGG CCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAGGG GAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGCGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACA CCTATGACGCTTTCATATGACGGCCCTGCCGCTCGG</p>
139106		
139106-aa del dominio scFv	182	<p>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNRSNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWQGTTVTVSASGGGGSGGRASG GGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSKLAWYQKPKQAPRLLMYGASIRATGIPD RFSGSGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCQQYGSSSWTFGQGTKVEIK</p>
139106-nt del dominio scFv	183	<p>GAAGTGCAATTGGTGGAACTGGAGGAGACTTGTGCAACCTGGAGGATCATTGAGACTGAGCT GCGCAGTGTCCGGATTCCGCCCTGAGCAACCATGGAATGTCTGGGTGAGAAGGGCCCTGGAAA AGGCCTCGAATGGGTGTCAGGATCGTGTACTCCGGTTCCACTTACTACGCCGCTCCGTGAAG GGGCGCTTCACTATCTACGGGATAACTCCCGCAATACCTGTACTTCCAAATGAACAGCCTGC GGCCGGAGGATACCGCATCTACTACTGTTCCGCCACGGTGGAGAGTCTGACGCTCGGGCCA GGAACTACCGTGACCGTGTCTCCCGCTCCGGCGGTGGAGGGAGCGGGCCCGCCAGCGGC GGCGGAGGCTCCGAGATCGTGTATGACCCAGAGCCCGCTACTCTGTGGTGTGCGCCGAGAAA GGGCGACCCCTGTCTGCGGGCGTCCGAGTCCGTGAGCAGCAAGCTGGCTTGGTACCAGCAGAA GCCGGGCCAGGACACGCTGCTTATGTACGGTGCCTCCATTCGGGCCACCGGAATCCCGGAC CGGTTCTCGGGTCCGGTCCGGTACCGAGTTCACACTGACCATTTCTCGCTCGAGCCCGAGG ACTTTGCCGCTATTACTGCCAGCAGTACGGCTCCTCCTCATGGAGCTTCGGCCAGGGACCAA GGTCAAAATCAAG</p>
139106-aa de VH	184	<p>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNRSNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWQGTTVTVSS</p>
139106-aa de VL	185	<p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSKLAWYQKPKQAPRLLMYGASIRATGIPDRFSG SGSGTEFTLTISLLEPEDFAVYYCQQYGSSSWTFGQGTKVEIK</p>
139106- aa del CAR completo	186	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>MALPVTALLLPALLLHAARPEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWRRAPGK GLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGO GTTVTVSASGGGSGGRASGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSKLAWYQQK PGQAPRLLMYGASIRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCQYGSSSWTFGQGT VEIKTTTPAPRPPTAPPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEBEGGCELRVKFSRADAPAY KQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR</p>
<p>139106- nt del CAR completo</p>	<p>187</p>	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTGCAATTGGTGGAAACTGGAGGAGGACTGTGCAACCTGGAGGATCATTGAGACTGAGCTG CGCAGTGTGGGATTCGCCCTGAGCAACCATGGAAATGCTCTGGGTGAGAAAGGGCCCTGGAAAA GGCCTCGAATGGGTGTGAGGGATCGTGTACTCCGGTTCCTACTACGCCGCTCCGTGAAGG GGCGCTTACTACTCAGGGATAACTCCCGCAATACCTGTACCTCCAATGAACAGCTGGC GCCGGAGGATACCGCCATCTACTACTGTTCGCCCCACGGTGGAGAGTCTGACGCTGGGGCCAG GAACTACCGTGACCGTGTCTCCCGGTCCGGCGGTGGAGGGAGCGCGGCCCGCCACGGCGG GCCGAGGCTCCGAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCTACTCTGTCTGGTGTGCGCCGGAGAAAG GGCGACCTGTCTGCCGGGCGTCGAGTCCGTGAGCAGCAAGCTGGCTGGTACCAGCAGAAG CCGGCCAGGCACCACGCTGCTTATGTACGGTGCCTCCATTCCGGCCACCGAATCCCGGACC GGTCTCGGGGTGCGGGTCCGGTACCAGGTCACACTGACCATTTCTCTGCTCGAGCCGAGGA CTTGGCCGTCTATTACTGCCAGCAGTACGGCTCCTCCTCATGGACGTTCCGGCCAGGGGACCAAG GTCGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCCGAGGCCACCCACCCGCTCCTACCATCGCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGG TCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGCGGGTCTGTG CTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGC AACCTTTCATGAGGCCGTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCAGA GGAGGGAAGGCGGCTGCCAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTAC AAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTCG TGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAATGGGGCGGAAGCCCGCAGAAAGAAATCCCAAGA GGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAA GGGGAACGAGAGAGGCAAGGCCACGACGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGG ACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCGCCCTCGG</p>
<p>139107</p>		
<p>139107-aa del dominio scFv</p>	<p>188</p>	<p>EVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGOGTTVTVSASGGGSGGRASG GGSEIVLTPSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSTNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP DRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPPWTFGQGTKVEIK</p>
<p>139107-nt del dominio scFv</p>	<p>189</p>	<p>GAAGTGCAATTGGTGGAGACTGGAGGAGGAGTGGTGAACCTGGAGGAAGCCTGAGACTGTGCAT GCGCGGTGTCGGGCTTCGCCCTCTCCAACCACGGAATGCTCTGGGTCCGCCGGGCCCCGGGAA AGGACTTGAATGGGTGTCCGGCATCGTGTACTCGGGTTCACCTACTACGCCGCTCAGTGAAG GGCCGGTTACTATTAGCCCGGACAACCTCCAGAAACACACTGTACCTCCAATGAACCTCGCTGC GGCCGGAAGATACCGCTATCTACTACTGTCCGCCATGGGGGAGAGTCCGACGCTCGGGGACA GGGCACCACTGTCACTGTGTCCAGCGCTTCCGGCGGTGGTGGAAAGCGGGGACGGGCCCTCAGGA GGCGGTGGCAGCGAGATTGTGTGACCCAGTCCCCGGGACCCCTGAGCCTGTCCCCGGGAGAAA</p>
		<p>GGGCCACCCCTCTCCTGTGCGGGCATCCCACTCCGTTGGGGTCTACTAACCTTGCATGGTACCAGCA GAAGCCCGGCCAGGCCCTCGCCTGTGATCTACGACGCTCCAATAGAGCCACCGGCATCCCG GATCGCTTACGCGGAGGCGGATCGGGCACCAGCTTACCCCTACCATTTCAAGGCTGGAACCGG AGGACTTCGCCGTGACTACTGCCAGCAGTATGGTTCGTCCCCACCCCTGGACGTTCCGGCCAGG GACTAAGGTCGAGATCAAG</p>

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
139107-aa de VH	190	<p>EVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK <u>GRFTISRDN</u>SRNTLYLQMN<u>SLRP</u>EDTAIYYCSA<u>HGGESD</u>VWGQGTTVTVSS</p>
139107-aa de VL	191	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSTNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA<u>TGIPDR</u>FS GGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC<u>QQYGS</u>SPPTFGQGT<u>KVEIK</u></p>
139107- aa del CAR completo	192	<p>MALPVTALLPLALLHAARPEVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGK GLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDN<u>SRNTLYLQMN</u>SLRPEDTAIYYCSA<u>HGGESD</u>VWGQ GTTVTVSSASGGGSGGRASGGGSEIIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSTNLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRA<u>TGIPDR</u>FSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC<u>QQYGS</u>SPPTFGQGT TKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEEDGCSCRFPBEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGGQNLYNELNLRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR</p>
139107- nt del CAR completo	193	<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTGCAATTGGTGGAGACTGGAGGAGGAGTGGTGCAACCTGGAGGAAGCCTGAGACTGTCATG CGCGGTGTCGGGCTTCGCCCTCCCAACCAACCGAATGTCCTGGGTCCGCCGGGCCCTGGGAAA GGACTTGAATGGGTGTCGGCATCGTGTACTCGGGTTCACCTACTACCGCGCCTCAGTGAAGG GCCGGTTTACTATTAGCCGCGACAACCTCCAGAAAACACTGTACCTCAAATGAACCTCGCTGCG GCCGGAAGATACCGCTATCTACTACTGCTCCGCCCATGGGGGAGAGTCGGACGCTGGGGACAG GGCACCCTGTCACTGTGTCCAGCGCTTCCGGCGGTGGTGGAAAGCGGGGACGGGCCCTCAGGAG GCGGTGGCAGCGAGATTGTGCTGACCCAGTCCCGGGACCTGAGCCTGTCCTCCGGGAGAAAAG GGCCACCCTCTCCTGTCGGGCATCCAGTCCCGTGGGGTCTACTAACCTTGCAATGGTACCAGCAG AAGCCCGCCAGGCCCTCGCTGCTGATCTACGACGCGTCCAATAGAGCCACCGGCATCCCGG ATCGCTTACGCGGAGGGCGGATCGGGCACCGACTTACCCTCACCATTTCAAGGCTGGAACCGGA GGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTATGGTTCGTCCCGCCCTGGACGTTCCGGCAGGGG ACTAAGTCGAGATCAAGACCACTACCCAGCAGCCAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCG CTCCAGCCTCTGTCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCGCAGCTGTTGGGGCCGTGCATAC CCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGCGGGTCT CTGCTGCTTACTCGTGTACTCTTACTGTAAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCT TTAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTT CCCAGAGGAGGAGGAAGGCCGCTGCCAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCA GCCTACAAGCAGGGCAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACG ACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGGAGCCGCGCAGAAAGAATCC CCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGT ATGAAAAGGGAAACGAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCA CCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCCG</p>
139108		
139108-aa del dominio scFv	194	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSV KGRFTISRDN<u>AKNSLYLQMN</u>SLRAEDTAVYYCARESGDGMVWGQGTTVTVSSASGGGSGGGR SGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYA<u>ASSLQ</u>SGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTLAFGGGTKVDIK</p>
139108-nt del dominio scFv	195	

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>CAAGTGCAACTCGTGGAACTCTGGTGGAGGACTCGTGAAACCTGGAGGATCATTGAGACTGTCATCGCGGCCCTCGGGATTACCGTTCTCCGATTACTACATGAGCTGGATTCCGCCAGGCTCCGGGGAAAGGGACTGGAATGGGTGTCTTACATTTCTCCATCCGGCTCCACCATCTACTACGCGGACTCCGTGAAGGGGAGATTACCATTAGCCCGGATAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTTCAGATGAACTCCC TGCGGGCTGAAGATACTGCCGTCTACTACTGCGCAAGGGAGAGCGGAGATGGGATGGACGTCTGGGACAGGGTACCCTGTGACCGTGTCTGTCGGCCTCCGGCGGAGGGGGTTCGGGTGGAAGGGCCAGCGCGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCTCATCGCTGTCCGCTCCGTTGGGACCCGCTCACCATCACATGCCGGGCTCACAGTCGATCTCCTCCTACCTCAATTGGTATCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCTAAGCTTCTGATCTACGCAGCGTCTCCTCCGTCAATCCGGGGTCCATCTCGGTTCTCCGGCTCGGGCAGCGGTACCGACTTCACTCTGACCATCTCGAGCTCGAGCCGAGCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGTCAGCAAAGCTACACCTCGCGTTTGGCCAGGGCACCAAGTGGACATCAAG</p>
139108-aa de VH	196	<p><u>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS</u><u>SDYYMSWIRQAPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSV</u> <u>KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESGDGMVWGQTTTVVSS</u></p>
139108-aa de VL	197	<p><u>DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG</u> <u>SGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQSYTLAFGQGTKVDIK</u></p>
139108- aa del CAR completo	198	<p>MALPVTALLLP LALLLHARPQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYYMSWIRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESGDGMVW GQTTTVTVSSASGGGGSGRASGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQSYTLAFGQGTK VDIKTTTPAPRPPTPAFTIASQPLSLRPEACRPAAGVAHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQQQNQLYNELNLRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
139108- nt del CAR completo	199	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCC AAGTGCAACTCGTGGAACTCTGGTGGAGGACTCGTGAAACCTGGAGGATCATTGAGACTGTCATG CGCGGCCCTCGGGATTACCGTTCTCCGATTACTACATGAGCTGGATTCCGCCAGGCTCCGGGGAAAG GGACTGGAATGGGTGTCTTACATTTCTCCATCCGGCTCCACCATCTACTACGCGGACTCCGTGA AGGGGAGATTACCATTAGCCCGGATAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTTCAGATGAACTCCCT GCGGGCTGAAGATACTGCCGTCTACTACTGCGCAAGGGAGAGCGGAGATGGGATGGACGTCTGG GGACAGGGTACCCTGTGACCGTGTCTGTCGGCCTCCGGCGGAGGGGGTTCGGGTGGAAGGGCCA GCGCGCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCTCATCGCTGTCCGCTCCGTTGGG CGACCCGCTCACCATCACATGCCGGGCTCACAGTCGATCTCCTCCTACCTCAATTGGTATCAG CAGAAGCCCGAAAGGCCCTAAGCTTCTGATCTACGCAGCGTCTCCTCCGTCAATCCGGGGTCC CATCTCGGTTCTCCGGCTCGGGCAGCGGTACCGACTTCACTCTGACCATCTCGAGCCTGCAGCC GGAGGACTTCGCCACTTACTACTGTCAGCAAAGCTACACCTCGCGTTTGGCCAGGGCACCAA GTGGACATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCTACCATCGCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGG CTTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGCGGGTCTCTGCTG AACCCTTCATGAGGCCGTGTCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCACAGA GGAGGAGGAAGCGGGCTGCGAAGTTCAGCCGTCAGCGCAGATGCTCCAGCCTCA AAGCAGGGGCAGAACCGCTTACAACGAACCTCAATCTTGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGC TGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAATGGGGCGGAAGCCGCGCAGAAAAGAAATCCCAAGA GGCCTGTACAACGAGTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAA GGGGAACGCAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCAACAAAG ACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCGGCTCGG</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
139109		
139109-aa del dominio scFv	200	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNsrntlylqMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQTTVTVSSASGGGGSGGRASG GGGSDIQLTQSPSSLSASVGRVTTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKEIK</p>
139109-nt del dominio scFv	201	<p>GAAGTGCAATTGGTGAATCAGGGGGAGGACTTGTGCAGCCTGGAGGATCGCTGAGACTGTCAT GTGCCGTGTCCGGCTTTGCCCTGTCCAACCACGGGATGTCTGGGTCCGCCGCGCCCTGGAAA GGGCCTCGAATGGGTGTCCGGTATTGTGTACAGCGGTAGCACCTACTATGCCGCATCCGTGAAG GGGAGATTACCATCAGCCGGGACAACCTCCAGGAACACTCTGTACCTCCAATGAATTCGCTGA GGCCAGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTCCGCGCATGGCGGAGAGTCCGACGCTCTGGGGACA GGGGACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCGTCCGGCGGAGGGCGGAGCGGGGTCCGGCATCAGGG GCGGGCGGATCGGACATCCAGCTCACCCAGTCCCGGAGCTCGCTGTCCGCTCCGTGGGAGATC GGGTCACCATCACGTGCCGCGCCAGCCAGTCGATTTCTCTCTACCTGAACGGTACCAACAGAA GCCCGGAAAAGCCCCAAGCTTCTCATCTACGCGCCTCGAGCTGCAGTCAGGAGTGCCTCA CGGTTCTCCGGCTCCGGTCCGGTACTGATTTACCCTGACCATTCTCCCTGCAACCGGAGG ACTTCGCTACTTACTACTGCCAGCAGTCGTACTCCACCCCTACACTTTCGGACAAGGCACCAA GGTGAAATCAAG</p>
139109-aa de VH	202	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNsrntlylqMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQTTVTVSS</p>
139109-aa de VL	203	<p>DIQLTQSPSSLSASVGRVTTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKEIK</p>
139109- aa del CAR completo	204	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGK GLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNsrntlylqMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWQ GTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGRVTTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGT VEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR</p>
139109- nt del CAR completo	205	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCG AAGTGCAATTGGTGAATCAGGGGGAGGACTTGTGCAGCCTGGAGGATCGCTGAGACTGTATG TGCCGTGTCCGGCTTTGCCCTGTCCAACCACGGGATGTCTGGGTCCGCCGCGCCCTGGAAAG</p>

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>GGCTCGAATGGGTGTCGGGTATTGTGTACAGCGGTAGCACCTACTATGCCGCATCCGTGAAGG GGAGATTACCAATCAGCCGGGACAAC TCCAGGAACACTCTGTACCTCCAATGAATTCGCTGAG GCCAGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTCCGCGCATGGCGGAGAGTCCGACGCTGGGGACAG GGGACCACCGTGACCGTGTCTAGCGGTCCGGCGGAGGCGGCGAGCGGGGTCCGGCATCAGGGG GGGGCGGATCGGACATCCAGCTCACCAGTCCCCGAGCTCGCTGTCCGCCTCCGTGGGAGATCG GGTCACCATCAGTGCCGCGCCAGCCAGTCGATTTCTCTTACCTGAAC TGGTACCAACAGAAG CCCGAAAAGCCCCGAAGCTTCTCATCTACGCGCCTCGAGCCTCGAGTCAGGAGTGCCTCAC GGTCTCCGGTCCGGTCCGGTACTGATTTACCCCTGACCATTTCTCCTGCAACCCGGAGGA CTTCGCTACTTACTACTGCCAGCAGTCGTA TCCACCCCTACACTTTCCGGACAAGGCACCAAG GTGAAAATCAAGACACTCACCAGCAGCCAGGCGCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGG TCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTGCGGGGTCTCTGTG CTTTCAC TCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGC AACCTTTCATGAGGCTGTG CAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTCCCAAG GGAGGAGGAAGGCGGCTGCCA ACTGCGCGTAAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTAC AAGCAGGGGCGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGC TGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAA TGGGCGGGAAGCCCGCGCAGAAAAGATCCCAAGA GGCCTGTACAACGAGCTC CAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAA GGGAACCGCAGAAAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCACCAAG ACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
139110		
139110-aa del dominio scFv	206	<p><u>QVQLVQSGGGLVQPKGSLRRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGNTIYYADSV</u> <u>KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTMVREDYWGQTLVTVSSASGGGSGGRA</u> <u>SGGGSDIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSESLVHNSGKTYLNWFHQRPGQSPRRLIYEVSN</u> <u>RDSGVPDRFTGSGSDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQGTHWPGTFGQGTKLEIK</u></p>
139110-nt del dominio scFv	207	<p>CAAGTGCAACTGGTGCAAAGCGGAGGAGGATTGGTCAAACCCGGAGGAAGCCTGAGACTGTTCAT GCGCGGCTCTGGATTACCTTCTCCGATTACTACATGTCATGGATCAGACAGGCCCGGGGAA GGGCTCGAATGGGTGTCCTACATCTCGTCTCCGGGAACACCATCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCGCTTTACATTTCCCGCGACAACGCAAAGAACTCGCTGTACCTCAGATGAATCCC TGCGGGCTGAAGATACCGCGGTGTACTATTGCGCCCGGTCCACTATGGTCCGGGAGGACTACTG GGGACAGGGCACACTCGTGACCGGTGCCAGCGCGAGCGGGGTGGAGGCAGCGGTGGACGCGCC TCCGGCGGCGGGTTCAGACATCGTGCTGACTCAGTCCGCCCTGTGCGTCCGGTCCACCTGG GCCAACC GGCTCAATTAGCTGCAAGTCTCCGAGAGCCTGGTGCACAACTCAGGAAAGACTTA CCTGAACTGGTTCATCAGCGGCTGGACAGTCCCACGGAGGCTCATCTATGAAGTGTCCAAC AGGATTCGGGGGTGCCGACCGCTTCACTGGCTCCGGTCCGGCACCGACTTACCTTGAAAA TCTCCAGAGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGGGTACCCACTGGCCTGG AACCTTTGGACAAGGAACTAAGCTCGAGATTAAG</p>
139110-aa de VH	208	<p><u>QVQLVQSGGGLVQPKGSLRRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGNTIYYADSV</u> <u>KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTMVREDYWGQTLVTVSS</u></p>
139110-aa de VL	209	<p><u>DIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSESLVHNSGKTYLNWFHQRPGQSPRRLIYEVSNRDSGVP</u> <u>DRFTGSGSDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQGTHWPGTFGQGTKLEIK</u></p>
139110- aa del CAR completo	210	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGGGLVKGSSLRSLSCAASGF^TSDYYMSWIRQAPGK GLEWVSYI^SSSSGNTIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSLRABDTAVYYCARSTMVREDY^W GGTFLVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIVLTQSPSLPVTLGQPASISCKSSESLVHNSGKTY LNWFHQRPQSPRRLIYEVSNRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ^GTHWPG TFQGGTKLEIKTTTPAPRPTTAPPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVTLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCCSRFP^EEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGKPRKPNQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMKGERRRGK^GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR</p>
139110- nt del CAR completo	211	<p>ATGGCCCTCCCTGTACC^GCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC AAGT^GCAACTGGT^GCAAAGCGGAGGAGGATTGGTCAAACCGGAGGAAGCCTGAGACTGTCAT^G CGCGCCCTCGGATTCACCTTCTCCGATTACTACATGTCATGGATCAGACAGGCCCGGGGAAG GGCCTCGAATGGGTGTCCTACATCTCGTCC^TCCGGGAACACCATCTACTACGCCGACAGCGTGA AGGGCCGCTTTACCATTCCCGCGACAACGCAAAGA^AACTCGCTGTACCTTCAGATGAA^TTCCT AGGGGCTGAAGATACCGCGGTACTATTGCGCCCGGTC^ACTATGGTCCGGGAGGACTACTGG GGACAGGCACACTCGTGACCGTGTCCAGCGCGAGCGGGGTGGAGGCAGCGGTGGACGCGCCT CCGGCGCGCGGTTACAGACATCGTGTCTGACTCAGTCGCCCTGTGCTGCGCGGTCACCC^TGGG CCAACCGCCTCAATTAGCTGCAAGTCTCGGAGAGCCTGGTGCACA^ACTCAGGAAAGACTTAC CTGAACGGTTCATCAGCGCCTGGACAGTCCCACGGAGGCTCATCTATGAAGTGTCCAACA GGATTCCGGGGTGC^CCGACCGCTTCACTGGCTCCGGGTC^CGGCACCGACTTCACTTGA^AAAT CTCCAGAGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTATGCAGGGTACC^ACTGGCCTGGA ACCTTTGGACAAGGA^ACTAAGCTCGAGATTAAGACCCTACCC^CAGCACCGGACCCACCC CGGCTCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGG</p>
		<p>TGGGCGGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCT GGTACTTGGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGA AGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCA^TGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTCA^TGCCGGTTC^CCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGA^ACTGCGGTGA^AATTCAGCCG AGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAA^CAGCTCTACAACGA^ACTCAATCTGGT GGAGAGAGGAGTACGACGTGTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCA^AAATGGGCGGAAGCC GCCGAGAAAGAA^TCCCCAAGGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGA^TAAGATGGGCAAGCC TATAGCAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGG GACTCAGCACCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCTGCGCCTCGG</p>
139112		
139112-aa del dominio scFv	212	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS^NHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDN^SRNTLYLQMNLSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQTTVTVSASGGGGSGGRASG GGGSDIRLTQSPSLASVGRVTTITCQ^ASE^DIN^KFLN^WYHQTPGKAPKLLIYDASTLQ^TGVPS RFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDIGTY^CQ^YESLPLTFGGGK^VEIK</p>
139112-nt del dominio scFv	213	<p>CAAGTGA^ACTCGTGGAACTGGTGGAGGACTCGTGCAACCCGGTGGAA^GCCTTAGGCTGTCTG GCGCCGTCAGCGGGTTTGTCTGAGCAACCATGGAATGTCCTGGGTCCGCCGGGCACCCGGAAA AGGGCTGGAATGGGTGTC^CCGCATCGTGTACAGCGGGTCAACCTATTACCCCGGTCCTGGA GGCAGATTCATCTCAAGAGACAACAGCCGGAACACCTGTACTTGCA^AATGAATTCCTGC GCCCGAGGACACCGCATCTACTACTGCTCCGCCACGAGGAGAGT^CGGACGTGTGGGGCCA GGAAACGACTGTGACTGTGTCCAGCGCATCAGGAGGGGTGGTTCGGGGCGCCGGGCTCGGGG GGAGGAGGTTCCGACATTCGGCTGACCCAGTCCCGTCCCACTGTCCGCTCCGTCCGGCAGC GCGTGACCATCACTTGTGAGGCTCCGAGGACATTAACAAGTTCCTGAACTGGTACCACAGAC CCCTGGAAGGCC^CCAAGCTGCTGATCTACGATGCTCGACCTTCA^AACTGGAGTGCTAGC CGGTTCTCCGGTCCGGCTCCGGCACTGATTTCACTCTGACCATCA^ACTCATTGCAGCCGGAAG ATATCGGACCTACTATTGCCAGCAGTACGAA^TCCCTCCCGCTC^ATTCGGCGGGGAACCAA GGTCGAGATTAAG</p>

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
139112-aa de VH	214	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK <u>GRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT</u>TVTVSS</p>
139112-aa de VL	215	<p>DIRLTQSPSPLSASVGRVTTTCQASEDINKFLNWHQTPGKAPKLLIYDASTLQTVPSRFSG SGSGTDFLTINSLQPEDIGTYQCQY<u>ESLPLTF</u>GGGKVEIK</p>
139112- aa del CAR completo	216	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGK GLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQ GTTVTVSSASGGGSGGRASGGGSDIRLTQSPSPLSASVGRVTTTCQASEDINKFLNWHQTPGKAPKLLIYDASTLQTVPSRFSGSGSGTDFLTINSLQPEDIGTYQCQY<u>ESLPLTF</u>GGGK VEIKTTTPAPRPPTAPPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR</p>
139112- nt del CAR completo	217	<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCC AAGTGCAACTCGTGAATCTGGTGGAGGACTCGTGCAACCCGGTGGAAAGCCTTAGGCTGTGCTG CGCCGTGAGCGGGTTTGTCTGAGCAACCATGGAATGTCTGGGTCCGCCGGCACCGGGAAAA GGGCTGGAATGGGTGTCGGCATCGTGTACAGCGGTCAACCTATTACGCCGCGTCCGTGAAGG GCAGATTCATACTCAAGAGACAACAGCCGGAACACCCTGTACTTGCAAAATGAATCCCTGCG CCCCGAGGACACCGCCATCTACTACTGCTCCGCCACGGAGGAGAGTCGGACGTGTGGGCCAG GGAACGACTGTGACTGTGTCCAGCGCATCAGGAGGGGGTGGTTCGGGCGCCGGGCTCGGGGG GAGGAGGTCCGACATTCGGCTGACCCAGTCCCGTCCCACTGTGCGCCTCCGTCCGGCGACCG CGTGACCATCACTTGTGAGCGTCCGAGGACATTAACAAGTTCCTGAAGTGGTACCACAGACC CCTGGAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGATGCCTCGACCCCTCAAACCTGGAGTGCCTAGCC GGTCTCCGGTCCGGTCCGGCTGATTTCACTCTGACCATCAACTCATTGCAGCCGGAAGA TATCGGGACCTACTATTGCCAGCAGTACGAATCCCTCCCGCTCACATTCGGCGGGGGAACCAAG GTCGAGATTAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGG TCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGTACTTGCGGGGTCTGCTG CTTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGTCCGGAAGAAGCTGTGTACATCTTTAAGC AACCTTTCATGAGGCTGTGCAAGTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCGGGTTCCAGA GGAGGGAAGGCGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTAC AAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTGGTTCGAGAGAGGAGTACGACGTGC TGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCCAAGA GGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAA GGGGAACGAGAGGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCACCAAG ACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCGCCCTCGG</p>
139113		
139113-aa del dominio scFv	218	<p>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK <u>GRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT</u>TVTVSSASGGGSGGRASG GGGSETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSNLAWYQKPKQGGPRLLIY<u>GASTRAT</u>GIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFAVYYCQYNDWLPVTFGGGKVEIK</p>
139113-nt del dominio scFv	219	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>GAAGTGCAATTGGTGGAACTGGAGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGATCATTGCGGCTCTCAT GCGCTGTCTCCGGCTTCGCCCTGTCAAATCACGGGATGTCGTGGGTGACAGCGGCCCGGGAAA GGTCTGGAATGGGTGTGGGGATTGTGTACAGCGGCTCCACCTACTACGCCGCTTCGGTCAAG GGCCGCTTCACTATTTACGGGACAACAGCCGCAACACCTCTATCTGCAATGAACTCTCTCC GCCCCGAGGATACCGCCATCTACTACTGCTCCGCACACGGCGGCAATCCGACGTGTGGGGACA GGGAACCACTGTACCGTGTCTGTCGCCATCCGGTGGCGGAGGATCGGGTGGCCGGGCTCCGGG GGCGGCGCAGCGAGACTACCCTGACCCAGTCCCTGCCACTCTGTCCGTGAGCCCGGAGAGA GAGCCACCTTAGCTGCCGGCCAGCCAGAGCGTGGGCTCCAACCTGGCTGGTACCAGCAGAA GCCAGGACAGGGTCCCAGGCTGCTGATCTACGGAGCCTCCACTCGCGCAGCCGGCATCCCCGG AGGTTCTCCGGTCCGGTCCGGGACCGAGTTCACCTGACCATCTCTCCCTCAACCGGAGG ACTTCGGGTGTACTACTGTGTCAGCAGTACAACGATTGGCTGCCCGTGACATTTGGACAGGGGAC GAAGGTGGAATCAA</p>
139113-aa de VH	220	<p><u>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK</u> <u>GRFTISRDNRSNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTITVTVSS</u></p>
139113-aa de VL	221	<p><u>ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSNLAWYQQKPGQPRLLIYGASTRATGIPARFSG</u> <u>SGSGTEFTLTISLQPEDFAVYYCQQYNDWLPVTFGQGTKVEIK</u></p>
139113- aa del CAR completo	222	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGK GLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQ GTTVTVSSASGGGSGGRASGGGSETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGSNLAWYQQK PGQPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGTEFTLTISLQPEDFAVYYCQQYNDWLPVTFGQGT KVEIKTTPAPRPTTPAPTIASQPLSLRPEACRPAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGLV LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YKQGNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKHDGLYQLSTATKDYDALHMQALPPR</p>
139113- nt del CAR completo	223	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTGCAATTGGTGGAACTGGAGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGATCATTGCGGCTCTCATG CGCTGTCTCCGGCTTCGCCCTGTCAAATCACGGGATGTCGTGGGTGACAGCGGCCCGGGAAA GGTCTGGAATGGGTGTGGGGATTGTGTACAGCGGCTCCACCTACTACGCCGCTTCGGTCAAGG CCCGTTCCTACTATTTACGGGACAACAGCCGCAACACCTCTATCTGCAATGAACTCTCTCCG CCCCGAGGATACCGCCATCTACTACTGCTCCGCACACGGCGGCAATCCGACGTGTGGGGACAG GGAACCACTGTACCGTGTCTGTCGCCATCCGGTGGCGGAGGATCGGGTGGCCGGGCTCCGGGG GCGGCGCAGCGAGACTACCCTGACCCAGTCCCTGCCACTCTGTCCGTGAGCCCGGAGAGAG AGCCACCTTAGCTGCCGGCCAGCCAGAGCGTGGGCTCCAACCTGGCTGGTACCAGCAGAAG CCAGGACAGGGTCCCAGGCTGCTGATCTACGGAGCCTCCACTCGCGCAGCCGGCATCCCCGGA GGTCTCCGGTCCGGTTCGGGACCGAGTTCACCTGACCATCTCTCCCTCCAACCGGAGGA CTTCGCGGTGTACTACTGTGTCAGCAGTACAACGATTGGCTGCCCGTGACATTTGGACAGGGGACG AAGGTGGAATCAAACCACTACCCAGCACCAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCT CCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGATGTAGACCCGAGCTGGTGGGCGGTGCATACCCG GGTCTTGACTTCGCCATGATCTACATTTGGCCCTCTGGTGGTACTTGGGGGTCTCTG CTGCTTTCCTGCTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTA AGCAACCTTTCATGAGCCTGTGACAGACTACTCAAGAGGAGGACCGGCTGTCATGCCGCTTCCC AGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAATGCGCGTGAATTCAGCCGAGCCAGATGCTCCAGCC TACAAGCAGGGGAGAGACAGCTTACAACGAATCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACG TGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGACCCAGAAATGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCCA AGAGGGCTGTACAACGACTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAGCCCTAAGCAGATTTGGTATG AAAGGGAAACGAGAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCA AGGACACCTATGACGCTCTTACATGACAGGCTTCCGCTCCG</p>

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
139114		
139114-aa del dominio scFv	224	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNRSNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQTTVTVSSASGGGSGGRASG GGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSIGSSSLAWYQQKPGQAPRLLMYGASSRASGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSPFFTFGQGTKVEIK</p>
139114-nt del dominio scFv	225	<p>GAAGTGC AATTGGTGG AATCTGGTGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGATCACTGAGACTGTTCAT GCGCGGTGTCGGGTTTTGCCCTGAGCAATCATGGGATGTCGTGGTCCGGCGGCCCGGAAAG GGGTCTGGAATGGGTGTCGGGTATCGTCTACTCCGGGAGCACTTACTACGCCGCGAGCGTGAAG GGCCGCTTACCATTCCCGCGATAACTCCCGCAACACCCCTGTACTTGCAAAATGAACTCGCTCC GGCTGAGGACTGCCATCTACTACTGCTCCGCACACGGAGGAGAATCCGACGTGTGGGGCCA GGGAACTACCGTGACCGTCAGCAGCGCCTCCGGCGGGGGGGCTCAGCGGACGGGCTAGCGGC GCGGTTGGCTCCGAGATCGTGTGACCCAGTCGCTGGCACTCTCTCGCTGAGCCCGGGGAAAG</p>
		<p>GGGCAACCCGTGCTGTCGGGCGCAGCCAGTCCATTGGATCATCCTCCCTCGCCTGGTATCAGCA GAAACCGGGACAGGCTCCGCGGCTGCTTATGTATGGGGCCAGCTCAAGAGCCTCCGGCATTCCC GACCGGTTCTCCGGGTCCGGTCCCGGCACCGATTTACCCCTGACTATCTCGAGGCTGGAGCCAG AGGACTTCGCCGTGACTACTGCCAGCAGTACGCGGGTCCCCGCCGTTACGTTCCGACAGGG ACCAAGGTCGAGATCAAG</p>
139114-aa de VH	226	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVK GRFTISRDNRSNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQTTVTVSS</p>
139114-aa de VL	227	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSIGSSSLAWYQQKPGQAPRLLMYGASSRASGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSPFFTFGQGTKVEIK</p>
139114- aa del CAR completo	228	<p>MALPVTALLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGK GLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNRSNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQ GTTVTVSSASGGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSIGSSSLAWYQQ KPGQAPRLLMYGASSRASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSPFFTFGQG TKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGDCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR</p>
139114- nt del CAR completo	229	

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCG AAGTGCAATTGGTGAATCTGGTGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGATCACTGAGACTGTATG CGCGGTGTCCGGTTTTGCCCTGAGCAATCATGGGATGTCTGGGTCCGGCGCGCCCCGGAAAAG GGCTGGAATGGGTGTCCGGTATCGTCTACTCCGGGAGCACTTACTACGCCGCGAGCGTGAAGG GCCGCTTCACCAATTTCCCGCGATAACTCCCGCAACACCCTGTACTTGCAAATGAACTCGCTCCG GCCTGAGGACACTGCCATCTACTACTGCTCCGCACACGGAGGAGAAATCCGACGTGTGGGGCCAG GGAACTACCGTGACCGTCAGCAGCGCTCCGGCGCGGGGCTCAGGCGGACGGGCTAGCGGGG GCGGTGGCTCCGAGATCGTGTGACCCAGTCCGCTGGCACTCTCTCGCTGAGCCCCGGGAAAAG GGCAACCCTGTCTGTCCGGCCAGCCAGTCCATTGGATCATCTCCCTCCGCTGGTATCAGCAG AAACCGGGACAGGCTCCGCGGCTGCTTATGTATGGGGCCAGCTCAAGAGCTCCGGCATCCCG ACCGGTTCTCCGGTCCGGTCCGGCACCGATTTACCCTGACTATCTCGAGGCTGGAGCCAGA GGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACGCGGGGTCCCGCCGTTACGTTCCGGACAGGGA ACCAAGTCCGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCG CCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCAATGAGACCGCTCAGGCGGCTCCGATCCGATA CCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTCCGGGGT CTGCTGCTTACTCGTGTACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCT TTAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTT CCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCCAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCA GCCTACAAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACG ACGTGTGGACAAGCGGAGAGGACGGACCCAGAAATGGCGGGGAGCCGCGCAGAAAAGAAATCC CCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCTATAGCGAGATTGGT ATGAAAGGGGAAACGAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCA CCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
149362		
149362-aa del dominio scFv	230	<p><u>QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSISSSYYYWGWRIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSAYYNPS</u> <u>LKSRVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARHWQEWPDADFIDWQGTMVTVSSGGGGSGG</u> <u>GGSGGGSETTLTQSPAFMSATPGDKVIISCKASQDIDDAMNWyQKPGAPLFI IQSATSPVP</u> <u>GIIPRFSGSGFGTDFSLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFPLTFGQGTKLEIK</u></p>
149362-nt del dominio scFv	231	<p>CAAGTGCAGCTTCAGGAAAGCGGACCGGGCCTGGTCAAGCCATCCGAAACTCTCTCCCTGACTT GCACTGTGCTGGCGGTCCATCTCATCTCGTCTACTACTGGGGCTGGATTAGGCAGCCGCC CGGAAAGGGACTGGAGTGGATCGGAAGCATCTACTATTCCGGCTCGGCGTACTACAACCTAGC CTCAAGTCGAGAGTGCACATCTCCGTGGATACCTCCAAGAACAGTCTTCCCTGGCGCTGAGCT CCGTGACCGCCGCTGACACCGCGTGTACTACTGTGCTCGGCATTGGCAGGAATGGCCCGATGC CTTCGACATTTGGGGCCAGGCACTATGGTCACTGTGTCTCCGGGGTGGAGGCAGCGGGGGA GGAGGGTCCGGGGGGGAGGTTCAGAGACAACCTTGACCCAGTCAACCCGATTCATGTCCGCCA CTCGGGAGACAAGGTCAATCTCTCGTGCAGGCGTCCAGGATATCGAGGATGCCATGAATTG GTACCAGCAGAAGCCTGGCGAAGCGCGCTGTTCATTATCCAATCCGCAACCTCGCCGTGCCT GGAATCCCACCGCGTTTCAGCGGCAGCGGTTTCGGAACCGACTTTTCCCTGACCATTAACAACA TTGAGTCCGAGGACCGCCCTACTACTTCTGCCTGCAACACGACAACCTCCCTCTCACGTTCCG CCAGGGAACCAAGCTGGAATCAAG</p>
149362-aa de VH	232	<p><u>QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSISSSYYYWGWRIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSAYYNPS</u> <u>LKSRVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARHWQEWPDADFIDWQGTMVTVSS</u></p>
149362-aa de VL	233	<p>ETTLTQSPAFMSATPGDKVIISCKASQDIDDAMNWyQKPGAPLFI IQSATSPVPGIIPRFSG SGFGTDFSLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFPLTFGQGTKLEIK</p>
149362-aa del	234	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		MALPVTALLLPLALLLHAARPVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYYYGWIRQPP
CAR completo		<p>GKGLEWIGSIYYSGSAYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARHWQEWPD FDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSETTLTQSPAFMSATPGDKVILSCKASQDIDDAMNW YQKPGAEAPFLIIQSATSPVPGIPRFSGSGFGTDFSLTINNIESEDAAYFCLQHDNPLPLT QGKLEIKTTTTAPRPTPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDMAEAYSE IGMKGERRRGKGDGLYQLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
149362-nt del CAR completo	235	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCAAGCCGCTCGGCC AAGTGCAGCTTCAGGAAAGCGGACCGGCCCTGGTCAAGCCATCCGAAACTCTCTCCCTGACTTG CACTGTGCTGGCGGTTCATCTCATCGTCTACTACTACTGGGGCTGGATTAGGCAGCCGCC GGAAAGGACTGGAGTGGATCGGAAGCATCTACTATTCGGCTCGGCGTACTACAACCTAGCC TCAAGTCGAGAGTGACCATCTCCGTGGATACCTCCAAGAACCAGTTTTCCCTGCGCCTGAGCTC CGTGACCGCCGCTGACACCGCCGCTGACTACTGTGCTCGGCATTGGCAGGAATGGCCCGATGCC TTCGACATTTGGGGCCAGGGCACTATGGTCACTGTGTCATCCGGGGTGGAGGCAGCGGGGAG GAGGTCGCGGGGGGGAGGTTTCAGAGACAACCTTGACCCAGTCAACCCGATTCATGTCCGCCAC TCCGGGAGACAAGGTCATCTCTGTCGAAAGCGTCCAGGATATCGACGATGCCATGAATTGG TACCAGCAGAAGCCTGGCGAAGCGCCGCTGTTCAATTATCCAATCCGCAACCTCGCCCGTGCCTG GAATCCACCGCGTTCAGCGGCGCGGTTTCGGAACCGACTTTTCCCTGACCATTAACAACAT TGAGTCCGAGGACGCGCCCTACTACTTCTGCTGCAACACGCAACTTCCCTCTCACGTTCCGGC CAGGGAACCAAGCTGGAATCAAGACCCTACCCAGCAGCAGGAGCCACCCAGCCCGGCTCCTA CCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCCTGGTGGGGCCGT GCATACCGGGGCTTACTTCTGCTGCGGATATCTACATTTGGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGC GGGTCCCTGCTGCTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGGTTCGGAAGAAGCTGCTGT ACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTAAGAGGAGGACCGCTGTTCATG CCGGTTCCAGAGGAGGAGGAGGCGGCTGCGAAGTGCAGTGAATTCAGCCGAGCGCAGAT GCTCCAGCTACAAGCAGGCGCAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGG AGTACGAGCTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAATGGGGGGGAGCCGCGCAGAAA GAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAGAGTGGCAGAAGCCTATAGCCGAG ATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCA CGCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCGCCCTCGG</p>
149363		
149363-aa del dominio scFv	236	<p>VNLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRTSGMVCVSWIRQPPGKALEWLARIDWEDKFYSTSL KRLTIISKDTSNDQVLRMTNMDPADTATYYCARSGAGGTSATAFDIWPQGTMTVTVSSGGGSG GGGSGGGSDIQMTQSPSLSASVGRVITICRASQDIYNNLAWFQLKPGSAPRSLMYAANKSQ SGVPSRFSGSASGDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYRFPYPSFGQGTLEIK</p>
149363-nt del dominio scFv	237	<p>CAAGTCAATCTGCGCAATCCGGCCCGCCTTGGTCAAGCCTACCCAGACCTCACTCTGACCT GTACTTTCTCCGGCTTCTCCCTGCGGACTTCCGGGATGTGCGTGTCTGGATCAGACGCCTCC GGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTCGCTCGCATTGACTGGGATGAGGACAAGTCTACTCCACCTCA CTCAAGACCAGGCTGACCATCAGCAAAGATACCTCTGACAACCAAGTGGTGTCCGCATGACCA ACATGGACCCAGCCGACACTGCCACTTACTACTGCGCGAGGAGCGGAGCGGGCGGAACCTCCGC CACCGCCTTCGATATTTGGGGCCCGGTACCATGGTCAACCGTGTCAAGCGGAGGAGGGGGTCC GGGGGCGCGGTTCGGGGGAGGCGGATCGGACATTCAGATGACTCAGTACCATCTGTCCTGTA GCGTAGCGTGGGCGACAGAGTGACAATCACTTGCCGGGCATCCAGGACATCTATAACAACCT TCGTGGTTCAGCTGAAGCCTGGTTCGGCACCGCGGTCACTTATGTACCGCCCAACAGAGC CAGTCGGGAGTCCGCTCCCGTTTTCCGGTTCGGCCTCGGGAACAGTTCACCTGACGATCT CCAGCTGCAACCCGAGGATTCGCCACCTACTACTGCCAGCACTACTCCGCTTCCCTACTC GTTCGGACAGGAAACCAAGCTGAAATCAAG</p>

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
149363-aa de VH	238	<p><u>QVNLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRTSGMCSVSWIRQPPGKALEWLARIDWDEDKFYSTS</u> <u>LKTRLTISKDTSNDQVLRMTNMDPADTATYYCARSGAGGTSATAFDIWGPGTMVTVSS</u></p>
149363-aa de VL	239	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDIYNNLAWFQPKPGSAPRSLMYAANKSQSGVPSRFSG SASGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHYYRFPYSGQGTKEIK</p>
149363-aa del CAR completo	240	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVNLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLRTSGMCSVSWIRQPP GKALEWLARIDWDEDKFYSTSLKTRLTISKDTSNDQVLRMTNMDPADTATYYCARSGAGGTS <u>TAFDIWGP</u>PTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDIYNNL AWFQPKPGSAPRSLMYAANKSQSGVPSRFSGSASGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHYYRFPYS FGQGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG TCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFPRS ADAPAYKQGQNLQYLNELNLRREYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRKGGHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR</p>
149363-nt del CAR completo	241	<p>ATGGCCCTCCCTGTCCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC AAGTCAATCTGCGCAATCCGGCCCGCCTTGGTCAAGCCTACCCAGACCCTCACTCTGACCTG TACTTTCTCCGGCTTCTCCCTGCGGACTTCCGGGATGTGCGTGTCTGGATCAGACAGCCTCCG GGAAAGCCCTGGAGTGGCTCGCTCGCATTGACTGGGATGAGGACAAGTTCTACTCCACCTCAC</p>
		<p>TCAAGACCAGGCTGACCATCAGCAAAGATACTCTGACAACCAAGTGGTCTCCGCATGACCAA CATGGACCCAGCCGACACTGCCACTTACTACTGCGCGAGGAGCGGAGCGGGCGGAACCTCCGCC ACCGCCTTCGATATTTGGGGCCCGGTACCATGGTACCGTGTCAAGCGGAGGAGGGGGTCCG GGGGCGCGGTTCCGGGGGAGGCGGATCGGACATTCAGATGACTCAGTCACCATCGTCCCTGAG CGTAGCGTGGCGGACAGAGTGACAATCACITGCGGGGCAATCCAGGACATCTAACAACCTT GCGTGGTTCAGCTGAAGCCTGGTTCGCGACCGCGGTACITATGTACGCGCCAAACAAGAGCC AGTCGGGAGTGCCTGCCGTTTTCGGGTTCCGGCTCGGGAACACTGACTTACCCCTGACGATCTC CAGCCTGCAACCCGAGGATTTCCGCACCTACTACTGCCAGCACTACTACCGCTTTCCCTACTCG TTCGGACAGGGAACCAAGCTGGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGCAACCCACCCCGG CTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCAATGTAGACCCGACGCTGGTGG GGCGGTGCATACCCGGGCTTGTACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGT ACTTGGGGTCTGCTGCTTTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAAGCGCGTCCGGAAGAAG TGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTG TTCATGCGGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGGGCTGCGAAGTCCGCTGAAATTCAGCCGACG GCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGG GAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGG CAGAAA GAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTAT AGCGAGATTGGTATGAAAGGGGACCGCAGAAAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGAC TCAGACCCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
149364		
149364-aa del dominio scFv	242	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSMNWRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSV KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTLAAVYAFDIWGQGTIVTVSSGGGGSGGG SGGGGSEIVLTQSPSLPVTPEEPASISCRSSQSLHLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSN RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVVYCMQALQTPYTFGQGTKEIK</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
149364-nt del dominio scFv	243	<p>GAAGTGCAGCTTGTGCAATCCGGGGGGGGACTGGTCAAGCCGGGCGGATCACTGAGACTGTCCT GCGCCGCGAGCGGCTTACGTTCTCCTCCTACTCCATGAACTGGGTCGCCAAGCCCCGGGAA GGGACTGGAATGGGTGTCTCTATCTCCTCGTCTGTCGTCTACATCTACTACGCCGACTCCGTG AAGGGAAGATTACCATTCCCGCGACAACGCAAAGAAGTCACTGTACTTGCAAATGAACTCAC TCCGGGGCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCAAGACTATTGCCGCCGTCTACGCTTTCGA CATCTGGGGCCAGGGAACCACCGTACTGTGTCTGTCGGTGGTGGTGGCTCGGGCGGAGGAGGA AGCGGGCGGGGGTCCGAGATTGTGCTGACCCAGTCCGCACTGAGCCTCCCTGTGACCCCG AGGAACCCGCCAGCATCAGCTGCCGGTCCAGCCAGTCCCTGCTCCACTCCAACGGATAACAATTA CCTCGATTGGTACCTTCAGAAGCCTGGACAAGCCCGCAGCTGCTCATCTACTTGGGATCAAAC CGCGGTCAGGAGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCGGGCAGCGGTACCGATTTACCCCTGAAAA TCTCCAGGGTGGAGGCAGAGGACGTGGGAGTGTATTACTGTATGCAGGGCTGCAGACTCCGTA CACATTTGGGCAGGCCACCAAGCTGGAGATCAAG</p>
149364-aa de VH	244	<p>EVQLVESGGGLVQPKGASLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSV KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKTIAAVYAFDIWGQGTITVTVSS</p>
149364-aa de VL	245	<p>EIVLTQSPPLSLPVTPEEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVVYCMQALQTPYTFGQGTGLEIK</p>
149364-aa del CAR completo	246	<p>MALPVTALLPLIALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPKGASLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK GLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKTIAAVYAFD IWQGTITVTVSSGGGGGGGGGGSEIIVLTQSPPLSLPVTPEEPASISCRSSQSLLSNGYNY LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVVYCMQALQTPY TFGQGTGLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEGGCELVRKFSR SADAPAYKQGNQLYNELNLRREYDVLDRRRDRPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
149364-nt del CAR completo	247	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTGCAGCTTGTGCAATCCGGGGGGGGACTGGTCAAGCCGGGCGGATCACTGAGACTGTCCTG CGCCGCGAGCGGCTTACGTTCTCCTCCTACTCCATGAACTGGGTCGCCAAGCCCCGGGAAG GACTGGAATGGGTGTCTCTATCTCCTCGTCTGTCGTCTACATCTACTACGCCGACTCCGTGA AGGGAAGATTACCATTCCCGCGACAACGCAAAGAAGTCACTGTACTTGCAAATGAACTCACT CCGGGCCGAAGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCAAGACTATTGCCGCCGTCTACGCTTTCGAC ATCTGGGGCCAGGGAACCACCGTACTGTGTCTGTCGGTGGTGGTGGCTCGGGCGGAGGAGGAA GCGGGCGGGGGTCCGAGATTGTGCTGACCCAGTCCGCACTGAGCCTCCCTGTGACCCCGGA GGAACCCGCCAGCATCAGCTGCCGGTCCAGCCAGTCCCTGCTCCACTCCAACGGATAACAATTAC CTCGATTGGTACCTTCAGAAGCCTGGACAAGCCCGCAGCTGCTCATCTACTTGGGATCAAACC GCGCGTCAGGAGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCGGGCAGCGGTACCGATTTACCCCTGAAAA CTCCAGGGTGGAGGCAGAGGACGTGGGAGTGTATTACTGTATGCAGGGCTGCAGACTCCGTAC ACATTTGGGCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCCGCAGCTGG TGGGGCCGTGCATACCCGGGCTTGTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCT</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		GGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCACCTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGGGTTCGGAAGA AGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTTCATGCCGGTTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTAAATTCAGCCGC AGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTC GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCC GCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCC TATAGCGAGATTGGTATGAAAAGGGGAAACGCAGAAAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGG GACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCTGCGCCCTCGG
149365		
149365-aa del dominio scFv	248	EVQLVESGGGLV ^K PKG ^S LR ^L SCAASGFTFS ^D YYMSWIRQAPGKLEWVSYIS ^S SGSTIYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMN ^S LR ^A EDTAVYYCARDLRGAFDIWGQGMVTVSSGGGSGGGGSG GGSSYVLTQSPSVSAAPGYTATISCGGNNIGTKSVHWYQKPGQAPLLVIRDDSVRPSKIPGR FSGSNSGNM ^A TLTISGVQAGDEADFYCQVWDSSEHVVFGGGTKLTVL
149365-nt del dominio scFv	249	GAAGTCCAGCTCGTGGAGTCCGGCGGAGGCCTTGTGAAGCCTGGAGGTTTCGCTGAGACTGTCCT GCGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCGACTACTACATGTCCTGGATCAGACAGGCCCCGGGAAA GGCCTGGAATGGGTGTCCTACATCTCGTCATCGGGCAGCACTACTACTACGGGACTCAGTG AAGGGGCGGTTCAACATTTCCCGGATAACCGGAAGAACTCGCTGTATCTGCAAAATGAACTCAC TGAGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCCGCATCTCCGCGGGGCATTTGACATCTG GGGACAGGGAACCATGGTCCAGTGTCCAGCGGAGGGGAGGATCGGGTGGCGGAGGTTCGGGG GGTGGAGGCTCCTCCTACGTGCTGACTCAGAGCCCAAGCGTCAGCGCTGCGCCCGGTTACACGG CAACCACTCCTGTGGCGGAAACAACATTTGGGACCAAGTCTGTGCACTGGTATCAGCAGAAAGCC GGCCAAGCTCCCTGTTGGTGTATCCGCGATGACTCCGTGCGGCCTAGCAAAATTCGGGACCG TTCTCCGGCTCCAACAGCGGCAATATGGCCACTCTCACCATCTCGGGAGTGCAGGCGCGGAGATG AAGCCGACTTCTACTGCCAAGTCTGGGACTCAGACTCCGAGCATGTGGTGTTCGGGGGCGGAAC CAAGCTGACTGTGCTC
149365-aa de VH	250	EVQLVESGGGLV ^K PKG ^S LR ^L SCAASGFTFS ^D YYMSWIRQAPGKLEWVSYIS ^S SGSTIYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMN ^S LR ^A EDTAVYYCARDLRGAFDIWGQGMVTVSS
149365-aa de VL	251	SYVLTQSPSVSAAPGYTATISCGGNNIGTKSVHWYQKPGQAPLLVIRDDSVRPSKIPGRFSGS NSGNM ^A TLTISGVQAGDEADFYCQVWDSSEHVVFGGGTKLTVL
149365-aa del CAR completo	252	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLV ^K PKG ^S LR ^L SCAASGFTFS ^D YYMSWIRQAPGK GLEWVSYIS ^S SGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN ^S LR ^A EDTAVYYCARDLRGAFDIW GQGMVTVSSGGGSGGGGSGGGSSYVLTQSPSVSAAPGYTATISCGGNNIGTKSVHWYQK GQAPLLVIRDDSVRPSKIPGRFSGSNSGNM ^A TLTISGVQAGDEADFYCQVWDSSEHVVFGGGT KLTVLTTTPAPRPTPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWIAPLAGTCGL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS ^R FP ^E EEEGGCELRV ^K FSR ^S ADAPA YKQGQNL ^Y NE ^L NR ^E EYD ^V LD ^K RR ^R DR ^P EM ^G GK ^P RR ^R KN ^P Q ^E GL ^Y NE ^L Q ^K DM ^A EAY ^S EI ^G M KGERRRGK ^G HD ^G LY ^Q GL ^S TAT ^K DT ^Y DAL ^H M ^Q AL ^P PR
149365-nt del CAR completo	253	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTCCAGCTCGTGGAGTCCGGCGGAGGCCCTGTGAAGCCTGGAGGTTCCGCTGAGACTGTCTG CGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCGACTACTACATGTCTGGATCAGACAGGCCCGGGAAAG GGCTTGAATGGGTGTCTTACTCTCGTCACTCGGGCAGCACTATCTACTACGCGGACTCAGTGA AGGGCGGTTACCACTTCCCGGGATAACCGGAAGAACTCGTGTATCTGCAAAATGAACACTACT GAGGGCCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCGCCCGCATCTCCGCGGGCATTGACATCTGG GGACAGGGAACCATGGTACAGTGTCCAGCGGAGGGGGAGGATCGGGTGGCGGAGGTTCCGGGG GTGGAGGCTCCTCCTACGTGTGACTCAGAGCCCAAGCGTCAGCGCTGCGCCCGGTTACACGGC AACCATCTCCTGTGGCGAAACAACATTGGGACCAAGTCTGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCG GGCAAGCTCCCTGTTGGTGTATCCGCGATGACTCCGTGCGGCC TAGCAAAATCCGGGACGGT TCTCCGGCTCCAACAGCGGCAATATGGCCACTCTCACCATCTCGGGAGTGCAGGCCGGAGATGA AGCCGACTTCTACTGCAAGTCTGGGACTCAGACTCCGAGCATGTGGTGTTCGGGGCGGAACC AAGCTGACTGTGCTCACCCTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCT CCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCCGCAGTGGTGGGGCCGTGACACCCG GGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTGGGCCCTCTGGTGGTACTTGGGGGTCTCTG CTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGGGAAGAAGCTGTGTACACTTTTA AGCAACCTTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGTTCCC AGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAAGTGGCGTGAATTCAGCCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCC TACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCAATCTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACG TGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCA AGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGGATTGGTATG AAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCACCA AGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCGCCCTCGG</p>
149366		
149366-aa del dominio scFv	254	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKPSGYTSTSHYIHWVRRAPGQGLEWMGINPSSGGVTAYSQTL</u> <u>QGRVMTSDTSSSTVYMELSSLRSEDTAMYICAREGSGSGWYFDWGRGTLVTVSSGGGGSGGG</u></p>
		<p>GGGGGSSSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDGLSKKYVSWYQQKAGQSPVVLISRDKERPSGI PDRFSGSNSADTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDDTTVVFGGGTKLTVL</p>
149366-nt del dominio scFv	255	<p>CAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGGGCCAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCTCCGTGAAAGTGTCTT GCAAGCCTTCGGGATACACCGTGACCTCCCACTACATTGTTGGTCCGCGCGCCCCCGGCCA AGGACTCGAGTGGATGGGCATGATCAACCTAGCGCGGAGTGACCGGTACAGCCAGACGCTG CAGGGACGCGTGACTATGACCTCGGATACCTCCTCCTCCACCGTCTATATGGAAGTGTCCAGCC TCGGGTCCGAGGATACCGCCATGTACTACTGCGCCCGGAAGGATCAGGCTCCGGGTGGTATTT CGACTTCTGGGGAAGAGGCACCCTCGTGACTGTGTCTATCTGGGGGAGGGGGTTCGGTGGTGGC GGATCGGGAGGAGGCGGTTTCATCCTACGTGCTGACCCAGCCACCTCCGTGCTGAGCCTCCG GCCAGACTGCATCGATTACATGTAGCGGCGACGGCCTCTCCAAGAAATACGTGTCTGGTACCA GCAGAAGGCCGACAGAGCCCGGTGGTGTCTGATCTCAAGAGATAAGGAGCGGCC TAGCGGAATC CCGGACAGGTTCTCGGGTTCCAACCTCCGCGGACACTGCTACTCTGACCATCTCGGGGACCCAGG CTATGGACGAAGCCGATTACTACTGCAAGCCTGGGACGACACTACTGTGCTGTTGGAGGGGG ACCAAGTTGACCGTCTT</p>
149366-aa de VH	256	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKPSGYTSTSHYIHWVRRAPGQGLEWMGINPSSGGVTAYSQTL</u> <u>QGRVMTSDTSSSTVYMELSSLRSEDTAMYICAREGSGSGWYFDWGRGTLVTVSS</u></p>
149366-aa de VL	257	<p>SYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDGLSKKYVSWYQQKAGQSPVVLISRDKERPSGIPDRFSGS NSADTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDDTTVVFGGGTKLTVL</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
149366-aa del CAR completo	258	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCKPSGYTVTSHYIHWVRRAPGQ GLEWGMGINPSSGGVTAYSQTLQGRVTMTSDTSSSTVYMELESSLRSEDAMYYCAREGSGSWYF DFWGRGTLVTVSSGGGGGGGGSSSYVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDGLSKKYVSWYQ QKAGQSPVVLISRDKERPSGIPDRFSGSNSADTATLTI SGTQAMDEADYYCQAWDDTTVVF TKLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCCV LLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAP AYKQGNQLYNELNLRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DMAEAYSEIG MKGERRRGKGDGLYQLSTATKDTYDALHMQLPPR</p>
149366-nt del CAR completo	259	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCGCTCGGCC AAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGGCCGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCCTCCGTGAAAGTGCCTG CAAGCCTTCGGGATACACCGTGACCTCCACTACATTCATTGGGTCCGCGCGCCCCGGCCAA GGACTCGAGTGGATGGGCATGATCAACCCTAGCGCGGAGTGACCGCGTACAGCCAGACGCTGC AGGGACGCGTGACTATGACCTCGGATACCTCCCTCCACCGCTATATGGAACGTCCAGCCT GCGGTCCGAGGATACCGCCATGTACTACTGCGCCCGGAAGGATCAGGCTCCGGGTGGTATTT GACTTCTGGGGAAGAGGCACCTCGTGACTGTGTCATCTGGGGGAGGGGTTCCGGTGGTGGCG GATCGGGAGGAGGCGGTTCACTCCTACGTGCTGACCCAGCCACCTCCGTGTCGGTGGAGCCCGG CCAGACTGCATCGATTACATGTAGCGGCGACGGCCTCTCCAAGAAATACGTGTCGTGGTACCAG CAGAAGGCCGGACAGAGCCCGTGGTGTGATCTCAAGAGATAAGGAGCGGCCTAGCGGAATCC CGGACAGGTTCTCGGGTCCAACCTCCGCGGACACTGCTACTCTGACCATCTCGGGGACCCAGCG TATGGACGAAGCCGATTACTACTGCCAAGCCTGGGACGACACTACTGTGCTGTTGGAGGGGGC ACCAAGTTGACCGTCTTACCCTACTCCCGAGCACCAGGCGCCACCCACCCCGGCTCTACCATCG CCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCAATGAGACCGCAGCTGGTGGGGCGGTGCATAC CCGGGGTCTTGACTTCGCTCGGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGGT CTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTTTACTGTAAGCGCGTCCGGAAGAAGCTGTGTACATCT TTAAGCAACCTTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCGGTT CCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCA GCCTACAAGCAGGGGACAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACG ACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCC CCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGT ATGAAAGGGGAACGACAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCCA CCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCGCCTCGG</p>
149367		
149367-aa del dominio scFv	260	<p>QVQLQESGPGLVKPSQTLISLCTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSSGSTYYNPS LKSRLVTLISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARAGIAARLRGAFDIWQGTMTVTVSSGGGG GGGGSGGGSDIVMTQSPSSVSASVGRVITTCRASQGIKRWLAWYQKPKAPNLLIYAASNL QSGVPSRFSGSSGADFLLTISLQPEDVATYYCQKYNAPFTFGPGTKVDIK</p>
149367-nt del dominio scFv	261	<p>CAAGTGCAGCTTACAGGAGAGCGGCCCGGGACTCGTGAAGCCGTCCAGACCCCTGTCCCTGACTT GCACCGTGTCCGGAGGAAGCATCTCGAGCGGAGGCTACTATTGGTCTGGATTCCGGCAGCACCC TGAAAGGGCTGGAAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCGACCTACTACAACCCATCG CTGAAGTCCAGAGTACAATCTCAGTGGACACGTCCAAGAATCAGTTCAGCCTGAAGCTCTCTT CCGTGACTGCGGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCACGCGTGGAAATTCGCGCCCGGCTGAG GGTGCCTTCGACATTTGGGGACAGGGCACCATGGTACCGTGTCTCCGGCGCGGAGGTTCC GGGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGGGTCGACATCGTCAATGACTCAGTCCGCTCAAGCGTCA GCGCGTCCGTCCGGGACAGATGATCATCACTGTCCGGCGTCCAGGGAATTCGCAACTGGCT GGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCCCAACCTGTTGATCTACGCCGCTCAAACCTC</p>

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		CAATCCGGGGTCCGAGCCGCTTCAGCGGCTCCGGTTCGGGTGCCGATTTCACTCTGACCATCT CCTCCCTGCAACCTGAAGATGTGGCTACCTACTACTGCCCCAAAAGTACAACCTCCGCACCTTTTAC TTTCGGACCGGGACC AAAAGTGGACATTAAG
149367-aa de VH	262	<u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u> SLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSGSTYYNPS <u>LKSRVTISVDTSKNQFSLK</u> LSSVTAADTAVYYCARAGIAARLRGAFDIWGQGTMTVTVSS
149367-aa de VL	263	DIVMTQSPSSVSASVGRVITTCRASQGIKRWLAWYQQKPKAPNLLIYAASNLQSGVPSRFSG SGSGADFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPFTFGPGTKVDIK
149367-aa del CAR completo	264	MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTL ¹ SLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHP GKLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK ² LSSVTAADTAVYYCARAGIAARLR GAFDIWGQGTMTVTVSSGGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPSSVSASVGRVITTCRASQGIKRWL AWYQQKPKAPNLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGADFTLTISLQPEDVATYYCQKYNAPFT FGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQITQEEDGCSRFPPEEEEGCELRVKFSRS ADAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDLGQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
149367-nt del CAR completo	265	ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC AAGTGCAGCTTCAGGAGACCGCCCGGACTCGTGAAGCCGTCAGACCCCTGTCCTGACTTG CACCGTGTCCGGAGGAAGCATCTCGAGCGGAGGCTACTATTGGTCGTGGATTCCGCAGCACCT GGAAAGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGCTCGACCTACTACAACCCATCGC TGAAGTCCAGAGTGACAATCTCAGTGGACACGTCCAAGAATCAGTTCAGCCTGAAGCTCTCTTC CGTGACTCGCGCCGACACCCGCGTGTACTACTGCGCACGCGCTGGAATTGCCGCCCGGCTGAGG GGTGCTTCGACATTTGGGGACAGGGCACCATGGTCACCGTGTCTCCGGCGCGGAGGTTCG GGGTGGAGGCTCAGGAGGAGGGGGTCCGACATCGTCATGACTCAGTCGCCCTCAAGCGTACG CGCTCCGTCGGGGACAGAGTGATCATCACCTGTCCGGCGTCCCAGGGAATTCGCAACTGGCTG CCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCAACCTGTGATCTACGCCGCTCAAACCTCC AATCCGGGTGCCGAGCCGCTTCAGCGGCTCCGGTTCGGGTGCCGATTTCACTCTGACCATCTC CTCCCTGCAACCTGAAGATGTGGCTACCTACTACTGCCAAAAGTACAACCTCCGCACCTTTTACT TTCGGACCGGGGACCAAGTGGACATTAAGACCCTACCCAGCACCAGCCACCCACCCCGG CTCTACCATCCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGAGGCAATGAGACCCGAGCTGGTGG GGCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGT ACTTGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGTCCGGAAGAAGC TGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTATGAGGCCGTGTCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTG TTCATGCCGTTCCAGAGGAGGGAAGGGCGTGGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGACG GCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGCAGAACCGCTCTACAACGAACCAATCTTGGTCGGA GAGAGGAGTACGACGTCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCCG CAGAAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTAT AGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGAC TCAGCACGCCCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGACGCCCCGCGCTCGG
149368		
149368-aa del dominio scFv	266	QVQLVQSGAEVVKPGSSVKVCSKASGGTFSYAI ¹ SWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARRGGYQLLRWDVGLLRSAFDIWGQGTMTVTVS SGGGSGGGSGGGSSYVLTQPPSVSVAPGQTARI ² TCCGNNIGSKSVHWYQQKPKGQAPVTLVLY GKNNRPSGVPDRFSGSRSGTASLTI ³ TGAQAEDEADYYC ⁴ SRDSSGDHLRVFGTGTKVTVL

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
149368-nt del dominio scFv	267	<p>CAAGTGCAGCTGGTCCAGTCGGGCGCCGAGGTCAAGAAGCCCGGAGCTCTGTGAAAGTGTCTT GCAAGGCCTCCGGGGGCACCTTTAGCTCCTACGCCATCTCCTGGGTCGCGCAAGCACCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGGGGAATTATCCCTATCTTCGGCACTGCCAACTACGCCAGAAAGTTC CAGGGACGCGTGACCATTACCGCGGACGAATCCACCTCCACCGCTTATATGGAGCTGTCCAGCT TGGCTCGGAAGATACCGCGTGTACTACTGCGCCCGGAGGGGTGGATACCAGCTGTGAGATG GGACGTGGGCTCCTGCGGTGCGGTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACATGGTCACTGTGTCC AGCGGAGGAGCGGATCGGGAGGCGCGGATCAGGGGAGGCGGTTCAGCTACGTGCTTACTC AACCCCTTCGGTGTCCGTGGCCCCGGACAGACCCGAGAAATCACTTGGGAGGAAACAACAT TGGTCCAAGAGCGTGCATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTGCTGGTGTCTAC GGGAAGAACAATCGGCCAGCGGAGTCCCGACAGGTTCTCGGGTTCACGCTCCGGTACAACCG CTTCACTGACTATCACCGGGGCCAGGCAGAGGATGAAGCGGACTACTACTGTTCTCCCGGGA TTCATCCGGCGACCACCTCCGGGTGTTCGGAACCGGAACGAAGGTCACCGTGTCTG</p>
149368-aa de VH	268	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF</u> <u>QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGYQLLRWDVGLLRSAFDI</u><u>WQGTMVTVS</u> S</p>
149368-aa de VL	269	<p>SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVLYGKNNRPSGVPDRFSGS RSGTTASLTIITGAQAEDEADYYCSSRDSSGDHLRVFGTGTKVTVL</p>
149368-aa del CAR completo	270	<p>MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGYQLLRW DVGLLRSAFDIWQGTMTVSSGGGGGGGGSSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNI</p>
		<p>GSKSVHWYQQKPGQAPVLVLYGKNNRPSGVPDRFSGSRGTTASLTIITGAQAEDEADYYCSSRD SSGDHLRVFGTGTKVTVLTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDRKRRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQUALPPR</p>
149368-nt del CAR completo	271	

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCC AAGTGCAGCTGGTCCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAGCCGGGAGCTCTGTGAAAGTGTCTCG CAAGGCCTCCGGGGGCACCTTTAGCTCCTACGCCATCTCCTGGGTCGCCCAAGCACCGGGTCAA GGCTGGAGTGGATGGGGGAATTATCCCTATCTTCGGCACTGCCAACTACGCCCAGAAGTTC AGGGACGCGTGACCATACCGCGGACGAATCCACCTCCACCGCTTATATGGAGCTGTCCAGCTT GCGCTCGGAAGATACCGCCGTGACTACTGCGCCCGGAGGGTGGATACCAGCTGCTGAGATGG GACGTGGGCCTCCTGCGGTTCGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACTATGGTCACTGTGTCCA GCGGAGGAGGCGGATCGGGAGGCGCGGATCAGGGGGAGGCGGTTCCAGCTACGTGCTTACTCA ACCCCTTCGGTGTCCGTGGCCCGGGACAGACCGCCAGAATCACTTCCGGAGGAAACAACATT GGTCCAAGAGCGTGCATTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTGCTGGTCTCAG GGAAACAATCGGCCAGCGGAGTCCCGGACAGGTTCTCGGGTTCACGCTCCGGTACAACCGC TTCAGTACTATCACCGGGGCCAGGCAGAGGATGAAGCGGACTACTACTGTCTCCCGGGAT TCATCCGGCGACCACCCTCCGGGTGTTCGGAACCGGAACGAAGGTCACCGTGTGACCCTACCC CAGCACCGAGGCCACCCACCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGGCTCTGTCCCTGCGTCCGGA GGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGCTCTGACTTCGCTGCGATATC TACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGCGGGTCTGCTGCTTTCACCTCGTGATCACTCTTT ACTGTAAGCGCGGTTCGGAAGAAGCTGTGTACATCTTAAAGCAACCCTTCATGAGGCCGTGCA GACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCGGGTTCAGAGAGGAGGAAAGCGGCTCGCAA CTGCGCGTGAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACAGCTCT ACAACGAACTCAATCTGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGCAACCGGAGAGGACGGGA CCAGAAAATGGCGGGGAAGCCCGCAGAAAAGAATCCCAAGAGGCTGTACAACGAGCTCCAA AAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATGGTATGAAAGGGGAACCGAGAAGAGCAAAG GCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACAT GCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
149369		
149369-aa del dominio scFv	272	<p><u>EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYSFYA</u> <u>ISLKSRIIINPDTSKNQFSLQLKSVTPEDTAVYYCARSSPEGLFLYWFDPWGQGLVTVSSGGD</u> <u>GSGGGSGGGSSSELQDPAVSVALGQTIRITCQGDSLGNYYATWYQQKPGQAPVLIYGTNN</u> <u>RPSPGIPDRFSASSSGNTASLTI TGAQAEDEADYYCNSRDSGGHLLFGTGTKVTVL</u></p>
149369-nt del dominio scFv	273	<p>GAAGTGCAGCTCCAACAGTCAGGACCGGGGCTCGTGAAGCCATCCCAGACCCCTGTCCCTGACTT GTGCCATCTCGGGAGATAGCGTGTCACTCGAACTCCGCCGCTGGAAGTGGATTCCGGCAGAGCCC GTCCCGCGGACTGGAGTGGCTTGGAAAGACCTACTACCGGTCCAAGTGGTACTCTTCTACGCG ATCTCGCTGAAGTCCCGCATATCATTAACCTGATACCTCCAAGAATCAGTCTCCCTCCAAC TGAATCCGTACCCCCGAGGACACAGCAGTGTATTACTGCGCACGGAGCAGCCCCGAAGGACT GTTCCCTGTATTGGTTTGACCCCTGGGGCCAGGGGACTCTTGTGACCGGTTCGAGCGCGGAGAT GGGTCCGGTGGCGGTGGTTCGGGGGGCGCGGATCATCATCCGAAGTACCCAGGACCCGGCTG TGTCCGTGGCGTGGGACAAACCATCCGCATTACGTGCCAGGGAGACTCCCTGGGCAACTACTA CGCCACTTGGTACCAGCAGAAGCCGGGCCAAGCCCCGTGTGTGGTCACTACGGGACCAACAAC AGACCTTCCGGCATCCCGACCGGTTACGCGCTTCGTCTCCGGCAACACTGCCAGCCTGACCA TCACTGGAGCGCAGGCCGAAGATGAGGCCGACTACTACTGCAACAGCAGAGACTCCTCGGGTCA TCACCTCTGTTCGGAAGTGAACCAAGGTACCCGTGCTG</p>
149369-aa de VH	274	<p><u>EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYSFYA</u> <u>ISLKSRIIINPDTSKNQFSLQLKSVTPEDTAVYYCARSSPEGLFLYWFDPWGQGLVTVSS</u></p>
149369-aa de VL	275	<p><u>SSELTQDPAVSVALGQTIRITCQGDSLGNYYATWYQQKPGQAPVLIYGTNNRPSPGIPDRFSAS</u> <u>SSGNTASLTI TGAQAEDEADYYCNSRDSGGHLLFGTGTKVTVL</u></p>
149369-aa del CAR completo	276	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSP SRGLEWLGRTYYRSKWYSFYAISLKSRIIINPDTSKNQFSLQLKSVTPEDTAVYYCARSSPEGL <u>FLYWFDPWQGT</u>LVTVSSGGDGGGGGGSSSELTQDPAVSVLQGTIRITCQGD<u>SLGNYY</u> <u>ATWYQQKPGQAP</u>VLVIYGTNNRPSGIPDRFSASSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGH <u>HLLFGTGT</u>KVTVLTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYKQGGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
149369-nt del CAR completo	277	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTGCAGCTCCAACAGTCAGGACCGGGGCTCGTGAAGCCATCCCAGACCCTGTCCCTGACTTG TGCCATCTCGGGAGATAGCGTGTCAATCGAACTCCGCCGCTGGAAGTGGATTCGGCAGAGCCCG TCCCGCGGACTGGAGTGGCTTGGAAAGGACCTACTACCGGTCCAAGTGGTACTCTTTCTACGCGA TCTCGCTGAAGTCCCGCATTATCATTAAACCCTGATACCTCCAAGAAATCAGTTCTCCCTCCAAC</p>
		<p>GAAATCCGTCACCCCGAGGACACAGCAGTGTATTACTGCGCACGGAGCAGCCCGAAGGACTG TTCTGTATTGGTTTGACCCCTGGGGCCAGGGGACTCTTGTGACCGTGTGAGCGGGGAGATG GGTCGGTGGCGGTGGTTCGGGGGGCGGGATCATCATCCGAAGTACCCAGGACCCGGCTGT GTCCGTGGCGCTGGGACAAACCATCCGCATTACGTGCCAGGGAGACTCCCTGGGCAACTACTAC GCCACTTGGTACCAGCAGAAGCCGGGCAAGCCCTGTGTGGTCACTACGGGACCAACAACA GACCTTCCGGCATCCCCGACCGGTTACGCGCTTCGTCCTCCGGCAACACTGCCAGCCTGACCAT CACTGGAGCGCAGGCCGAAGATGAGGCCGACTACTACTGCAACAGCAGAGACTCCTCGGGTCAT CACCTCTGTTCGGAAGTGGAAACCAAGGTCACCGTGTGACCACATCCCGCAGCAGCCGAGCCAC CCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCCG AGCTGGTGGGGCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCCT CTGGCTGTACTTGGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAAGCGCGT GGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGA GGACGGCTGTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAAGTGCAGTGAATTC AGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACAGCTCTACAACGAATCAATC TTGGTCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGG GAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCA GAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAGGGCAAAGGCCACGACGGACTGT ACCAGGACTCAGCACCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCG TCGG</p>
BCMA_EBB-C1978-A4		
BCMA_EBB-C1978-A4 - aa del dominio ScFv	278	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSV <u>KGRFT</u>ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVEGSGSLDYWGQGTILVTVSSGGGGGGGG GGGGSEIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSAYLAWYQQKPGQPPRLIISGASTRATGI PDRFGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFNGLSLFTFGQGRLEIK</p>
BCMA_EBB-C1978-A4 - nt del dominio scFv	279	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>GAAGTGCAGCTCGTGGAGTCAGGAGCGGCCCTGGTCCAGCCGGGAGGGTCCCTTAGACTGTCAT GCGCCGCAAGCGGATTCACCTTCTCCTCCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCCCCGGAAA GGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCGGGGTCTGGAGGCTCAACTTACTACGCTGACTCCGTG AAGGGACGGTTCACCATAGCCCGCACAACCTCCAAGAACACCCTCTACCTCCAATGAACTCCC TCGGGCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCGCCAAAGTGGAAAGGTTAGGATCGCTGGACTA CTGGGGACAGGGTACTCTCGTGACCGTGTCTATCGGGCGGAGGAGGTTCCGGCGGTGGCGGCTCC GCGGGCGGAGGGTCCGAGATCGTGATGACCCAGAGCCCTGGTACTCTGAGCCTTTCGCCGGGAG AAAGGGCCACCCTGTCTGCGCGCTTCCCAATCCGTGTCTCCGCGTACTTGGCGTGGTACCA GCAGAAGCCGGGACAGCCCCCTCGGCTGTGATCAGCGGGCCAGCACCCTGGGCAACCCGGAATC CCAGACAGATTCGGGGTTCGGCAGCGGCACAGATTCACCCTGACTATTCGAGGTTGGAGC CCGAGGACTTTCGGGTGATTACTGTGACGACTACGGGTCGTCTTAAATGGCTCCAGCCTGTT CACGTTCCGACAGGGGACCCGCTGGAAATCAAG</p>
BCMA_EBB-C1978-A4 - aa de VH	280	<p><u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSV</u> <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKVEGSGSLDYWGQGTLVTVSS</u></p>
BCMA_EBB-C1978-A4 - aa de VL	281	<p><u>EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSAYLAWYQQKPGQPRLLISGASTRATGIPDRFG</u> <u>SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFNGLSLTFGQGTTRLEIK</u></p>
BCMA_EBB-C1978-A4 - aa del CART completo	282	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKVEGSGSLDY WGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGSEIIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSAYLAWYQ QKPGQPRLLISGASTRATGIPDRFGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFNGLSLF TFGQGTTRLEIKTTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRFP EEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQGQNL YNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
BCMA_EBB-C1978-A4 - nt del CART completo	283	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCCTCGGCCCG AAGTGCAGCTCGTGGAGTCAGGAGGCGGCCCTGGTCCAGCCGGGAGGGTCCCTTAGACTGTCATG CGCCGCAAGCGGATTCACCTTCTCCTCCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCCCCGGAAAG GGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCGGGGTCTGGAGGCTCAACTTACTACGCTGACTCCGTGA AGGGACGGTTCACCATAGCCCGCACAACCTCCAAGAACACCCTCTACCTCCAATGAACTCCCT CGGGCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCGCCAAAGTGGAAAGTTCAGGATCGCTGGACTAC TGGGGACAGGGTACTCTCGTGACCGTGTCTATCGGGCGGAGGAGGTTCCGGCGGTGGCGCTCCG CGGGCGGAGGGTCCGAGATCGTGATGACCCAGAGCCCTGGTACTCTGAGCCTTTCGCCGGGAGA AAGGGCCACCCTGTCTGCGCGCTTCCCAATCCGTGTCTCCGCGTACTTGGCGTGGTACCAG</p>

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>CAGAAGCCGGGACAGCCCCCTCGGCTGCTGATCAGCGGGGCCAGCACCCGGGCAACCGGAATCC CAGACAGATTCGGGGTTCCGGCAGCGGCACAGATTCACCTGACTATTCGAGGTTGGAGCC CGAGGACTTTGCGGTGATTACTGTCAGCACTACGGGTCGTCCTTTAAFGGCTCCAGCCTGTTTC ACGTTCCGACAGGGGACCCGCCTGGAATCAAGACCCTACCCAGCACCAGGAGCCACCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTCGCTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGG TGGGGCCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCT GGTACTTGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGGGTCCGAAGA AGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTTATGCGGTTCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAATGCGCGTGAATTCAGCCGC AGCGCAGATGCTCCAGCTACAAGCAGGGGCAAGACCAGCTACAACGAATCAATCTTGGTC GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGACCAGAAATGGGCGGAAGCC GCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAGCC TATAGCGAGATTGGTATGAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGG GACTCAGCACCCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGACGGCCCTGCCGCTCGG</p>
BCMA_EBB-C1978-G1		
BCMA_EBB-C1978-G1 - aa del dominio ScFv	284	<p><u>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLS</u><u>CAASGITFSRYPMSWVRQAPGKGLEWVSGISDSGVSTY</u> <u>YADSAKGRFTISRDN</u><u>SKNTLFLQMS</u><u>SLRDEDTAVYYCVTRAGSEASDIWGQGMVTVS</u> <u>SGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL</u><u>SCRASQSVSN</u><u>SLAWYQQKPGQA</u> <u>PRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAIYYCQ</u><u>QFGTSSGLTFGGGTKL</u> <u>EIK</u></p>
BCMA_EBB-C1978-G1 - nt del dominio ScFv	285	<p>GAAGTGCAACTGGTGGAACCGGTGGCGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCATTGAGGCTGTCA GCGCGGCACCGGTATTACCTTCTCCCGGTACCCCATGTCCTGGGTGACAGACGGCCCCGGGAA AGGGCTTGAATGGGTGTCCGGGATCTCGGACTCCGGTGTGACACTTACTACGCCGACTCCGCC AAGGGACGCTTACCATTTCGGGACAACCTCGAAGAACCCTGTTCTCCAAATGAGCTCCC TCCGGGACGAGGATACGACGTGACTACTGCGTGACCCGCGCGGGTCCGAGGCGCTGACAT TTGGGGACAGGGCACTATGGTCACCGTGTGCTCCGGCGGAGGGGGCTCCGGAGGCGGTGGCAGC GGAGGAGGAGGTCCGAGATCGTGTGCTGACCAATCCCGGCCACCCTCTCGCTGAGCCCTGGAG AAAGGGCAACCTTGTCTGTGCGCGGAGCCAGTCCGTGAGCAACTCCCTGGCCTGGTACCAGCA GAAGCCCGGACAGGCTCCGAGACTTCTGATCTACGACGCTTCGAGCCGGGCCACTGGAATCCCC GACCCTTTTCGGGGTCCGGCTCAGGAACCGATTTACCCCTGACAATCTCAGCGCTGGAGCCAG AGGATTTGCCCATCTATTACTGCCAGCAGTTCGGTACTTCTCCGGCCGACTTTCGGAGGCGG CACGAAGCTCGAAATCAAG</p>
BCMA_EBB-C1978-G1 - aa de VH	286	<p><u>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLS</u><u>CAASGITFSRYPMSWVRQAPGKGLEWVSGISDSGVSTY</u><u>YADSA</u> <u>KGRFTISRDN</u><u>SKNTLFLQMS</u><u>SLRDEDTAVYYCVTRAGSEASDIWGQGMVTVSS</u></p>
BCMA_EBB-C1978-G1 - aa de VL	287	<p><u>EIVLTQSPATLSLSPGERATL</u><u>SCRASQSVSN</u><u>SLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSG</u> <u>SGSGTDFLTISRLEPEDFAIYYCQ</u><u>QFGTSSGLTFGGGTKLEIK</u></p>
BCMA_EBB-C1978-G1 - aa del CART completo	288	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSRYPMWSVVR QAPGKGLEWVSGISDSGVSTYYADS<u>AKGRFTISRDN</u>SKNTLFLQMSSLRDEDTAVYYCV TRAGSEASDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSNLAWYQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFA IYYCQOFGTSSGLTFGGGKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLQYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQUALPPR</p>
<p>BCMA_EBB-C1978-G1 - nt del CART completo</p>	<p>289</p>	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCCTCGGCCG AAGTGCAACTGGTGGAAACCGTGGCGCCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCATTGAGGCTGTCATG CGCGGCCAGCGTATTACCTTCTCCCGGTACCCCATGTCTGGGTGAGACAGGCCCGGGGAAA GGGCTTGAATGGGTGTCCGGATCTCGGACTCCGGTGTGACGACTTACTACGCCGACTCCGCCA AGGGACGCTTACCATTCCCGGGACAACCTCGAAGAACAACCTGTCTCCAAATGAGCTCCCT CCGGGACGAGGATACTGCAGTGTACTACTGCGTGACCCGCGCGGGTCCGAGGCGTCTGACATT TGGGGACAGGGCACTATGGTACCCGTGTCGTCGCGGGGAGGGGGTCCGGAGGCGGTGGCAGCG GAGGAGGAGGGTCCGAGATCGTGTGACCCAAATCCCGGCCACCTCTCGCTGAGCCCTGGAGA AAGGGCAACCTTGTCTGTGCGCGGAGCCAGTCCGTGAGCAACTCCCTGGCTGGTACCAGCAG AAGCCCGACAGGCTCCGAGACTTCTGATCTACGACGCTTCGAGCCGGGCCACTGGAATCCCG ACCGCTTTCGGGGTCCGGCTCAGGAACCGATTTCACCCTGACAACTCACGCGCTGGAGCCAGA GGATTCGCGCATCTATTACTGCCAGCAGTTCGGTACTTCTCCGGCTGACTTTCGGAGGGCGG ACGAAGCTCGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGCCACCCACCCCGGCTCTACCATCG</p>
		<p>CCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATAC CCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGCGGGTCT CTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCT TTAAGCAACCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTT CCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCA GCCTACAAGCAGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACG ACGTGGTGGCAAGCGGAGAGGAGCCAGAAATGGCGGGGAGCCGCGAGAAAGAAATCC CCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGT ATGAAAGGGGAACGCAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTAGCAGGACTCAGCACCGCCA CCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCCG</p>
<p>BCMA_EBB-C1979-C1</p>		
<p>BCMA_EBB-C1979-C1 - aa del dominio ScFv</p>	<p>290</p>	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAIYYCARATYKRELRYYYGMDVWGQGTMTVTVSSGGGG SGGGSGGGGSEIVMTQSPGTVSLSPGERATLSRASQSVSSFLAWYQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDSAVYYCQYHSSPSWTFGGQTRLEIK</p>
<p>BCMA_EBB-C1979-C1 - nt del dominio ScFv</p>	<p>291</p>	<p>CAAGTGCAGCTCGTGGAAATCGGGTGGCGGACTGGTGCAGCCGGGGGGCTCACTTAGACTGTCTCT GCGCGGCCAGCGGATTCACCTTCTCCTACGCCATGTCCTGGGTGAGACAGGCCCTGGAAA GGGCCTGGAATGGGTGTCCGCAATCAGCGGCAGCGCGGCTCGACCTATTACGCGGATTCAGTG AAGGGCAGATTACCATTTCCCGGGACAACGCCAAGAACCTCTTGTACCTTCAAAATGAACTCCC TCCGCGCGGAAGATACCGCAATCTACTACTGCGCTCGGGCCACTTACAAGAGGGAACCTGCGCTA CTACTACGGGATGGACGCTCTGGGGCCAGGGAACCATGGTACCCGTCCAGCGGAGGAGGAGGA TCGGGAGGAGCGGTAGCGGGGTGGAGGTCGGAGATCGTGATACCCAGTCCCCCGGCACTG TGTGCTGTCCCCCGGCAACGGGCCACCCGTGTCATGTGCGGGCCAGCCAGTCACTGTCGTCGTAAG CTTCCTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCGGGACAAGCTCCCCGCTGTGATCTACGGAGCCAGC AGCCGGGCCACCGGATTCCTGACCGGTTCCTCCGTTCCGGGTCGGGGACCGACTTTACTCTGA CTATCTCTCGCCTCGAGCCAGAGGACTCCGCGGTGATTACTGCCAGCAGTACCCTCTCTCCC GTCTGGACGTTCCGACAGGGCACAAGGCTGGAGATTAAG</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
BCMA_EBB-C1979-C1 - aa de VH	292	<p><u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAIYYCARATYKRELRYYYGMDVWQGQTMVTVSS</u></p>
BCMA_EBB-C1979-C1 - aa de VL	293	<p><u>EIVMTQSPGTVSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS</u> <u>GSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSWTFGQGRLEIK</u></p>
BCMA_EBB-C1979-C1 - aa del CART completo	294	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAIYYCARATYKRELRY</u> <u>YYGMDVWQGQTMVTVSSGGGGSGGGGGSGGGSEIVMTQSPGTVSLSPGERATLSCRASQSVSSS</u> <u>FLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSP</u> <u>SWTFGQGRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP</u> <u>LAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF</u> <u>SRADAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA</u> <u>EAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQLPPR</u></p>
BCMA_EBB-C1979-C1 - nt del CART completo	295	<p><u>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC</u> <u>AAAGTGCAGCTCGTGGAATCGGGTGGCGGACTGGTGCAGCCGGGGGCTCACTTAGACTGTCCTG</u> <u>CGCGCCAGCGGATTCACCTTCTCCTCCTACGCCATGCTCTGGGTCAGACAGGCCCTGGAAAG</u> <u>GGCCTGGAATGGGTGTCGCAATCAGCGGCAGCGCGGCTCGACCTATTACCGGATTCAGTGA</u> <u>AGGGCAGATTCACCATTTCCCGGACACGCAAGAAGTCTTGTACCTTCAAATGAAGTCCCT</u> <u>CCGCGCGGAAGATACCGCAATCTACTACTGCGCTCGGGCCACTTACAAGAGGGAAGTGCCTAC</u> <u>TACTACGGGATGGAGTCTGGGGCCAGGGAACCATGGTCACCGTGTCCAGCGGAGGAGGAT</u> <u>CGGGAGGAGCGGTAGCGGGGTGGAGGTCGGAGATCGTGATGACCCAGTCCCCGGCACTGT</u> <u>GTCGCTGTCCCCCGGCAACCGGCCACCCTGTGATGTCGGGCCAGCCAGTCAAGTGTGTCAGC</u> <u>TTCTCGCTGGTACCAGCAGAAACCGGGACAAGCTCCCCGCTGCTGATCTACGGAGCCAGCA</u> <u>GCCGGGCCACCGGTATTCTTGACCGGTCTCCGGTTCGGGGTCCGGGACCGACTTACTCTGAC</u> <u>TATCTCTCGCTCGAGCCAGAGACTCCGCGTGTATTACTGCCAGCAGTACCCTCTCCCCG</u> <u>TCCTGGACGTTCCGGACAGGGCACAAGGCTGGAGATTAAGACCCTACCCAGCACCAGGCCAC</u> <u>CCACCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGATGTAGACCCGC</u> <u>AGCTGGTGGGGCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCTCGGATATCTACATTTGGGCCCT</u> <u>CTGGCTGGTACTTGGGGTCTGCTGCTTTTCACTCGTGATCACCTTTTACTGTAAGCGGGTC</u> <u>GGAAAGACTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGCCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGA</u> <u>GGACGGCTGTTATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCCAAGTGCAGGCTGAAATTC</u></p>
		<p><u>AGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAAGTCAATC</u> <u>TTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGG</u> <u>GAAGCCCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCA</u> <u>GAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACCGAGAAGAGGCAAGGCCACGACGACTGT</u> <u>ACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCG</u> <u>TCGG</u></p>
BCMA_EBB-C1978-C7		
BCMA_EBB-C1978-C7 - aa del dominio ScFv	296	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISRDN</u>SKNTLYLQMNLTKAEDTAVYYCARATYKRELRYYYGMDVWQGTTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSEIVLTQSPSTLSLSPGESATLSCRASQSVSTTFLAWYQQKPGQAPRLLIYGSS <u>NRATGIPDRFS</u>SGSGTDFTLTIRRLEPEDFAVYYCQYHSSPSWTFGQGTKVEIK</p>
<p>BCMA_EBB-C1978-C7 - nt del dominio ScFv</p>	297	<p>GAGGTGCAGCTTGTGGAAACCGGTGGCGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTCAGGCTGTCCT GCGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCTCGTACGCCATGTCCTGGTCCGCCAGGCCCGGAAA GGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGAAGCGGAGGTTCCACGTACTACGGGACAGCGTC AAGGGAAGGTTCAAACTCTCCCGGATAATTCGAAGAACACTCTGTACCTTCAAATGAACACCC TGAAGGCCGAGGACACTGCTGTGTACTACTGCGCACGGGCCACCTACAAGAGAGAGCTCCGGTA CTACTACGGAATGGAGCTCTGGGGCCAGGGAACACTACTGTGACCGTGTCTCGGAGGGGGTGGC TCCGGGGGGGGCGGCTCCGGCGGAGGCGGTTCCGAGATTGTGCTGACCCAGTCACTTCAACTC TGTCGCTGTCCCGGGAGAGAGCGCTACTCTGAGCTGCCGGGCCAGCCAGTCCGTGTCCACCAC CTTCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCGGGGCAGGCACCAAGGCTCTTGATCTACGGGTCAAGC AACAGAGCGACCGGAATCCTGACCGCTTCTCGGGGAGCGGTTACGGCACCGACTTCAACCTGA CTATCCGGCGCTGGAACCGAAGATTTCGCGGTGATTACTGTCAACAGTACCCTCCTCGCC GTCTGGACCTTGGCCAAGGAACCAAAGTGGAAATCAAG</p>
<p>BCMA_EBB-C1978-C7 - aa VH</p>	298	<p>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISRDN</u>SKNTLYLQMNLTKAEDTAVYYCARATYKRELRYYYGMDVWQGTTVTVSS</p>
<p>BCMA_EBB-C1978-C7 - aa VL</p>	299	<p>EIVLTQSPSTLSLSPGESATLSCRASQSVSTTFLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSNRATGIPDRFS <u>SGSGTDFTLTIRRLEPEDFAVYYCQYHSSPSWTFGQGTKVEIK</u></p>
<p>BCMA_EBB-C1978-C7 - aa del CART completo</p>	300	<p>MALPVTALLLPIALLLHAARPEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLTKAEDTAVYYCARATYKRELRY <u>YYGMDVWQGTTVTVSSGGGGSGGGGGSEIVLTQSPSTLSLSPGESATLSCRASQSVSTT</u> <u>FLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSNRATGIPDRFS</u>SGSGTDFTLTIRRLEPEDFAVYYCQYHSSP <u>SWTFGQGTKVEIK</u>KTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYKQQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR</p>
<p>BCMA_EBB-C1978-C7 - nt del CART completo</p>	301	

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCG AGGTGCAGCTTGTGAAACCGGTGGCGGACTGGTGCAGCCCGGAGGAAGCCTCAGGCTGTCTG CGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCGTACGCCATGTCTGGGTCCGCCAGGCCCGGAAAG GGCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGAAGCGGAGGTTCCACGTACTACGCCGACAGCGTCA AGGGAAGGTTACAATCTCCCGGATAATTCGAAGAACACTCTGTACCTTCAAATGAACACCCCT GAAGCCGAGGACACTGCTGTGTACTACTGCGCACGGGCCACTACAAGAGAGAGCTCCGGTAC TACTACGGAATGGACGCTCTGGGGCCAGGGAACACTGTGACCGTGTCTCGGGAGGGGTGGCT CCGGGGGGGCGCTCCGGCGGAGGCGGTTCCGAGATTGTCTGACCCAGTCACTTCAACTCT GTCGCTGTCCCGGGAGAGAGCGCTACTCTGAGCTGCCGGCCAGCCAGTCCGTGTCCACCACC TTCTCGCCTGATACAGCAGAAGCCGGGGCAGGCACCACGCTCTTGATCTACGGGTCAAGCA ACAGAGCGACCGGAATTCCTGACCGCTTCTCGGGGAGCGGTTACGGCACCAGTTCACCTGAC TATCCGGCGCCTGGAACCCGAAGATTTCGCCGTGTATTAGTGTCAACAGTACCCTCCTCGCCG TCCTGGACCTTTGGCCAAGGAACCAAGTGGAAATCAAGACCCTACCCAGCACCAGGCGCCAC CCACCCCGCTCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTCGCTCCGGAGCATGTAGACCCCG AGCTGGTGGGGCGTGCATACCCGGGCTTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCT CTGGCTGTTACTGCGGGTCTGTGCTTTCACCTCGTGTACTCTTTACTGTAAAGCGGGT GGAAGAAGCTGTGTACATCTTTAAGCAACCTTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGA GGACGGCTGTTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTCGGAATCGCGGTGAATTC AGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACAGCTCTACAACGAATCAATC TTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTCTGGACAAGCGGAGAGGACCGGACCCAGAAATGGGCGG GAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCA GAAGCC TATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAAGGCCACGACGACTGT</p>
		<p>ACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCC TCGG</p>
BCMA_EBB-C1978-D10		
BCMA_EBB- C1978-D10 - aa del dominio ScFv	302	<p>EVQLVETGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYADSV <u>KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDED</u>TAVYYCARV<u>GKAVPDVWGQTTVT</u>VSSGGGSGGGGSG GGGSDIVMTQTPSSLSASVGRVITTCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYA<u>ASSLSQ</u>SGVPS RFSGSGSDTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYSFQGTRLEIK</p>
BCMA_EBB- C1978-D10- nt del dominio ScFv	303	<p>GAAGTGCAGCTCGTGGAACTGGAGGTGGACTCGTGCAGCCTGGACGGTCCGCTGCGGCTGAGCT GCGCTGCATCCGGCTTCACCTFCGACGATTATGCCATGCAGTGGGTGAGACAGGCGCCAGGGAA GGGACTTGAGTGGGTGTCGGTATCAGCTGGAATAGCGGCTCAATCGGATACGCGGACTCCGTG AAGGGAAGGTTACCAATTTCCCGCGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACTTGCAATGAACAGCC TCCGGATGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCCCGCTCGGAAAAGCTGTGCCCGACGCTCTG GGGCCAGGGAACCACTGTACCGTGTCCAGCGCGGGGGTGGATCGGGCGGTGGAGGTCCGGT GGAGGGGCTCAGATATTGTGATGACCCAGACCCCTCGTCCCTGTCCGCTCGGTCCGGCGACC GCGTGACTATACATGTAGAGCCTCGCAGAGCATCTCCAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAA GCCGGGAAGGCCCGAAGCTCCTGATCTACGCGGCATCATCAGTCAATCGGGAGTGCAGGAG CGGTTTTCCGGTCCGGCTCCGGCACCGACTTACGCTGACCAATTTCTCCCTGCAACCCGAGG ACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCTACTCCACCCCTTACTCTTCCGCCAAGGAACCAG GCTGGAATCAAG</p>
BCMA_EBB- C1978-D10 - aa de VH	304	<p>EVQLVETGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYADSV <u>KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDED</u>TAVYYCARV<u>GKAVPDVWGQTTVT</u>VSS</p>
BCMA_EBB-C1978-D10-aa de VL	305	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>DIVMTQTPSSLSASVGDRVTTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQSYSTPYSFGQGRLEIK</p>
<p>BCMA_EBB- C1978-D10 - aa del CART completo</p>	306	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVETGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARVGKAVPDVW GQGTTVTVSSGGGSGGGGSDIVMTQTPSSLSASVGDRVTTITCRASQSISSYLNWYQOK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQSYSTPYSFGQGR LEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR</p>
<p>BCMA_EBB- C1978-D10 - nt del CART completo</p>	307	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTGCAGCTCGTGAAACTGGAGGTGGACTCGTGCAGCCTGGACGGTCCGCTGCGGCTGAGCTG CGCTGCATCCGGCTTACCTTCGACGATTATGCCATGCACTGGGTCAGACAGGCCCAGGGAAG GGACTTGAGTGGGTGTCCGGTATCAGCTGGAATAGCGGCTCAATCGGATACGCGGACTCCGTGA AGGAAGGTTACCATTTCCCGCACACGCAAGAACTCCCTGACTTGCAAAATGAACAGCCT CCGGATGAGGACACTGCCGTGACTACTGCGCCCGCGTCGGAAAAGCTGTGCCCGACGCTGG GGCCAGGAACCACTGTGACCGTGTCCAGCGCGGGGGTGGATCGGGCGGTGGAGGGTCCGGTG GAGGGGGCTCAGATATTGTGATGACCCAGACCCCTCGTCCCTGTCCGCTCGGTCGGCGACCG CGTGACTATCACATGTAGAGCCTCGCAGAGCATCTCCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAG CCGGGAAGGCCCGAAGCTCCTGATCTACCGGCATCATCACTGCAATCGGGAGTGCAGAGCC GGTTTTCCGGGTCCGGCTCCGGCACCAGACTTCACGCTGACCATTTCTTCCCTGCAACCCGAGGA CTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCTACTCCACCCCTTACTCCTTCGGCCAAAGAACCCAG CTGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCTCCC AGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGG TCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCCTCTGCTGTTACTTGCGGGGTCTCTGCTG CTTTCACTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGC AACCTTCATAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCGGTTCCCAGA GGAGGGAAGGCGGCTGCCAACTGCGCGTGAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTAC AAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGGAGTACGACGTGC TGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAAATGGGGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAATCCCAAGA GGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAA GGGAACGCAGAAAGAGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGG ACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCGCCCTCGG</p>
<p>BCMA_EBB-C1979-C12</p>		
<p>BCMA_EBB-</p>	308	<p>EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCTASGFTFDDYAMHWVRQRPGKGLEWVASINWKGNSLAYGDSV KGRFAISRDNANTVFLQMNSLRTEDTAVYYCASHQGVAYYNYAMDVWGRGTLTVTVSSGGGSG</p>
<p>C 1979-C 12-aa del dominio ScFv</p>		<p>GGGSGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRATQSIGSSFLAWYQQRPGQAPRLLIYGASQR ATGIPDRFSGRSGTDFTLTISRVEPEDSAVYYCQHYESSPSWTFGGQTKVEIK</p>
<p>BCMA_EBB-C1979-C12 - nt del dominio ScFv</p>	309	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>GAAGTGCAGCTCGTGGAGAGCGGGGGAGGATTGGTGCAGCCCGGAAGGTCCCTGCGGCTCTCCT GCACTGCGTCTGGCTTCACCTTCGACGACTACGCGATGCACTGGGTGACAGACAGCCCGGGAAA GGGCCTGGAATGGGTGCGCTCAATCAACTGGAAGGAAACTCCCTGGCCTATGGCGACAGCGTG AAGGGCCGCTTCGCCATTCGCGCGACAACGCCAAGAACACCGTGTTCCTGCAATGAATCCC TCGGACCGAGGATAACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGCCACCAGGGCGTGGCATACTATAACTA CGCCATGGACGTGTGGGAAGAGGGACGCTCGTCACCGTGTCTCCGGGGCGGTGGATCGGGT GGAGGAGGAAGCGGTGGCGGGGACGCGAAATCGTGTGACTCAGAGCCCGGAACTCTTTCAC TGTCCCCGGGAGAACGGGCCACTCTCTCGTGCCGGGCCACCCAGTCCATCGGCTCCTCCTTCC TGCTGTGACCAGCAGAGGCCAGGACAGGCGCCCCGCTGCTGATCTACGGTGTCTCCCAACGC GCCACTGGCATTCTGACCGGTTACGCGGCAGAGGGTCGGGAACCGATTCACACTGACCATTT CCCGGTGGAGCCCAAGATTCGGCAGTCTACTACTGTGACGATTACGAGTCTCCCTTTCATG GACCTTCGGTCAAGGGACCAAGTGGAGATCAAG</p>
BCMA_EBB-C1979-C12 - aa de VH	310	<p><u>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMHWVRQRPKGLEWVASINWKGNLAYGDSV</u> <u>KGRFAISRDNAKNTVFLQMNSLRTEdTAVYYCASHQGVAYYNYAMDVWGRGLTVVSS</u></p>
BCMA_EBB-C1979-C12 - aa VL	311	<p><u>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRATQSIGSSFLAWYQORPQAPRLLIYGASQRATGIPDRFS</u> <u>GRGSGTDFTLTISRVEPEDSAVYYCQHYESSPSWTFGQGTKVEIK</u></p>
BCMA_EBB-C1979-C12 - aa del CART completo	312	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMHWVRQRPK GLEWVASINWKGNLAYGDSVKGRFAISRDNAKNTVFLQMNSLRTEdTAVYYCASHQGVAYYNY <u>AMDVWGRGLTVVSSGGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRATQSIGSSFL</u> <u>AWYQORPQAPRLLIYGASQRATGIPDRFSGRGSGTDFTLTISRVEPEDSAVYYCQHYESSPSW</u> <u>TFGQGTKVEIKTTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYTWAPLA</u> GTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDDGCSCRFPPEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQQNQLYNELNLRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRRGKHGDLGYQLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
BCMA_EBB-C1979-C12 - nt del CART completo	313	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCC AAGTGCAGCTCGTGGAGAGCGGGGAGGATTGGTGCAGCCCGGAAGGTCCCTGCGGCTCTCCTG CACTGCGTCTGGCTTCACCTTCGACGACTACGCGATGCACTGGGTGACAGACAGCCCGGGAAA GGCTGGAATGGGTGCGCTCAATCAACTGGAAGGAAACTCCCTGGCCTATGGCGACAGCGTGA AGGGCCGCTTCGCCATTCGCGCGACAACGCCAAGAACACCGTGTTCCTGCAATGAATCCCCT GCGGACCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGCCACCAGGGCGTGGCATACTATAACTAC GCCATGGACGTGTGGGAAGAGGGACGCTCGTCACCGTGTCTCCGGGGCGGTGGATCGGGTG GAGGAGGAAGCGGTGGCGGGGACGCGAAATCGTGTGACTCAGAGCCCGGAACTCTTTCACT GTCCCCGGGAGAACGGGCCACTCTCTCGTGCCGGGCCACCCAGTCCATCGGCTCCTCCTTCC GCCTGGTACCAGCAGAGGCCAGGACAGGCGCCCGCTGCTGATCTACGGTGTCTCCCAACGGC CCACTGGCATTCTGACCGGTTACGCGGCAGAGGGTCGGGAACCGATTTCACACTGACCATTT CCGGTGGAGCCCGAAGATTCGGCAGTCTACTACTGTGACGATTACGAGTCCCTCCCTTCATGG ACCTTCGGTCAAGGGACCAAGTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGG TGGGGCCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCT GGTACTGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGTACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGA AGCTGCTGTACATCTTAAGCAACCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTATGCCGGTTCACAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAAGTCCGGGTGAAATTCAGCCGC AGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTC GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGGAAGCC GCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCAAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCC TAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAAACGCAAGAGGCAAGGGCCACGACCGACTGTACCAGG GACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCATATGACGGCCCTGCCGCTCGG</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
BCMA_EBB-C1980-G4		
BCMA_EBB-C1980-G4- aa del dominio scFv	314	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST <u>YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVV RDGMDVWGQTTVT</u> VSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPK GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGNGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSPPRFTFGP GTKVDIK</p>
BCMA_EBB-C1980-G4-nt del dominio scFv	315	<p>GAGGTGCAGTTGGTCGAAAGCGGGGGGGCTTGTGCAGCCTGGCGGATCACTGCGGCTGTCT</p>
		<p>CGCGGCATCAGGCTTCACGTTTTCTTCTACGCCATGTCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGAAA GGGACTGGAATGGGTGTCCGCGATTTCCGGGTCGGGCGGAGCACCTACTACGCGGATCCGTTG AAGGGCCGCTTCACTATCTCGCGGACAACTCCAAGAACACCCTCTACCTCAAAATGAATAGCC TCCGGGCGGAGGATACCGCCGTCTACTATTGCGCTAAGGTCTGCGCGACGGAATGGACGTGTG GGGACAGGGTACCACCGTGACAGTGTCTCGGGGGGAGCGGTAGCGGCGGAGGAGGAAGCGGT GGTGGAGGTTCCGAGATTGTGCTGACTCAATCACCCGCGACCCCTGAGCCTGTCCCCCGCGAAA GGGCCACTCTGTCTGTGCGGGCCAGCCAATCAGTCTCCTCCTCGTACCTGGCCTGGTACCAGCA GAAGCCAGGACAGGCTCCGAGACTCCTTATCTATGGCGCATCCTCCCGGCCACCGGAATCCCG GATAGGTTCTCGGAAACGGATCGGGGACCGACTTCACTCTCACCATCTCCCGGCTGGAACCGG AGGACTTCGCGGTGTACTACTGCCAGCAGTACGGCAGCCCGCCTAGATTCACTTTCGGCCCCGG CACCAAAGTGGACATCAAG</p>
BCMA_EBB-C1980-G4- aa de VH	316	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVV RDGMDVWGQTTVTVSS</u></p>
BCMA_EBB-C1980-G4- aa de VL	317	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPKGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GNGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSPPRFTFGPGTKVDIK</p>
BCMA_EBB-C1980-G4- aa del CART completo	318	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKVV RDGMDVWGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQKPKGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGNGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQOYGSPPRFTFGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEE DGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATK DTYDALHMQUALPPR</p>
BCMA_EBB-C1980-G4- nt del CART completo	319	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCG AGGTGCAGTTGGTFCGAAAACGGGGGGGGCTTGTGCAGCCTGGCGGATCACTGCGGCTGTCTG CGCGGCATCAGGCTTCACGTTTTCTTCTACGCCATGTCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGAAAAG GGACTGGAATGGGTGTCCGCGATTTCCGGGTCCGGCGGGAGCACCTACTACGCCGATTCCGTGA AGGGCCGCTTACTATCTCGCGGGACAACCTCCAAGAACACCCCTTACCTCCAAATGAATAGCCT GCGGGCCGAGGATACCGCCGTCTACTATTGCGCTAAGTCTGTCGCGACGGAATGGACGTGTGG GGACAGGGTACCACCGTGACAGTGTCTCGGGGGAGGCGGTAGCGCGGAGGAGGAAGCGGTG GTGGAGGTTCGAGATTGTGTGACTCAATCACCCGCGACCTGAGCCTGTCCCCCGCGAAAAG GGCCACTCTGTCTGTGCGGCCAGCCAATCAGTCTCTCTCTGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAG AAGCCAGGACAGGCTCCGAGACTCCTTATCTATGCGCATCTCCCGCGCCACCGGAATCCCGG ATAGGTTCTCGGAAACGGATCGGGACCGACTTCACTCTCACCATCTCCCGGCTGGAACCGGA GGACTTCGCGGTGTACTACTGCCAGCAGTACGGCAGCCCGCTTAGATTCACTTTCCGGCCCGGC ACCAAAGTGGACATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCG CCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCGACTGGTGGGGCCGTGCATAC CCGGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGTG CTGCTGCTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCT TTAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGCAGGCTGTTTCATGCGGTT CCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTCCA GCCTACAGCAGGGGACAGAACAGCTCTACAACTCAATCTTGGTCCGAGAGGAGGAGTACG ACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGAAAGCCGCGCAGAAAGAAATCC CCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGT ATGAAAGGGGAACGAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCA CCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
BCMA_EBB-C1980-D2		
BCMA_EBB-C1980-D2- aa del dominio scFv	320	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSV <u>KGRFTISRDN</u>SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKIPQTGTFDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPSWTFGQTRLEIK</p>
BCMA_EBB-C1980-D2- nt del dominio ScFv	321	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGCGGTGGATTGGTGCAACCGGGGGATCGCTCAGACTGTCCCT GTGCGCGCTCAGGCTTACCTTCTCGAGCTACGCCATGTTCATGGGTGACAGGCCCTGGAAA GGTCTGGAATGGGTGTCCGCCATTTCCGGGAGCGGGGATCTACATACTACCCGATAGCGTG AAGGGCCGCTTACCAATTTCCCGGGACAACCTCAAGAACACTCTCTATCTGCAATGAATCCC TCCGCGCTGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCCAAAATCCCTCAGACCGGCACCTTCGACTA CTGGGGACAGGGGACTGTGTCACCGTCAGCAGCGGTGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGAGGAAGC GCGGGCGGAGGGTCCGAGATTGTGCTGACCCAGTCAACCGGCACITTTGTCCCTGTCCCTGGAG AAAGGGCCACCTTTCTGCGCGGCATCCCAAATCCGTGTCTCTCTGCTACCTGGCCTGGTACCA</p>
		<p>GCAGAGGCCCGACAGGCCCCACGGCTTCTGATCTACGGAGCAAGCAGCCGCGGACCGGTATC CCGGACCGGTTTTCCGGCTCGGGCTCAGGAACTGACTTACCCTCACCATCTCCCGCCTGGAAC CCGAAGATTTGCTGTGTATTACTGCCAGCACTACGGCAGCTCCCGTCTTGGACGTTCCGGCCA GGAACCTCGGCTGGAGATCAAG</p>
BCMA_EBB- C1980-D2- aa de VH	322	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSV <u>KGRFTISRDN</u>SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKIPQTGTFDYWGQGTILVTVSS</p>
BCMA_EBB- C1980-D2- aa de VL	323	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPSWTFGQTRLEIK</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
BCMA_EBB-C1980-D2- aa del CART completo	324	<p>MALPVTALLPLALLHARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKIPQTGFDY WQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQVSSSYLAWYQ QRPQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPSWTFGQ GTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEGGCELRVKFSRSADA PAYKQGNQLYNELNLRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR</p>
BCMA_EBB-C1980-D2- nt del CART completo	325	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCGCTCGGCCG AAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGCGGTGGATTGGTGCAACCGGGGGATCGCTCAGACTGCTCTG TCGCGCTCAGGCTTACCTTCTCGAGCTAGCCATGTCTATGGGTGAGACAGGCCCTGGAAAG GGTCGGAAATGGGTGTCCGCCATTTCCGGGAGCGGGGATCTACATACACGCGGATAGCGTGA AGGGCCGCTTACCATTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACTCTCTATCTGCAAAATGAACTCCCT CCGCGCTGAGGACACTGCCGTGACTACTGCGCAAAAATCCCTCAGACCGGCACCTTCGACTAC TGGGACAGGGGACTCTGGTCAACCGTCAAGCAGCGGTGGCGGAGGTTCGGGGGAGGAGGAAGCG GCGGGGAGGGTCCGAGATTGTGTGACCCAGTCAACCGGCACCTTTGTCCCTGTGCGCTGGAGA AAGGGCCACCTTTCCGCGGGCATCCCAATCCGTGTCTCTCGTACCTGGCTGGTACCAG CAGAGGCCCGGACAGGCCCCACGGCTTCTGATCTACGGAGCAAGCAGCCGCGCAGCGGTATCC CGGACCGGTTTTCCGGGCTCGGGCTCAGGAACTGACTTACCCCTACCATCTCCCGCTGGAACC CGAAGATTTCCGTGTGATTACTGCCAGCACTACGGCAGCTCCCCGCTCTGGACGTTCCGGCCAG GAACTCCGCTGGAGATCAAGACCACTACCCAGCAGCAGGCGCCACCCCGCTCCCTACCA TCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCAATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCGGTGCA TACCCGGGCTCTGACTTCCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGCGG GTCCTGTGCTTTCACGCTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACA TCTTAAGCAACCTTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCG GTTCCCAGAGGAGGAGGAAGGGCGCTGCGAATGCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCAGATGCT CCAGCTTACAAGCAGGGGACAGAACAGCTCTACAACGAATCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGT ACGACGTCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGGAAGCCCGCAGAAAGAA TCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAACCTATAGCCAGATT GGTATGAAAGGGGAACGAGAAAGAGGCAAAGGCCACGACGACTGTACCAGGACTCAGCACCC CCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCGCGCTCGG</p>
BCMA_EBB-C1978-A10		
BCMA_EBB- C1978-A10- aa del dominio ScFv	326	<p>EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGST <u>YYADSVKGRFTMSRENDKNSVFLQMNSLRVEDTGVYYCARANYKRELRYYYGMDVW</u> <u>GQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGSEIVMTQSPGTLSPGESATLSCRASQVVASNYL</u> <u>AWYQHKGQAPSLISGASSRATGVPDRFSGSGSGTDFLTAISRLEPEDSAVYYCQHYDS</u> <u>SPSWTFGQGTKVEIK</u></p>
BCMA_EBB- C1978-A10- nt del dominio ScFv	327	<p>GAAGTGCAACTGGTGGAAACCGGTGGAGGACTCGTGCAGCCTGGCGGAGCCTCCGGCTGAGCT GCGCCGCTTCGGGATTCACCTTTTCCCTCCTACGCGATGCTTGGGTGAGACAGGCCCCCGGAAA GGGGCTGGAATGGGTGTACGCCATCTCCGGCTCCGGCGGATCAACGTACTACGCGGACTCCGTG AAAGCCCGTTACCATGTGCGCGGAGAAATGACAAGAATCCGTGTTCCGTGCAAAATGAACTCCC TGAGGTGGAGGACACCGGAGTGTACTATTGTGCGCGCGCAACTACAAGAGAGAGCTGCGGTA CTACTACGGAATGGACGTCTGGGGACAGGAACTATGGTGACCGTGTCTATCCGGTGGAGGGGA AGCGGCGGTGGAGGACAGCGGGGCGGGGTTTCAGAAATGTCATGACCCAGTCCCGGGAACTC TTCCCTCTCCCCGGGAAATCCCGCACTTTGTCTGCGGGCCAGCCAGCGCGTGGCCCTCGAA CTACCTCGCATGTTACCGGATAAGCCAGGCCAAGCCCTTCCCTGCTGATTTCCGGGCTAGC AGCCGCGCACTGGCGTCCCGATAGGTCTTCGGGAAGCGGCTCGGGTACCGATTTACCCCTGG CAATCTCGCGGCTGGAACCGGAGGATTCGGCGGTACTACTGCCAGCACTATGACTCATCCCC CTCTGGACATTCGGACAGGCCACCAAGGTGAGATCAAG</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
BCMA_EBB- C1978-A10-aa de VH	328	<p>EVQIVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTMSRENDKNSVFLQMNSLRVEDTGVYYCARANYKRELRYYGMDVWGQGTMTVSS</u></p>
BCMA_EBB-C1978-A10-aa de VL	329	<p>EIVMTQSPGTLSPGESATLSCRASQRVASNYLAWYQHKPGQAPSLISGASSRATGVPDRFS GSGSGTDFTLAISRLEPEDSAVYYCQHYDSSPSWTFGQGTKEIK</p>
BCMA_EBB-C1978-A10-aa del CART completo	330	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPEVQIVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTMSRENDKNSVFLQMNSLRVEDTGVY YCARANYKRELRYYGMDVWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGSEIVMTQSPGTL SLSPGESATLSCRASQRVASNYLAWYQHKPGQAPSLISGASSRATGVPDRFSGSGSGTDF TLAISRLEPEDSAVYYCQHYDSSPSWTFGQGTKEIKTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSRPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLQYLNELNLRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
BCMA_EBB-C1978-A10-nt del CART completo	331	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCG AAGTGCAACTGGTGGAAACCGGTGGAGGACTCGTGCGAGCCTGGCGGCAGCCTCCGGCTGAGCTG CGCCGCTTCGGGATTCACCTTTTCCTCCTACGCGATGTCTTGGGTGACACAGGCCCGGAAAG GGGCTGGAATGGGTGTACGCACTCCTCCGGCTCCGGCGGATCAACGTACTACGCCGACTCCGTGA AAGCCCGGTTACCATGTGCGCGAGAAATGACAAGAATCCGTGTCTCTGCAAAATGAACTCCCT GAGGGTGGAGGACACCGGAGTGTACTATTGTGCGCGCGCAACTACAAGAGAGAGCTGGGGTAC TACTACGGAATGACGCTGCGGGACAGGGAATATGGTGACCGTGTATCCGGTGGAGGGGAA GCGCGGTGGAGGACGCGGGGGCGGGGTTAGAAATTTGTCATGACCCAGTCCCGGGAACTCT TTCCCTCTCCCGGGGAATCCGCGACTTTGTCTGCGCGGCAGCCAGCGCGTGGCCTCGAAC TACCTCGCATGGTACCAGCATAAGCCAGGCCAAGCCCTTCCCTGCTGATTTCCGGGGCTAGCA GCCGCGCACTGGCGTGCCGATAGGTTCTCGGAAGCGGCTCGGGTACCAGATTACCCCTGGC AATCTCGCGGTGGAACCGGAGGATTCGGCCGTGTACTACTGCCAGCACTATGACTCATCCCC TCCTGGACATTCGGACAGGGCACCAAGGTCGAGATCAAGACCACATCCCGAGCACCAGGCCAC CCACCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGATGTAGACCCG AGCTGGTGGGGCGTGCATACCCGGGCTCTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCT CTGGCTGGTACTTGGGGTCTCTGCTGCTTTTACTCGTGATCACCTTTTACTGTAAGCGCGGTC GGAAGAAGTGTGTACATCTTTAAGCAACCTTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGA GGACGGCTGTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAAGTGCAGCTGAAATTC AGCCGACAGCGAGATGTCCAGCCTACAAGCAGGGGACAGCAACAGCTCTACAACGAATCAATC TTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGG GAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCCGTGTAACAGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCA GAAGCCATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGT ACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCG TCGG</p>
BCMA_EBB-C1978-D4		
BCMA_EBB-C1978-D4 - aa del dominio scFv	332	<p>EVQILETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKALVGGATGAFDIWGQGLVTVSSGGGGSGGG</u> GSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLSSNFLAWYQKPGQAPGLLIYGNASNWT GTPDRFSGSGSGTDFTLITRLEPEDFAVYYCQYYGTSPMYTFGQGTKEIK</p>

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
BCMA_EBB-C1978-D4- nt del dominio ScFv	333	<p>GAAGTGCAGCTGCTCGAAACCGGTGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCCCTGAGGCTTTCAT GCGCCGCTAGCGGATTTCTCTTCTCTTACGCCATGTCGTGGGTCCGCCAAGCCCCTGAAAA AGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATTTCCGGGAGCGGAGGTTCCGACCTATTACCCGACTCCGTG AAGGGCCGCTTTACCATCTCCCGGATAACTCCAAGAACACTCTGTACCTCCAAATGAACTCGC TGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCGAAGGCCTGGTCCGCGCGACTGGGGCATT CGACATCTGGGGACAGGGAACCTCTTGTGACCGTGTGAGCGGAGGCGGGCTCCGGCGGAGGA GGGAGCGGGGGCGGTGTTCCGAAATCGTGTGACTCAGTCCCGGAAACCTGAGCTTGTAC CCGGGGAGCGGGCCACTCTCTCTGTGCGGCTCCCAATCGCTCTCATCCAATTTCTGGCCTG GTACCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCGGGCTGCTCATCTACGGCGCTTCAAATGGCAACG GGAACCCCTGATCGGTTACGCGGAAGCGGATCGGGTACTGACTTTACCCTGACCATCACCAGAC TGAACCGGAGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGTACTACGGCACCTCCCCATGTACACATT CGGACAGGGTACCAAGGTCGAGATTAAG</p>
BCMA_EBB-C1978-D4- aa de VH	334	<p><u>EVQLLETGGGLVQPGGSLRLS</u><u>CAASGFSFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSV</u> <u>KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR</u><u>AEDTAVYYCAKALV</u><u>GATGAFDIWGQGLVTVSS</u></p>
BCMA_EBB-C1978-D4- aa de VL	335	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSC<u>RASQSLSSNFLAWYQQKPGQAPGLLIYGASN</u><u>WATGTPDRFS</u></p>
		<p>SGSGTDFTLTIIRLEPEDFAVYYC<u>QYYGTS</u>PMYTFGQGTKVEIK</p>
BCMA_EBB-C1978-D4- aa del CART completo	336	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLLETGGGLVQPGGSLRLS<u>CAASGFSFSSYAMSWVRQAPGK</u> LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR<u>AEDTAVYYCAKALV</u><u>GATGAF</u> DIWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSEIIVLTQSPGTLSPGERATLSC<u>RASQSLSSNFLAW</u> YQQKPGQAPGLLIYGASN<u>WATGTPDRFS</u>SGSGTDFTLTIIRLEPEDFAVYYC<u>QYYGTS</u>PMYTF GQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVTILYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYKQGQNLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
BCMA_EBB-C1978-D4- nt del CART completo	337	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCG AAGTGCAGCTGCTCGAAACCGGTGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGGGCTCCCTGAGGCTTTCATG CGCCGCTAGCGGATTCTCCTTCTCCTCTTACGCCATGTCGTGGGTCCGCCAAGCCCTGGAAAA GGCTTGAATGGGTGTCCGCGATTTCCGGGAGCGGAGGTTTCGACCTATTACGCCGACTCCGTGA AGGGCCGCTTTACCATCTCCCGGGATAACTCCAAGAACACTCTGTACCTCCAAATGAACCTCGCT GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCGAAGGCGCTGGTCCGCCGACTGGGGCATTG GACATCTGGGGACAGGGAACCTTTGTGACCGTGTGAGCGGAGGGCGGGCTCCGGCGGAGGAG GGAGCGGGGGCGGTGGTTCCGAAATCGTGTGACTCAGTCCCGGGAACCCCTGAGCTTGTACCC CCGGGAGCGGGCCACTCTCTCTGTGCGCCCTCCCAATCGCTCTCATCCAATTTCTGGCCCTGG TACCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCGGGCCCTGCTCATCTACGGGCTTCAAACCTGGGCAACGG GAACCCCTGATCGGTTACGCGGAAGCGGATCGGGTACTGACTTTACCCTGACCATCACCAGACT GGAACCGGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGTACTACGGCACCTCCCCCATGTACACATTG GGACAGGGTACCAAGGTCGAGATTAAGACCACTACCCAGCACCCAGGCCACCCACCCCGGCTC CTACCA TCGCCTCCCGACCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCACTGTAGACCGACTGGTGGGGC CGTGCA TACCCGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACT TCGGGGTCCTGCTGCTTCTACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGGAAGAAGCTGC TGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTG ATGCCGTTTCCAGAGGAGGAGGAGGAGGCGGCTGCGAAGTCCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCA GATGCTCCAGCTTACAAGCAGGGGCGAACCAGCTTACACGAACCTCAATCTTGGTCCGAGAG AGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACCGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCCGCGC AAAGAA TCCCCAAGAGGGCTGTACACAGCTTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAGCCATAGC GAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACTGTACCAGGGACTCA GCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
BCMA_EBB-C1980-A2		
BCMA_EBB-C1980-A2 - aa del dominio scFv	338	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLWFEGEFDPWGQGLVTVSSGGGSGGGGSG GGGSDIVLTQSPSLPVTPEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGNSRA SGVPRDFSGSGSDTFLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGGGTKVDIK</p>
BCMA_EBB-C1980-A2- nt del dominio ScFv	339	<p>GAAGTGCAGCTGCTTGAGAGCGGTGGAGGCTGGTGCAGCCCGGGGATCACTGCGCCTGTCCCT GTGCCGCTCCGGTTTCACTTTCTCCTCGTACCCATGTCGTGGGTGACAGCCAGCCGGGAAA GGGACTGGAATGGGTGTCAGCCATTTCCGGTTCCGGGGGCGAGCACTACTACGCTCCGTG AAGGGCCGGTTACCATTTCCTCCGACAACTCCAAGAACACCTTGTACCTCCAAATGAACCTCC TCGGGCCGAAGATACCGCGTGTATTACTGCGTGTGTGGTTCGGAGAGGGATTCGACCCGTG GGGACAAGGAACACTCGTACTGTGTATCCGGCGGAGGCGGAGCGGTGGCGGGGTTCCGGC GCGGGCGGATCGACATCGTGTGTGACCCAGTCCCTCTGAGCCTGCCGCTACTCCTGGCGAAC CAGCCAGCATCTCCTGCCGTCGAGCCAGTCCCTCCTGCACTCCAATGGGTACAACACTCCTCGA TTGGTACTGCAAAAGCCGGCCAGAGCCCGAGCTGCTGATCTACTTTGGGTCAAACCGCGCT TCCGGGTGCTGATAGATTCTCCGGTCCGGGAGCGGAACCCACTTTACCCTGAAAATCTCGA GGGTGGAGCCGAGGACGTCCGAGTACTACTGCAATGCAGGCGCTCCAGACTCCCTGACCTT CGGAGGAGAACGAAGTCCGACATCAAGA</p>
BCMA_EBB-C1980-A2- aa de VH	340	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLWFEGEFDPWGQGLVTVSS</p>
BCMA_EBB-C1980-A2- aa de VL	341	<p>DIVLTQSPSLPVTPEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGNSRASGVP DRFSGSGSDTFLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGGGTKVDIK</p>
BCMA_EBB-C1980-A2- aa del CART completo	342	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>MALPVTALLLPALLLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCWLWFGEGFDPW GQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIVLTQSPSLPVPTEPASI SCRSSQSLLSNGYNYLD WYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDRFSGSGSDFTLTKISRVAEDVGVVYCMQALQTPITF GGGKVDIKTTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVIITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS</p>
		<p>EIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
<p>BCMA_EBB-C1980-A2- nt del CART completo</p>	<p>343</p>	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTGCAGCTGCTTGAGAGCGGTGGAGGTC TGGTGCAGCCCGGGGATCACTGCGCCTGCTCTG TGCCGCTCCGGTTTCACTTCTCCTCGTACGCCATGTCGTGGGTGACACAGGCACCGGAAAG GGACTGGAATGGGTGTGAGCCATTTCCGGTTCGGGGGACAGCACCTACTACGCTGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATTTCCCGCGACAACCTCAAGAACACCTTGTAACCTCAAATGAACTCCCT CGGGCCGAAGATACCGCCGTGATTACTGCGTGTGTGGTTCGGAGAGGGATTGACCCGTTG GGACAAGAACACTCGTACTGTGTCATCCGGCGGAGCGGCAGCGGTGGCGGGTTCGGCG GCGGCGGATCTGACATCGTGTGACCCAGTCCCTCTGAGCCTGCCGGTCACTCCTGGCGAACC AGCCAGCATCTCCTGCCGTCGAGCCAGTCCCTCCTGCACTCAAATGGGTACAACACTACCTCGAT TGGTATCTGCAAAAAGCCGGGCGAGAGCCCCAGCTGCTGATCTACCTTGGGTCAAACCGCGCTT CCGGGTGCCTGATAGATTTCCGGGTCCGGGAGCGGAACCGACTTACCTGAAAATCTCGAG GGTGGAGGCGGAGGACGTGGAGTGTACTACTGCATGCAGGCGCTCCAGACTCCCTGACCTTC GGAGGGAACGAAGGTCGACATCAAGACCCTACCCAGCACCCAGGCGCCACCCCGGCTC CTACCA TCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGACGCTGGTGGGGC CGTGCA TACCGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACT TGCGGGTCCGCTGCTTTACTCGTATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGC TGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTT ATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCA GATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAGCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCCGAGAG AGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGCAGGACCCAGAAATGGCGGGAAGCCGCGCAG AAAGAA TCCCAAGAGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGC GAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCA GCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
<p>BCMA_EBB-C1981-C3</p>		
<p>BCMA_EBB-C1981-C3 - aa del dominio scFv</p>	<p>344</p>	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVGYSYDSSGYRDIYGMVWVQGTITVTVSSGG GGSGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY TSSRATGISDRFSGSGSDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQHYGNSPPKFTFGPGTKLEIK</p>
<p>BCMA_EBB-C1981-C3- nt del dominio ScFv</p>	<p>345</p>	

ES 2 948 133 T3

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>CAAGTGCAGCTCGTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCCGGGGGCTCCCTGAGACTTTCCT GCGCGGCATCGGGTTTTACCTTCTCCTCCTATGCTATGTCCTGGGTGCGCCAGGCCCGGGAAA GGGACTGGAATGGGTGTCCGAATCAGCGGTAGCGGGGCTCAACATACTACGCCGACTCCGTC AAGGGTCGCTTCACTATTTCCCGGGACAACCCAAGAATACCCTGTACCTCCAAATGAACAGCC TCAGGGCCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCAAAGTCGGATACGATAGCTCCGGTTACTA CCGGGACTACTACGAATGGACGTGTGGGGACAGGCACCACCGTGACCGTGTCAAGCGCGGA GCGGGTTCAGGAGGGGAGGCTCCGCGGTGGAGGGTCCGAAATCGTCTGACTCAGTCGCGCTG GCACTCTGTCGTTGTCCCCGGGGAGCGCGTACCCTGTCTGTGTCGGGCGTCGAGTCCGTGTC GAGTCTTACCTCGCGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCTTAGACTTCTGATCTACGGC ACTTCTTACCGCGCCACCGGGATCAGCGACAGGTTACAGCGGCTCCGGTCCGGGACCGACTTCA CCCTGACCATTAGCCGGCTGGAGCCTGAAGATTTCCCGGTGTATTACTGCCAACACTACGGAAA CTGCGCCGCAAAGTTCACGTTCCGGACCCGGAACCAAGCTGGAATCAAG</p>
BCMA_EBB-C1981-C3- aa de VH	346	<p><u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGSTYYADSV</u> <u>KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVG YDSSGYR DY YGMDVWQG GTTVTVSS</u></p>
BCMA_EBB-C1981-C3- aa de VL	347	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSSRATGISDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSPPKFTFGPGTKLEIK</p>
BCMA_EBB-C1981-C3- aa del CART completo	348	<p>MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVG YDSSGY <u>RDYYGMDVWQG GTTVTVSSGGGGSGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS</u> <u>SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSSRATGISDRFSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGN</u> <u>SPPKFTFGPGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI</u> WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTQEEDGCSRFPPEEEGGCELR VKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMGERRRGGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR</p>
BCMA_EBB-	349	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCC</p>
C1981-C3- nt del CART completo		

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>AAGTGCAGCTCGTGGAGTCAGGCGGAGGACTGGTGCAGCCCGGGGGCTCCCTGAGACTTTCCTG CGGGCATCGGGTTTTACCTTCTCCTCCTATGCTATGTCCTGGGTGCGCCAGGCCCGGGAAAG GGACTGGAATGGGTGTCCGCAATCAGCGGTAGCGGGGGCTCAACATACTACGCCGACTCCGTCA AGGGTCGTTCACTATTTCCCGGGACAACCTCAAGAATACCTGTACCTCCAAATGAACAGCCT CAGGGCCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCAAAGTCGGATACGATAGCTCCGGTTACTAC CGGGACTACTACGGAATGGACGTGTGGGGACAGGGCACCACCTGACCGTGTCAAGCGCGGAG GCGGTTCAGGAGGGGGAGGCTCCGGCGGTGGAGGGTCCGAAATCGTCTGACTCAGTCGCTGG CACTCTGTCGTTGTCCCGGGGGAGCGCGCTACCTGTGTCGTGTCGGGCGTCCGAGTCCGTGTCG AGTCTCTACCTCGCGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCTTAGACTTCTGATCTACGGCA TTCTTTCAGCGCCACCAGGATCAGCGACAGGTTACAGCGGCTCCGGCTCCGGGACCGACTTCC CTTGACCATTAGCCGGTGGAGCCTGAAGATTTCCGCGTGTATTACTGCCAACACTACGGAAAC TCGCCCGCAAAGTTCAGTTCGGACCCGGAACCAAGCTGGAAATCAAGACCCTACCCCGAGCAC CGAGGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCGATG TAGACCCGACGTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGATATCTACATT TGGGCCCTCTGGCTGTACTTGGCGGGTCTCTGCTTTTACTCGTGTACTCTTTACTGTA AGCGCGTCCGGAAGAAGCTGTGTACATCTTAAGCAACCTTTCATGAGGCTGTGCAGACTAC TCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCGGTTCCAGAGGAGGAGGAGGAGGCGCTGCGAACTGCGG GTGAAATTCAGCCGACGCGAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG AACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGTGGACAAGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAG AATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGAT AAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAGCAGCAGAGGAGGAAAGGCCACG ACGGACTGTACCAGGACTCAGCACCCGCCCAAGACACCTATGACGCTTCTCATATGCAGGC CCTGCCGCTCCG</p>
BCMA_EBB-C1978-G4		
BCMA_EBB-C1978-G4 - aa del dominio scFv	350	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMGWSSGYLGAFDIWGQGTITVTVSSGGGSG</u> <u>GGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVASSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASGR</u> <u>ATGIPDRFSGSGSTDFLTISRLEPEDFAVYYCQHYGGSPRLTFGGGTKVDIK</u></p>
BCMA_EBB-C1978-G4- nt del dominio ScFv	351	<p>GAAGTCCAAC TGGTGGAGTCCGGGGAGGGCTCGTGCAGCCCGGAGGCAGCCTTCGGCTGTCTG GCGCCGCTCCGGGTTACGTTCTCATCTACCGATGTCGTGGGTGAGCAGGCACCAGGAAA GGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATTAGCGGCTCCGGCGGTAGCACCTACTATGCCGACTCAGTG AAGGGAAGGTTCACTATCTCCCGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTCCAAATGAACCTC TCGGGCCGAGGATACCGCGTGTACTATTGCGCCAAGATGGGTGGTCCAGCGGATACTTGGG AGCCTTCGACATTTGGGGACAGGGCACTACTGTGACCGTGTCTCCGGGGTGGCGGATCGGGA GCGGGCGGCTCGGGTGGAGGGGTTCCGAAATCGTGTGACCCAGTACCAGGAAACCTCTCGC TGCCCCGGGAGAACGGGCTACACTGTATGTAGAGCGTCCCAGTCCGTTGGCTTCTCGTTCCT GGCTTGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGGCACCCGCTGTCTATCTACGGAGCCAGCGCCCGG GCGACCGGATCCCTGACCGCTTCTCCGGTTCGGGCTCCGGCACCAGCTTACTCTGACCATTA GCAGGCTTGAGCCCGAGGATTTGCCGTGTACTACTGCCAACACTACGGGGGAGCCCTCGCCT GACCTTCGGAGGCGGAACAAAGGTCGATATCAAAA</p>
BCMA_EBB-C1978-G4- aa de VH	352	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV <u>KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMGWSSGYLGAFDIWGQGTITVTVSS</u></p>
BCMA_EBB-C1978-G4- aa de VL	353	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVASSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASGRATGIPDRFS <u>SGSGSTDFLTISRLEPEDFAVYYCQHYGGSPRLTFGGGTKVDIK</u></p>
BCMA_EBB-C1978-G4- aa del CART completo	354	

Nombre/Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
		<p>MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKMGWSSGYLG AFDIWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVASSFL AWYQQKPGQAPRLLIYGASGRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGGSPRL TFGGGTVDIKITTPAPRPTTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGDCSRFPPEEEGGCELRVKFSR SADAPAYKQQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRKPNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMGERRRGKGHDLGQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
BCMA_EBB-C1978-G4- nt del CART completo	355	<p>ATGGCCCTCCCTGTACCCGCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCCG AAGTCCAAGTGGAGTCCGGGGAGGGCTCGTGCAGCCCGAGGCAGCCTTCGGCTGTCGTG CGCCGCTCCGGGTTACGTTCTCATCTACGCGATGTCGTGGGTGAGACAGGCACCAGGAAAG GGACTGGAATGGGTGTCGCCATTAGCGGCTCCGGCGGTAGCACCTACTATGCCGACTCAGTGA AGGGAAGTTCACTATCTCCCGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTCCAAATGAACCTCTCT GCGGGCCGAGGATACCGCGGTGACTATTGCGCAAGATGGGTTGGTCCAGCGGATACCTGGGA GCCTTCGACATTGGGGACAGGGCACTACTGTGACCGTGTCTCCGGGGTGGCGGATCGGGAG GCGGCGGCTCGGGTGGAGGGGGTCCGAAATCGTGTGACCCAGTACCCGGGAACCTCTCGCT</p>
		<p>GTCCCCGGGAGAACGGGCTACACTGTCATGTAGAGCGTCCAGTCCGTTGGCTTCTCGTTCTCG GCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGGCACCCCGCTGCTCATCTACGGAGCCAGCGCCGGG CGACCGGCATCCCTGACCGCTTCTCCGGTTCGGGTCGGGACCGACTTTACTCTGACATTAG CAGGCTTGAGCCCGAGGATTTGCCGTGTAAGTACTGCAACACTACGGGGGAGCCCTCGCCTG ACCTTCGGAGGCGGAACAAAGTGCATATCAAAACCCTACCCAGCAGCCAGGCCACCCACCC CGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCCGAGCTGG TGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCT GGTACTTGCGGGTCCGTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTCGGAAGA AGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGG CTGTTCATGCCGTTCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAAGTGCAGGTAAGTTCAGCCG AGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG GCGCAGAAAGAAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCC TATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAGGGCCAGCAGGACTGTACCAGG GACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCTTCCGCTCGGCTCGG</p>

EJEMPLOS

- 5 La invención se describe adicionalmente en más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan a efectos únicamente ilustrativos, y no se pretende que sean limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por tanto, la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a los siguientes ejemplos.
- 10 Ejemplo 1: Optimización de la producción de CART con citocinas exógenas

Las citocinas tienen funciones importantes relacionadas con la expansión, diferenciación, supervivencia y homeostasis de los linfocitos T. Una de las familias de citocinas más importantes para uso clínico es la familia de citocinas de cadena y común (γ_c), que incluye interleucina (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (Liao *et al.*, 2013, *Immunity*, 38:13-25). La IL-2 se ha estudiado ampliamente como un agente inmunoterápico para el cáncer. El complemento de IL-2 potenció la capacidad antitumoral de los linfocitos CAR-T anti-CD19 en los ensayos clínicos (Xu *et al.*, 2013, *Lymphoma*, 54:255-60). Sin embargo, la administración de IL-2 está limitada por los efectos secundarios y la propensión a la expansión de los linfocitos T reguladores y el efecto de la muerte celular inducida por activación (AICD, por sus siglas en inglés) (Malek *et al.*, 2010, *Immunity*, 33:153-65; y Lenardo *et al.*, 1999, *Annu Rev Immunol*, 17:221-53). IL-7, IL-15 e IL-21 pueden potenciar cada una la eficacia de las inmunoterapias adoptivas y parecen ser menos tóxicas en comparación con IL-2 (Alves *et al.*, 2007, *Immunol Lett*, 108:113-20). A pesar de los extensos estudios preclínicos y clínicos sobre la función de las citocinas anteriores, faltan estudios comparativos multiparamétricos sobre las funciones de varias citocinas γ_c exógenas en la terapia adoptiva con linfocitos CAR-T.

Además de las citocinas de cadena γ , IL-18 es otra citocina inmunoestimuladora que regula las respuestas inmunitarias, lo que aumenta la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T y aumenta la actividad citolítica de los CTL (Srivastava *et al.*, 2010, *Curr Med Chem*, 17:3353-7). La administración de IL-18 es segura y bien tolerada, incluso cuando la dosis alcanza los 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Robertson *et al.*, 2006, *Clin Cancer Res*, 12:4265-73). Por tanto, IL-18 podría ser otro candidato utilizado para potenciar el efecto antitumoral de los linfocitos CAR-T.

5

En este ejemplo, se examinó el efecto de la administración de diferentes citocinas exógenas en la expansión, fenotipo, funciones efectoras *in vitro* y eficacia antitumoral *in vivo* de los linfocitos T y células CART receptor de folato alfa (FR α).

10

Se utilizaron los siguientes materiales y métodos en los experimentos descritos en este ejemplo.

Construcción de CAR y preparación de lentivirus

15

El vector CAR pELNS-C4-27z se construyó como se ha descrito previamente (manuscrito en revisión). Resumiendo, el plásmido pHEN2 que contiene el scFv C4/AFRA4 anti-FR α se utilizó como molde para la amplificación por PCR del fragmento C4 utilizando los cebadores de 5'-ataggatcccagctggtggagtctggggaggc-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-atagctagcacctaggacggtcagctgtgtccc-3' (SEQ ID NO: 4) (BamHI y NheI estaban subrayados). El producto de la PCR y los vectores de expresión lentivíricos autoinactivantes pELNS de tercera generación se digirieron con BamHI y NheI. Los productos de PCR digeridos se insertaron luego en el vector pELNS que contenía el dominio de señalización de linfocitos T CD27-CD3z en el que la expresión del transgén está impulsada por el promotor del factor de elongación-1 α (EF-1 α).

20

25

Se generó un lentivirus defectuoso en la replicación de título elevado mediante la transfección de células de la línea celular de riñón embrionario humano 293T (293T) con cuatro plásmidos (pVSV-G, pRSV.REV, pMDLg/p.RRE y CAR pELNS-C4-27z) mediante el uso de Express In (Open Biosystems) como se ha descrito previamente. Los sobrenadantes se recogieron 24 h y 48 h después de la transfección y se concentraron por ultracentrifugación. Los títulos de virus se determinaron en función de la eficacia de transducción de lentivirus a células SupT1 utilizando el método de dilución limitante.

30

Linfocitos T y líneas celulares

Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica de donantes sanos después del consentimiento informado según un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional Universitaria de la Universidad de Pensilvania. Los linfocitos T primarios se adquirieron de Human Immunology Core después de purificarlas mediante selección negativa. Los linfocitos T se cultivaron en medio completo (RPMI 1640 complementado con un 10 % de FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomina) y se estimularon con perlas recubiertas de mAb anti-CD3 y anti-CD28 (Invitrogen) en una proporción de 1:1 siguiendo las instrucciones. Veinticuatro horas después de la activación, las células se transdujeron con lentivirus a una MOI de 5. Se añadieron las citocinas indicadas a los linfocitos T transducidos a partir del día siguiente con una concentración final de 10 ng/mL. Las citocinas fueron reemplazadas cada 3 días.

35

40

La célula 293T utilizada para el empaquetamiento de lentivirus y la célula SupT1 utilizada para la titulación lentivírica se obtuvieron de la ATCC. Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de ovario establecidas SKOV3 (FR α +) y C30 (FR α -) como células diana para el ensayo de citotoxicidad y secreción de citocinas. Para los ensayos de bioluminiscencia, se transdujo SKOV3 con lentivirus para expresar luciferasa de luciérnaga (fLuc).

45

Análisis de citometría de flujo y clasificación de células

La citometría de flujo se realizó en un BD FACSCanto. Se obtuvieron anticuerpos anti-CD45 (HI30), CD3 (HIT3a), CD8 (HIT8a), CD45RA (HI100), CD62L (DREG-56), CCR7 (G043H7), IL-7R α (A019D5), CD27 (M-T271), CD28 (CD28.2), CD95 (DX2), TNF- α (MAb11), IFN- γ (4S.B3), IL-2 (MQ1-17H12), perforina (B-D48), granzima-B (GB11) humanos de Biolegend. Se adquirió anticuerpo de conejo anti-IgG humana (H+L) conjugado con biotina-SP de Jackson Immunoresearch y la estreptavidina conjugada con APC se adquirió de Biolegend. Se adquirió anti-Bcl-xl humano (7B2.5) de SouhemBiotech. El kit de apoptosis y los tubos TruCount se obtuvieron de BD Bioscience. Para el recuento de linfocitos T en sangre periférica, se obtuvo sangre mediante extracción de sangre retroorbitaria y se realizó una tinción para detectar la presencia de linfocitos T CD45, CD3, CD4 y CD8 humanos. Los subconjuntos CD45+ seleccionados, CD3+, CD4+ y CD8+ humanos se cuantificaron con los tubos TruCount siguiendo las instrucciones del fabricante.

50

55

Estudio *in vivo* de terapia celular adoptiva

Se obtuvieron ratones hembra no obesos diabéticos/de inmunodeficiencia combinada grave/de cadena $\gamma^{-/-}$ (NSG) de 8 a 12 semanas de edad del Stem Cell and Xenograft Core del Abramson Cancer Center, Universidad de Pensilvania. Los ratones se inocularon por vía subcutánea con 3×10^6 células SKOV3 fLuc⁺ en el flanco el día 0. Cuatro o cinco ratones se aleatorizaron por grupo antes del tratamiento. Después de que los tumores se volvieran palpables, los linfocitos T primarios humanos se activaron y transdujeron como se ha descrito previamente. Los linfocitos T se expandieron en presencia de IL-2 (5 ng/mL) durante aproximadamente 2 semanas. Cuando la carga tumoral fue de $\sim 250\text{-}300 \text{ mm}^3$, a los ratones se les inyectaron 5×10^6 células CAR-T o 100 μL de solución salina por vía intravenosa y luego recibieron una inyección

60

65

intraperitoneal diaria de 5 µg de IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21 o solución de tampón fosfato (PBS) durante 7 días. Las dimensiones del tumor se midieron con calibradores y los volúmenes del tumor se calcularon con la siguiente fórmula: volumen tumoral = (longitud x anchura ²)/2. El número y el fenotipo de los linfocitos T transferidos en la sangre del ratón receptor se determinaron mediante citometría de flujo después de una extracción de sangre retroritaria. Los ratones se sacrificaron cuando los volúmenes tumorales eran superiores a 2000 mm³ y los tumores se resecaron inmediatamente para su análisis posterior.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con Prism 5 (software GraphPad) y el software IBM SPSS Statistics 20.0. Los datos se mostraron como media ± EEM a menos que se aclare. Se utilizaron pruebas de la t de muestras pareadas o pruebas del orden de Wilcoxon no paramétricas para la comparación de dos grupos y se utilizaron medidas repetidas ANOVA o de la prueba de Friedman para estudiar la significación estadística de las diferencias entre tres o más grupos. Los hallazgos se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de *P* fueron inferiores a 0,05.

RESULTADOS

1. Construcción y expresión de CAR C4 anti-FRα

El CAR pELNS-C4-27z constaba del scFv C4 anti-FRα enlazado a una región transmembrana y bisagra de CD8α, seguido de un resto de señalización de CD3ζ junto con el motivo de señalización intracelular de CD27 (Figura 1A). Los linfocitos T humanos primarios se transdujeron eficazmente con vectores lentivíricos CAR C4 con eficacias de transducción de un 43 %-65 % cuando se detectaron 48 h después de la transducción. Los niveles de expresión de CAR fueron comparables entre los linfocitos T CD4+ y CD8+ (52,6 ± 10,2 % frente a 49,5 ± 17,1 %, *P* = 0,713).

2. Influencia de las citocinas en la expansión de linfocitos T transducidos con CAR (CAR-T)

Se investigó la expansión y acumulación de linfocitos CAR-T en presencia de diversas citocinas y IL-18. Tres semanas después de la exposición a las diferentes citocinas en cultivo, los linfocitos CAR-T que se habían cultivado en presencia de IL-2, IL-7 o IL-15 se habían expandido 1000-2000 veces. Los linfocitos CAR-T que se habían cultivado en presencia de IL-18, IL-21 o NC (control, sin citocina) demostraron una expansión de menos de 200 veces (Figura 1B).

Se analizaron las razones que contribuían a una mayor acumulación de linfocitos CAR-T, específicamente, se evaluó la proliferación y apoptosis de los linfocitos T. La respuesta proliferativa se midió monitorizando la división celular de los linfocitos T marcados con CFSE cultivados durante 7 días. Como se muestra en la Figura 1C, los linfocitos T cultivados con IL-2 e IL-15 mostraron la mayor capacidad proliferativa, seguidos de IL-7; mientras que IL-21 e IL-18 fueron estimuladores mitógenos menos potentes. La apoptosis de los linfocitos T cultivados con las diferentes citocinas se estudió utilizando tinción con anexina-V. Los resultados indicaron que los linfocitos T cultivados con IL-2, IL-7 e IL-15 experimentaban menos apoptosis cuando se compararon con los grupos NC, IL-18 e IL-21 (Figura 1D). Estos resultados indican que la mayor acumulación de linfocitos T expandidos en presencia de citocinas, p. ej., IL-2, IL-7 o IL-15, puede estar provocada tanto por un aumento de la proliferación como una disminución de la apoptosis, p. ej., mediante la activación de la ruta anti-apoptótica Bcl-xl.

3. Influencia de las citocinas en los fenotipos de linfocitos CAR-T

A continuación, se examinó el fenotipo de los linfocitos CAR-T expandidos en presencia de citocinas exógenas. Los linfocitos T frescos de donantes sanos se dividieron por lo general en cuatro subconjuntos en función de la expresión de CD45RA y CD62L: 1) linfocito T virgen (CD45RA+CD62L+, denominado Tn), 2) linfocito T de memoria central (CD45RA-CD62L+, denominado Tcm), 3) linfocito T de memoria efector (CD45RA-CD62L-, denominado Tern) y 4) linfocito T efector positivo para CD45RA (CD45RA+CD62L-, denominado Temra). A continuación, se evaluó adicionalmente la expresión de CCR7, CD27, CD28 y CD95 en cada subconjunto. La expresión de CD95 experimentó un aumento regulado significativo tras la transducción lentivírica. Los últimos tres subconjuntos de linfocitos T fueron positivos para CD95, mientras que solo una pequeña parte de Tn expresó CD95 (3,6±1,4 % en linfocitos CD4+ y 3,7±1,3 % en linfocitos T CD8+). Esta pequeña población también coexpresó CD27, CD28 y CCR7, y se consideró como linfocitos T madre de memoria (Tscm). Sin embargo, después de la estimulación con perlas anti-CD3/CD28 antes y después de la transducción lentivírica con CAR, CD95 experimentó un aumento regulado notable hasta casi un 100 % en esta población (Figura 2A). Los porcentajes de linfocitos T CD45RA+CD62L+CD95+ experimentaron una gran expansión después de la estimulación con perlas anti-CD3/CD28 tanto en linfocitos T CD4+ y CD8+ como CAR-T en comparación con los linfocitos T frescos (Figuras 2B y 2C). Esta población presentó una expresión elevada simultánea de CD27, CD28 y CCR7, lo que indica que se podría definir como Tscm. Además, los linfocitos CAR-T CD8+ tuvieron un porcentaje mayor de linfocitos Tscm, que podría estar relacionado con la mayor proporción de Tn en los linfocitos T CD8+ iniciales (Figura 2D).

Catorce días después del cocultivo con diversas citocinas, se investigó la proporción de subconjuntos de linfocitos T de los linfocitos CAR-T midiendo la expresión de CD45RA, CD62L y CD95. De los linfocitos CAR-T CD4+, hubo un porcentaje significativamente mayor de linfocitos Tscm en el grupo con IL-7 en comparación con el grupo con IL-2, mientras que los

5 grupos sin citocinas (NC) con IL-18 presentaron porcentajes menores de Tscm pero porcentajes mayores de Tcm. La distribución de subconjuntos de linfocitos T en el grupo con IL-15 fue similar al grupo con IL-2, mientras que el grupo con IL-21 presentó un porcentaje mayor de Tcm, mientras que el porcentaje de Tscm fue comparable al del grupo con IL-2. Los linfocitos CAR-T CD8+ demostraron una tendencia similar a la de los linfocitos CAR-T CD4+ en lo que se refiere a diferenciación y distribución de los cuatro subconjuntos de linfocitos T para cada grupo al que se le administraron citocinas, con proporciones más elevadas de Tscm en comparación con linfocitos CAR-T CD4+ en el grupo correspondiente de linfocitos CAR-T CD8+.

10 Se estudió adicionalmente la capacidad de diversas subpoblaciones de linfocitos CAR-T para autorrenovarse y diferenciarse en otros tipos celulares. Los cuatro subconjuntos de linfocitos CAR-T se clasificaron en función de la expresión de CAR, CD45RA y CD62L y se cultivaron por separado en un medio que contenía IL-2 durante 3 días. Como se muestra en la Figura 2E, el subconjunto de Tscm fue capaz de diferenciarse en los otros tres subconjuntos, y los subconjuntos de Tcm y Temra fueron capaces de diferenciarse en Tern. Estos resultados indican que los linfocitos T CD62L+ y CD45RA+ fueron capaces de diferenciarse en linfocitos T CD62L- y CD45RA-, respectivamente. Se evaluó la capacidad de proliferación de los cuatro subconjuntos mediante dilución de CFSE y después se comparó. Los resultados mostraron que los Tscm presentaron una capacidad de proliferación más fuerte que otros subconjuntos (Figura 2F). Además, la expresión de CD45RA se correlacionó inversamente con la intensidad de CFSE mientras que la expresión de CD62L y CCR7 se correlacionó directamente con la proliferación. En todos los grupos con citocinas, los linfocitos T CD45RA+ exhibieron niveles mucho más bajos de CFSE que los linfocitos T negativos para CD45RA y con expresión tenue de CD45RA (Figuras 3A-3B), lo que indica que los linfocitos T CD45RA+ tenían una actividad de proliferación más fuerte que los linfocitos T CD45RA-. Por lo tanto, el aumento de la acumulación de linfocitos T cultivados en presencia de IL-2, IL-7 e IL-15 puede estar relacionado con la mayor proporción de linfocitos T CD45RA+ (que tienen una mayor capacidad de proliferación) (Figura 4).

25 Con respecto al fenotipo de los linfocitos CAR-T, los linfocitos CAR-T presentaron una expresión más baja de CD45RA, CD62L, CD27 y CD28, pero una expresión más elevada de CCR7 en la superficie de los linfocitos T. La influencia de las citocinas en el fenotipo de los linfocitos CAR-T se evaluó adicionalmente en función de la expresión de los siguientes marcadores superficiales: CD27, CD28, CD62L, CCR7 e IL7R α . Los linfocitos CAR-T cultivados en presencia de IL-18 mostraron un patrón de expresión bastante similar a los cultivados sin complemento de citocinas. IL-2 provoca una disminución regulada drástica de la expresión de CD27, CD28, CD62L, CCR7 e IL7R α en comparación con el control NC. De las otras citocinas y, en comparación con los linfocitos CAR-T expuestos a IL-2, los linfocitos CAR-T expuestos IL-7 presentaron una expresión más elevada de CD62L, CD27 y CD28 pero una expresión significativamente reducida de CCR7; los linfocitos CAR-T del grupo con IL-15 presentaron una expresión más elevada de CD27 y CD28; y los linfocitos CAR-T expuestos a IL-21 presentaron una expresión más elevada de CD62L, CCR7, CD27 y CD28, lo que indica que la exposición a IL-2 indujo la expansión de un subconjunto de linfocitos T con un fenotipo de linfocitos T mucho más maduro que los otros grupos (Figura 4).

4. Influencia de las citocinas en la función efectora de linfocitos CAR-T

40 Para investigar la influencia de las citocinas en la función efectora de los linfocitos CAR-T, se evaluó la capacidad de producción de citocinas de los linfocitos CAR-T después de la estimulación con células SKOV3 que expresan FR α . Tras 5 horas de estimulación, se pudieron detectar TNF- α , IFN- γ e IL-2 en el citoplasma de los linfocitos CAR-T, donde un 41,5-54,0 % de los linfocitos CAR-T produjeron TNF- α , un 12,4-15,3 % de los linfocitos CAR-T produjeron IFN γ y un 4,3-6,5% de los linfocitos CAR-T produjeron IL-2 (Figuras 5A-5C). La exposición a IL-2, IL-7 e IL-15 durante la expansión fomentó la producción de TNF- α por parte de los linfocitos CAR-T, mientras que el número de linfocitos CAR-T que produjeron IFN- γ e IL-2 fue comparable entre todos los grupos de citocinas (Figuras 5A, 5B y 5C). A continuación, se compararon las fracciones de los linfocitos CAR-T con una respuesta y su polifuncionalidad. En comparación con la exposición a IL-2 durante la expansión, la exposición a IL-18, IL-21 o ausencia de exposición a citocinas durante la expansión indujo menos linfocitos CAR-T que producían citocinas, y menos linfocitos CAR-T poseyeron la capacidad de producir múltiples citocinas cuando fueron estimulados por las células diana. Estos resultados son coherentes con el hecho de que el fenotipo en los linfocitos CAR-T de los grupos con IL-18, IL-21 y NC estuvo menos diferenciado que en los del grupo expuesto a IL-2.

55 A continuación, se determinó el efecto de la exposición a citocinas durante la expansión en la expresión de las moléculas citotóxicas perforina y granzima-B después de la estimulación con el antígeno. De manera similar a la producción con TNF- α , los linfocitos CAR-T expuestos a IL-2, IL-7 e IL-15 demostraron una mayor expresión de perforina en comparación con los linfocitos CAR-T expuestos a NC, IL-18 e IL-21. Sin embargo, aunque los linfocitos CAR-T expuestos a IL-21 producen menos TNF- α y perforina, produjeron el nivel más elevado de granzima-B. Los siguientes niveles más elevados de producción de granzima-B se observaron en linfocitos CAR-T expuestos a IL-2 e IL-15 durante la expansión. Los linfocitos CAR-T en el grupo IL-18 presentaron la menor cantidad de expresión tanto de perforina como de granzima-B después de la estimulación con el antígeno.

60 Finalmente, la actividad de lisis tumoral por parte de los linfocitos CAR-T expuestos a diversas citocinas durante la exposición se cuantificó con el ensayo de luciferasa. Como se muestra en la Figura 5D, los linfocitos CAR-T cocultivados con IL-2 e IL-15 lisaron SKOV3 más eficazmente que aquellos con NC e IL-18 (ambos $P < 0,05$).

La asociación entre el fenotipo de los linfocitos CAR-T y su función se confirmó posteriormente. Los linfocitos T de 14 días se clasificaron después de la transfección lentivírica en función de la expresión de CAR y CD62L. Los linfocitos CAR-T CD62L+ (Tscm y Tcm) exhibieron menos actividad de producción de citocinas y menor capacidad citolítica en comparación con linfocitos CAR-T CD62L- (Tern y Temra) (Figuras 6A-6C). En esta perspectiva, los linfocitos CAR-T expuestos a IL-2 e IL-15 produjeron más citocinas y presentaron una actividad de lisis tumoral más fuerte, lo que tal vez se puede atribuir parcialmente a las mayores proporciones de Tern y Temra en esos grupos.

5. Expansión y fenotipo de los linfocitos CAR-T después de la provocación antigénica

Para investigar la influencia de las citocinas sobre la expansión de los linfocitos CAR-T provocados con antígenos específicos, se cocultivaron los linfocitos CAR-T expuestos a IL-2 durante dos semanas con células SKOV3 (FRα+) o C30 (FRα-) en presencia de las citocinas indicadas durante 7 días. De manera similar a la circunstancia sin antígeno, los linfocitos CAR-T expuestos a IL-2, IL-7 e IL-15 presentaron un factor de expansión más alto que los linfocitos CAR-T expuestos a otras citocinas. Fue mucho más probable que los linfocitos CAR-T expuestos a IL-21 durante la expansión experimentaran apoptosis. Sin embargo, cuando los linfocitos CAR-T expuestos a las citocinas indicadas durante dos semanas se cocultivaron con células SKOV3 o C30 sin un complemento adicional de citocinas durante 7 días, la acumulación de los linfocitos CAR-T fue comparable entre todos los grupos, y aquellos que habían sido expuestos a IL-15 e IL-18 experimentaron la menor incidencia de apoptosis (Figura 7A). También se analizaron los fenotipos de los linfocitos CAR-T. Como para los cuatros subconjuntos de linfocitos T de memoria, los resultados fueron diferentes respecto al estudio sin antígeno: los Tscm fueron raros y los Tern supusieron más de un 50 % en los grupos sin citocinas, con IL-18 y con IL-21. Las citocinas no tuvieron un impacto significativo en la composición de los subconjuntos de linfocitos T de memoria y la exposición a IL-7 no favoreció el aumento de Tscm (Figura 7B).

6. Eficacia antitumoral de diversas citocinas en modelos en animales

Para evaluar los efectos de diversas citocinas durante la expansión *ex vivo* de los linfocitos CAR-T sobre la eficacia de los linfocitos CAR-T *in vivo*, se estudió la persistencia de los linfocitos CAR-T y el desenlace utilizando un modelo de xenoinjerto en ratón NSG de cáncer de ovario. Se inyectaron por vía intravenosa a los ratones portadores de tumores SKOV3 subcutáneos dos dosis de 5×10^6 linfocitos CAR-T C4-27z que se habían expuesto a las citocinas indicadas *ex vivo* durante 2 semanas anteriormente. Todos los ratones que recibieron una infusión de linfocitos CAR-T C4-27z presentaron una carga tumoral menor en comparación con aquellos a los que se inyectaron linfocitos T no transducidos y linfocitos CAR-T anti-CD19 (Figura 8A). De los diversos grupos con citocinas, los ratones que recibieron linfocitos CAR-T con exposición a IL-2 previa mostraron la carga tumoral más elevada, algo coherente con la menor cantidad de linfocitos T humanos circulantes en estos ratones. Todos los tumores en los grupos NC, con IL-7, IL-15, IL-18 e IL-21 estuvieron significativamente suprimidos o incluso desaparecieron sin ninguna diferencia estadística en el tamaño tumoral. La persistencia de los linfocitos T transferidos en la sangre periférica se determinó 15 y 32 días después de la transferencia adoptiva. Pareció que los ratones que recibieron linfocitos CAR-T tratados con IL-7 e IL-21 tenían una cantidad más elevada de linfocitos T humanos que los otros grupos en la sangre periférica el día +15, mientras que los ratones que recibieron linfocitos CAR-T tratados con IL-2 tuvieron el número más bajo de linfocitos T humanos (Figuras 8B-8C). Como con los porcentajes de poblaciones de diferentes linfocitos CAR-T, todos los grupos NC y expuestos a IL-15, IL-18 e IL-21 presentaron más linfocitos CAR-T CD4+ en comparación con el grupo con IL-2, mientras que los porcentajes de linfocitos CAR-T CD8+ fueron comparables entre todos los grupos. De los fenotipos de linfocitos T, CD62L, CD27 y CD28 se expresaron solamente en aproximadamente un 5-10 % de los linfocitos T y fueron comparables entre todos los grupos, excepto para los linfocitos T CD8+ en el grupo con IL-21 que expresaron más CD28 que aquellos en el grupo con IL-2 y NC (ambos $P < 0,05$). En el día +32, los linfocitos T humanos circulantes en todos los grupos de linfocitos CAR-T se habían expandido significativamente excepto en el grupo con IL-2, con un promedio de recuento de linfocitos T de $14\,907/\mu\text{L}$ a $19\,651/\mu\text{L}$ (y solo $242/\mu\text{L}$ en el grupo con IL-2). Dos ratones murieron aunque los tumores habían experimentado regresión.

ANÁLISIS

IL-2 es la citocina utilizada con mayor frecuencia para generar linfocitos para la inmunoterapia adoptiva. Promueve la supervivencia y expansión de los linfocitos T, y potencia la capacidad de destrucción tumoral de los linfocitos T. Sin embargo, la acción de IL-2 es limitada ya que es el resultado de la muerte celular inducida por la activación (AICD) de los linfocitos T y el desarrollo de los linfocitos T reguladores (Malek *et al.*, *Immunity*, 2010, 33:153-65; y Lenardo *et al.*, *Annu Rev Immunol*, 1999, 17:221-53). En este ejemplo, IL-2 aumentó significativamente la acumulación de linfocitos CAR-T y su capacidad citotóxica, pero los linfocitos CAR-T expuestos a IL-2 presentaron una inmunidad antitumoral inferior *in vivo* después de la transferencia adoptiva. Este descubrimiento demuestra una relación inversa entre la lisis tumoral *in vitro* y la erradicación tumoral *in vivo*. Los linfocitos CAR-T expuestos a IL-2 mostraron un fenotipo o relativamente maduro con poca expresión de CD62L, CCR7, CD27 y CD28, que son menos persistentes *in vivo* (Yang *et al.*, *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62:727-36). Estudios recientes han indicado que la transferencia adoptiva de linfocitos T menos diferenciados se correlaciona con una mejor regresión tumoral, lo que respalda el descubrimiento de que los linfocitos CAR-T expuestos a IL-2 son menos eficaces que otros grupos (Gattinoni *et al.*, *Nat Med*, 2011, 17:1290-7; y Markley *et al.*, *Blood*, 2010, 115:3508-19).

IL-15 presentó un rendimiento similar de estimulación de la expansión de linfocitos CAR-T y función de la lisis tumoral que IL-2, pero indujo menos fenotipos diferenciados (expresión más elevada de CD27 y CD28). Por lo tanto, IL-15 respalda la persistencia de los linfocitos CAR-T *in vivo* y muestra una mejor inmunidad antitumoral en modelos en animales.

5 En comparación con IL-2 e IL-15, IL-7 mostró una capacidad similar para promover la expansión de linfocitos CAR-T, pero indujo un nivel más elevado de expresión de CD62L y exhibió la proporción más elevada de linfocitos CAR-Tscm en una circunstancia sin antígeno. Por lo tanto, en comparación con los linfocitos CAR-T expuestos a IL-2, la exposición *ex vivo* a IL-7 sin provocación antigénica potenció la eficacia antitumoral de los linfocitos CAR-T. Los linfocitos CAR-T expuestos a IL-7 no dieron como resultado una mejor eficacia antitumoral *in vivo* que IL-2, y la eficacia fue inferior a IL-15 debido a la menor expansión de los linfocitos CAR-T con provocación antigénica.

15 IL-21 ejerció pocos efectos en la acumulación de los linfocitos CAR-T ya que no pudo potenciar la capacidad antiapoptótica, p. ej., promoviendo la expresión de Bcl-xL. Sin embargo, IL-21 indujo la expansión de linfocitos CAR-T menos diferenciados, con un fenotipo de expresión elevada de CD62L, CCR7, CD27 y CD28, incluso en la circunstancia de provocación antigénica. Por lo tanto, los linfocitos CAR-T expuestos a IL-21 mostraron la mejor persistencia en modelos en animales e inyección de IL-21 *in vivo*, y también presentaron una mejor eficacia para promover la erradicación tumoral que los otros grupos con citocinas excepto IL-15. Estos resultados son coherentes con los descubrimientos previos de que los linfocitos CAR-T menos diferenciados se correlacionan con una mejor regresión tumoral.

20 IL-18 es una citocina proinflamatoria que pertenece a la familia de IL-1, que regula las respuestas inmunitarias tanto innata como adaptativa mediante la activación de monocitos, linfocitos NK y linfocitos T y la producción de IFN- γ así como otras citocinas *in vivo* (Srivastava *et al.*, *Curr Med Chem*, 2010, 17:3353-7). Los resultados presentados en el presente documento indican que IL-18 tiene poco impacto sobre la expansión, fenotipo y función de los linfocitos CAR-T en experimentos *ex vivo*, ya que la mayoría de los resultados en los grupos con IL-18 son similares y comparables con el grupo NC. IL-18 promovió poca proliferación de los linfocitos T y mantuvo más supervivencia de los linfocitos T con provocación antigénica en comparación con el grupo de control (NC). Los estudios *in vivo* mostraron que IL-18 no tiene un impacto significativo sobre la eficacia de los linfocitos CAR-T cuando se compara con ratones sin complemento de citocinas.

30 En resumen, los descubrimientos de estos experimentos indican que el complemento *ex vivo* con IL-2 para la expansión de linfocitos CAR-T no es una estrategia óptima aunque se utiliza ampliamente. En cuanto al complemento con IL-18, IL-21 o ausencia de complemento con citocinas, aunque pueden inducir linfocitos CAR-T relativamente eficaces, no promueven la expansión de linfocitos CAR-T de manera lo suficientemente eficaz, de modo que se puedan preparar suficientes linfocitos CAR-T para su uso clínico en un tiempo de expansión limitado. Por lo tanto, IL-15 e IL-17 pueden ser mejores agentes para la expansión de linfocitos CAR-T. Además, la combinación de complementos con IL-7 e IL-15 provoca la generación de Tscm, lo que es beneficioso para producir linfocitos CAR-T más «jóvenes». En cuanto a la inyección de citocinas *in vivo*, todos los suplementos con citocinas y mejoran la eficacia antitumoral, ya que muchas de ellas favorecen la expansión de los linfocitos CAR-T, siendo IL-15 la que presenta el mejor efecto. Los ratones que recibieron linfocitos CAR-T expuestos a IL-15 por inyección tuvieron una mayor eficacia, debido en parte a la mayor capacidad de expansión y mayor persistencia de los linfocitos CAR-T durante el tratamiento tumoral. Por lo tanto, los resultados de estos experimentos indican que IL-7 e IL-15 son prometedores para fomentar la expansión de linfocitos CAR-T e inducir los fenotipos de linfocitos T que son más eficaces para el tratamiento terapéutico.

45 Ejemplo 2: Efecto de la depleción de CD25 en el crecimiento celular y la eficacia de transducción

La cadena α de interleucina-2, también conocida como CD25, es expresada por los linfocitos T reguladores (Treg) pero también se ha observado en células de leucemia de linfocitos B crónica (LLC) (en más de un 85 % de los pacientes con LLC). Los Treg tienen funciones inmunosupresoras y pueden impedir la eficacia de la inmunoterapia, p. ej., inhibiendo la proliferación de los linfocitos T. El actual aislamiento o enriquecimiento de linfocitos T de pacientes con LLC mediante aféresis normalmente contiene una proporción significativamente elevada de Treg así como de células de LLC. La depleción de los Treg y células de LLC en el material de partida mediante métodos de depleción de CD25 puede mejorar significativamente la pureza de los linfocitos T efectores y aumentar de esta manera la potencia de linfocitos T que expresan CAR19, p. ej., linfocitos CART19.

55 Optimización de la depleción de CD25

Se realizó un experimento de validación para identificar las condiciones óptimas para la depleción de CD25 a partir de las aféresis de dos pacientes utilizando reactivo CD25 de Miltenyi en un sistema CliniMACS. Se utilizó el reactivo de depleción de CD25 a un 100 %, 70 % y 30 % de la cantidad recomendada por el fabricante para identificar si se podía obtener la misma eficacia de depleción utilizando menos reactivo. También se estudiaron dos conjuntos de tubos de Miltenyi diferentes. La depleción se realizó de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los resultados de los experimentos se muestran en la siguiente tabla. Para el control, se realizó la selección utilizando perlas inmunomagnéticas anti-CD3/CD28.

Tabla 2. Resultados experimentales de la depleción de CD25.

Grupos de depleción de CD25		100 %	70 %	30 %
Conjunto de tubos de Miltenyi	161-01			
Programa CliniMACS	ENRICHMENT1.1			
Células del paciente	UPCC04409-15			
% de células CD45+CD25+	83,56 %			
% de células CD45+CD3+	8,66 %			
% de células CD45+CD3+CD25-	5,70 %			
N.º de células CD25+ sobre las que actuar		2.E+09	2.E+09	2.E+09
N.º de células sometidas a aféresis para la depleción de CD25		2,39E+09	3,41E+09	7,97.E+09
Volumen de perlas CD25 utilizado (mL)		2,5	2,5	2,5
N.º de células en la fracción con depleción de CD25		1,05E+09	1,86E+09	3,36E+09
N.º de células en la fracción enriquecida en CD25		2,05E+08	2,58E+08	5,19E+08
Rendimiento de linfocitos T CD25- esperado		1,36E+08	1,95E+08	4,54E+08
% de linfocitos T en la fracción sometida a depleción		6,26 %	4,06 %	2,50 %
Rendimiento de linfocitos T CD25- observado		6,57E+07	7,55E+07	8,40E+07
Rendimiento de CD3+CD25- como % del esperado		48 %	39 %	18 %
% de linfocitos B en la fracción sometida a depleción		90,50 %	91,6 %	95,30 %
Viabilidad de la fracción CD25+		94,4 %	96,2 %	91,1 %
Viabilidad de la fracción CD25-		95,8 %	95,0 %	99,0 %

5 El rendimiento de linfocitos T CD25- (negativos para CD25) esperado representa el rendimiento de linfocitos T CD25- calculado que se calcula asumiendo un 100 % de eficacia en las manipulaciones respectivas. El rendimiento observado de linfocitos T CD25- representa el número de linfocitos T CD25- después de las manipulaciones respectivas. Como se muestra en la Tabla 2, la utilización de menos reactivo del recomendado por el fabricante no dio como resultado la misma eficacia en la depleción de CD25. La utilización de tubos diferentes dio como resultado un aumento en el enriquecimiento de linfocitos T en un log.

10 La Figura 9 muestra gráficos de análisis por citometría de flujo representativos que demuestran la eficacia de la depleción de CD25 en comparación con las células totales de la aféresis, control de células con selección de CD3/CD25, células con depleción de CD25 y células enriquecidas en CD25. El contenido de monocitos de la población celular, según se determina mediante la expresión de CD14 del subconjunto CD3-CD19-. Estos resultados indican una depleción de CD25 eficaz y que la depleción de CD25 también dio como resultado un contenido de monocitos significativo (61,1 %) de células que expresan CD14 en comparación con menos de un 2 % de las células totales de la aféresis, control y las células enriquecidas en CD25.

Efecto de la depleción de CD25 en la población y proliferación de linfocitos T

20 A continuación, se evaluó la calidad del producto de tipo linfocito T después de la depleción de CD25 determinando la proporción de linfocitos T CD4+ y CD8+ y la capacidad de la proliferación.

25 Para determinar la proporción de poblaciones de linfocitos T específicas, las células se analizaron mediante citometría de flujo nueve días después de la selección mediante depleción de CD25 o con anti-CD3/CD28 como se ha descrito anteriormente. Los resultados muestran que los linfocitos T con selección de CD3/CD28 tuvieron una mayor proporción de linfocitos T CD4+ en comparación con las células con depleción de CD25 (84,6 % en comparación con un 46,8 % de linfocitos T CD4+). En cambio, las células con depleción de CD25 tuvieron una mayor proporción de linfocitos T CD8+ en comparación con las células con selección de CD3/CD28 (47,2 % en comparación con 11,5 % de linfocitos T CD8+). Por lo tanto, la depleción de CD25 da como resultado linfocitos T con una mayor proporción de linfocitos T efectores CD8+.

También se evaluaron la capacidad de proliferación y la viabilidad celular en el control (células con selección de CD3/CD28) y células con depleción de CD25. Se sembraron en placas $1,6 \times 10^7$ células del control y células con depleción de CD25 y se determinó el número de células y la viabilidad durante 10-13 días. La Figura 10A muestra el número total de células en el tiempo y la Figura 10B muestra las duplicaciones calculadas de la población (calculadas a partir del número total de células). Los resultados indican que las células con depleción de CD25 demostraron características de crecimiento similares a las células de control. La Figura 10C muestra el porcentaje de células viables y los resultados muestran que la viabilidad también fue similar entre el control y las células con depleción de CD25.

10 Efecto de la depleción de CD25 en la eficacia de transducción lentivírica

Se evaluó el efecto de la depleción de CD25 en la eficacia de transducción lentivírica determinando la expresión del CAR después de la transducción. En la aféresis de un paciente se realizó depleción de células CD25 como se ha descrito anteriormente. La eficacia de la depleción de CD25 se demuestra en los gráficos del análisis de citometría de flujo comparando la población que expresa CD25 antes (muestra de la aféresis) y después de la depleción de CD25 (fracción con depleción de CD25). Después de la depleción de CD25, la fracción con depleción de CD25 contenía aproximadamente un 59,2 % de células negativas para CD25 y solo un 10,3 % de células positivas para CD25.

La fracción con depleción de CD25 se transdujo con un constructo lentivírico que codifica CAR19. Después de 11 días de cultivo, se evaluó la expresión del CAR. Se utilizaron como controles células que no estaban transducidas y células con selección de CD3 transducidas. La expresión de CAR19 fue significativamente mayor en células con depleción de CD25 en comparación con las células con selección de CD3 (51,4 % en comparación con un 12,8 %). Este resultado demuestra que las células con depleción de CD25 han mejorado la eficacia de la transducción lentivírica, lo que puede ser importante para un mejor efecto terapéutico en la terapia con CART.

25 Ejemplo 3: Utilización de citocinas con células con depleción de CD25

En este ejemplo, se examinó el efecto de la depleción de CD25 con el complemento con citocinas durante la expansión en el cultivo. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un paciente y se dejaron sin manipular o se realizó la depleción de las células que expresaban CD25 como se describe en el Ejemplo 2. El enriquecimiento de los linfocitos T se consiguió mediante estimulación con perlas recubiertas con anti-CD3 y CD28. Los linfocitos T se cultivaron inmediatamente en medio complementado con 10 ng/mL de IL-7, 10 ng/mL de IL-15, o la combinación de 10 ng/mL de IL-7 y 10 ng/mL de IL-15. En el día 3, se cambió el medio añadiendo las mismas citocinas. En el día 5, se añadió el medio que contenía 100 UI de IL-2/mL y las células se cultivaron durante un total de 10 días.

El análisis por citometría de flujo mostró el cambio en la distribución de células CD3 y CD19 en células con depleción de CD25 en comparación con PBMC no manipuladas (con selección de CD3/CD28 estándar) después del cultivo en presencia de IL7, IL-15, o IL7 e IL15. Se evaluó la distribución de células que expresan CD3, CD19 y CD25 en la población de partida (p. ej., antes de la depleción de CD25 y antes del cultivo con complemento de citocinas). La población de partida tuvo una proporción elevada de células CD3-CD19+ (-97,2 %) y una proporción elevada de células que expresan CD25 (-94,5 % de CD25+ CD3-; y -93,8 % de CD25+ CD19+). Después de la manipulación (depleción de CD25) y cultivo con citocinas, la distribución cambió como se muestra en la Figura 11. Las células con depleción de CD25 mostraron en general una reducción mayor en células que expresan CD19 en comparación con las células no manipuladas.

45 También se evaluó la capacidad de proliferación para las mismas muestras celulares determinando el número total de células en el cultivo el día 10 después de la estimulación con perlas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28. A continuación se muestra el número de células de cada muestra celular.

Tabla 3. Expansión *in vitro*

Células	Citocinas añadidas	N.º de células en cultivo
No manipuladas	IL-7	$1,24 \times 10^6$
	IL-15	$0,92 \times 10^6$
	IL-7 + IL-15	$0,52 \times 10^6$
Con depleción de CD25	IL-7	$0,93 \times 10^6$
	IL-15	$1,95 \times 10^6$
	IL-7 + IL-15	$3,03 \times 10^6$

50

Estos resultados muestran que la complementación con IL-15 durante el cultivo de linfocitos T con depleción de CD25 dé como resultado un aumento de la expansión en comparación con las células no manipuladas. La adición de IL-7 e IL-15 al medio durante el cultivo dio como resultado un aumento significativo de la expansión en comparación con las células

no manipuladas y en comparación con la adición de las citocinas IL-7 o IL-15 independientemente. Por lo tanto, el complemento con la combinación de IL-7 e IL-15 dio como resultado linfocitos T con el mayor aumento de capacidad proliferativa.

5 Ejemplo 4: Aptitud de los linfocitos T para su uso en la terapia celular

El uso de la terapia celular modificada ha demostrado un éxito significativo en los últimos cinco años, específicamente en ensayos clínicos que actúan sobre neoplasias malignas de linfocitos B con linfocitos T con receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene como diana CD19. A pesar de estos resultados prometedores, muchos pacientes en proceso de evaluación para la inscripción son, en última instancia, incapaces de continuar debido a la falta de suficiente producto celular. Esta limitación surge como resultado de la incapacidad de recolectar suficientes linfocitos de la sangre periférica, o como resultado de una expansión celular *ex vivo* sin éxito, que es un componente de la generación de células y un elemento predictivo de la actividad *in vivo*. En el momento de la evaluación de muchos pacientes, más de un 30 % de los pacientes no tienen suficiente material celular para una fabricación clínica con éxito de un producto para la terapia celular. Este ejemplo describe la identificación de factores que pueden influenciar la recolección de los linfocitos T periféricos, tales como la programación de la recolección y la quimioterapia que puede afectar al recuento de linfocitos T. Estos factores tienen una relevancia clínica significativa ya que los ensayos con linfocitos CAR T son mayores y más numerosos. En particular, se están investigando el fenotipo de memoria y el potencial de expansión de los linfocitos T durante la quimioterapia en pacientes pediátricos con LLA y LNH.

20 Métodos

Selección de pacientes y protocolo clínico

25 Se analizaron la capacidad de expansión y fenotipo de los linfocitos T recolectados de pacientes pediátricos con neoplasias malignas hemáticas antes del inicio de la quimioterapia y después de cada ciclo de quimioterapia. Los pacientes fueron identificados en las consultas clínicas en el Departamento de Hematología y Oncología del Hospital Infantil de Filadelfia en Filadelfia, PA. Los pacientes fueron inscritos en el ensayo clínico CHP-12-009915 aprobado por el Comité Institucional de Revisión del Hospital Infantil de Filadelfia. Los criterios de inclusión se definieron de la siguiente manera: hombres o mujeres de 6 meses a 21 años de edad; diagnóstico de neoplasia maligna de linfocitos B positiva para CD19; ausencia de terapia génica anterior (los pacientes pueden haber recibido terapia con linfocitos CAR T CD19 si estuvo seguida de trasplante de células madre mieloablativo); consentimiento informado parental/del tutor; y, si procede, consentimiento del niño. Los criterios de exclusión se definen de la siguiente manera: infección activa por hepatitis B o C; infección por VIH; cualquier afección médica no controlada que impediría la participación; y padres o tutores que, en la opinión del investigador, pueden no adherirse a los procedimientos del estudio.

40 El consentimiento y la inscripción fueron realizados por David M. Barrett, y se recogió una muestra de cuatro mililitros de sangre periférica además de las pruebas habituales de laboratorio, que se utilizó para el estudio. Esta fue la única intervención del ensayo, y todos los pacientes continuaron con la terapia de referencia según la enfermedad, produciéndose una recogida similar después de cada ciclo de quimioterapia. Se recogieron muestras de sangre periférica de los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) o linfoma no hodgkiniano (LNH) utilizando un protocolo de ensayos clínicos aprobado por la IRB (CHP-12-009915) en los siguientes puntos temporales: antes de la quimioterapia, después de la inducción, después de la consolidación, después del mantenimiento intermedio, después de la intensificación retrasada y en el mantenimiento. Los pacientes con una recaída en la prueba se excluyeron de la inscripción. Las características de los pacientes se muestran en la **Tabla 7**. La edad de los pacientes en el momento de la inscripción varió entre 8 meses y 19 años y un 58 % de los pacientes fueron hombres y un 42 % mujeres. Los grupos de enfermedades incluyeron LLA, estratificada como RE (LLA-RE, n = 17) o RA/RMA (LLA-RA/RMA, n = 21) según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), y LNH (n = 12). Los subtipos de linfoma incluyeron linfoma de Burkitt (n = 6), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL, n = 3), linfoma mediastínico primario (n = 1), linfoma primario óseo (n = 1) y linfoma folicular (n = 1); todos los subtipos de LNH se agruparon para el análisis. Las pautas quimioterápicas para la LLA de riesgo estándar y alto se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 7: Características de los pacientes

Característica	Total (n=50)
Edad (a)	
Mediana	5
Intervalo	0,7-19
Sexo - n.º (%)	
Hombre	29 (58)
Mujer	21 (42)

Enfermedad - n.º (%)	
LLA	38 (76)
Riesgo estándar	17 (34)
Riesgo alto y muy alto	21 (42)
LNH	12 (24)
Burkitt	6 (12)
LDLBG	3 (6)
Mediastínico primario	1 (2)
Primario óseo	1 (2)
Folicular	1 (2)

Tabla 8: Pautas de tratamiento administradas a pacientes con LLA de riesgo estándar y de riesgo alto

	LLA de riesgo estándar	LLA de riesgo alto
Inducción	Vincristina, 6 mg/m ²	Vincristina, 6 mg/m ²
	Dexametasona, 6 mg/m ²	Dexametasona, 6 mg/m ²
	PEG-L-asparaginasa, 2500 U/m ²	PEG-L-asparaginasa, 2500 U/m ²
		<u>Daunorrubicina, 100 mg/m²</u>
Consolidación	Vincristina, 1,5 mg/m ²	Vincristina, 1,5 mg/m ²
	6-mercaptopurina, 75 mg/m ²	6-mercaptopurina, 60 mg/m ²
		<u>Ciclofosfamida, 1 g/m²</u>
		<u>Citarabina, 75 mg/m²</u>
		<u>PEG-L-asparaginasa</u>
		<u>2500 mg/m²</u>
Mantenimiento intermedio	Vincristina, 7,5 mg/m ²	Vincristina, 7,5 mg/m ²
	Metotrexato, 500 mg/m ²	Metotrexato, 20 mg/m ²
		<u>6-mercaptopurina, 25 mg/m²</u>
Intensificación retrasada	Vincristina, 4,5 mg/m ²	Vincristina, 7,5 mg/m ²
	Dexametasona, 10 mg/m ²	Dexametasona, 10 mg/m ²
	Doxorrubicina, 75 mg/m ²	Doxorrubicina, 75 mg/m ²
	PEG-L-asparaginasa	PEG-L-asparaginasa
	2500 U/m ²	5000 U/m ²
	Ciclofosfamida, 1 g/m ²	Ciclofosfamida, 1 g/m ²
	Citarabina, 60 mg/m ²	Citarabina, 60 mg/m ²
	6-tioguanina, 60 mg/m ²	6-tioguanina, 60 mg/m ²
Mantenimiento intermedio II*	Vincristina, 7,5 mg/m ²	
	Metotrexato, 500 mg/m ²	
Mantenimiento	Vincristina, 1,5 mg/m ²	Vincristina, 1,5 mg/m ²
	Dexametasona, 6 mg/m ²	Prednisona, 40 mg/m ²
	6-mercaptopurina, 75 mg/m ²	6-mercaptopurina, 75 mg/m ²
	Metotrexato, 20 mg/m ²	Metotrexato, 20 mg/m ²

	LLA de riesgo estándar	LLA de riesgo alto
	El texto subrayado indica que la terapia no se administró a pacientes de riesgo estándar. *Los linfocitos T recogidos después de la fase II de mantenimiento intermedia para LLA de riesgo estándar no se analizaron, ya que no había un ciclo correspondiente para la enfermedad de riesgo alto (RA) o riesgo muy alto (RMA).	

Expansión y cultivo de linfocitos T ex vivo

5 Los linfocitos se recolectaron de la sangre periférica utilizando medio de centrifugación con densidad Ficoll-Paque (GE Life Sciences) según el protocolo estándar. La capa leucoplaquetaria recolectada se resuspendió en medio de cultivo de linfocitos T y las células se sembraron en recipientes de cultivo del tamaño apropiado con una concentración de 5 a 10 × 10⁶ células/mL y se incubó ante la noche a 37 °C. Después de esta incubación de 18 a 24 horas, el sobrenadante de estos cultivos se recogió y se lavó, dejando las células adherentes en los recipientes de cultivo y aislando solo las células en suspensión. Se tiñó una muestra de este sobrenadante en función de la expresión de CD3, CD4 y CD8 (véase más adelante) para calcular los RTA. Este cultivo completo se combinó a continuación con micropelotas estimuladoras recubiertas con anticuerpos agonistas para CD3 y CD28 (Life Technologies; n.º de catálogo 111.32D) con una proporción de tres perlas por linfocitos T y se resuspendieron a una concentración de 10⁶ linfocitos T/mL para la expansión de linfocitos T, con las mismas condiciones de estimulación y de cultivo utilizadas en nuestras expansiones en las pruebas clínicas. Se contaron las células, se midieron los tamaños celulares en días alternos y se retiraron las perlas el día 7. El periodo de cultivo finalizó cuando la cinética y el volumen del crecimiento celular indicaron que las células entraban en descanso después de la activación. Para los estudios con citocinas, se recogieron muestras como se ha descrito, se combinaron con perlas, y después se dividieron en dos cultivos. Un cultivo (sin citocinas) se trató como se ha indicado anteriormente y el otro (+IL-7 e IL-15) se trató con IL-7 (25 ng/mL) e IL-15 (10 ng/mL) (R&D Systems, n.º 207-IL-025 y n.º 247-IL-205).

Se evaluó la influencia del diagnóstico y la quimioterapia sobre la probabilidad de una respuesta con éxito a la estimulación con CD3/CD28 de las células. Se aplicó un criterio de una expansión celular >5 veces durante 10 días a las células cultivadas. Este criterio es relevante clínicamente para los ensayos de terapia con células modificadas, ya que se ha utilizado un umbral para la expansión mínima necesaria para ser inscrito en los ensayos clínicos de linfocitos CAR T CD19. Se realizó el análisis estadístico en un software GraphPad Prism y se utilizó el análisis de la varianza para comparar los grupos.

Citometría de flujo

30 Se tiñeron los marcadores superficiales de las células de los linfocitos T para diferenciar el linaje del linfocito T. Se pueden utilizar CCR7, CD62L, CD45RO y CD95 para diferenciar los diversos fenotipos de linfocitos T utilizando los siguientes patrones de expresión: virgen (T_N) - CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95-; memoria central madre (T_{SCM}) - CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95+; memoria central (T_{CM}) - CCR7+, CD62L+, CD45RO+, CD95+; memoria efector (T_{EM}) - CCR7-, CD62L-, CD45RO+, CD95+; efector terminal (T_{Eff}) - CCR7-, CD62L-, CD45RO-, CD95+. Véase, p. ej., Gattinoni *et al.*, *Nat. Med.* 17(2011):1290-7. Los anticuerpos utilizados para este análisis así como para la cuantificación de la cantidad global de linfocitos T descrita anteriormente fueron CD8-FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; n.º 347313), CD3-PE (BD Biosciences, n.º 555340), CD4-APC (BD Biosciences, n.º 555349), CCR7-FITC (BD Biosciences, n.º 561271), CD95-PE (BD Biosciences, n.º 556641), CD45RO (BD Biosciences, n.º 559865) y CD62L-PE/Cy7 (BioLegend, San Diego, CA; 304822). Las células se resuspendieron en tampón FACS (PBS + 1 % de suero bovino fetal) y a continuación se incubaron con combinados de anticuerpos durante 25 minutos a 4 °C. A continuación, las muestras se lavaron dos veces y se realizó una adquisición por citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACS Verse (BD Biosciences, n.º 653118). El análisis se realizó utilizando un software FlowJo (TreeStar, Inc, Ashland, OR).

Análisis estadístico

50 Todo el análisis estadístico se realizó utilizando Prism 4 (software Graphpad, La Jolla, CA) utilizando análisis de pruebas de la varianza. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para la comparación de los porcentajes. Todas las comparaciones que se presentan como significativas alcanzaron un valor de $p < 0,05$, o según se calculó para las correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Resultados

55 Una expansión de más de cinco veces *in vitro* durante la expansión de prueba es sumamente predictiva de expansión con éxito a escala clínica, con un valor predictivo positivo de un 70 % y un valor predictivo negativo de un 95 %.

La expansión de los linfocitos T varió según el grupo de enfermedad y la terapia anterior

Se recogió sangre periférica de cada paciente inscrito en el diagnóstico y después de cada ciclo de quimioterapia. Las pautas quimioterápicas administradas a los pacientes con LLA-RE y -RA durante estos ciclos se muestran en la Tabla 8. Los linfocitos T se aislaron y estimularon utilizando perlas recubiertas con anticuerpos agonistas para CD3 y CD28, y se midió en el tiempo la expansión celular. Se aplicó un umbral para una expansión superior a cinco veces durante la expansión de prueba (que se asocia con una probabilidad elevada de expansión clínica con éxito) para estratificar el análisis en muestras que «tienen éxito en» la expansión y las que «no tienen éxito en» la expansión. Estas categorías representaron aquellas muestras de pacientes que serían aptas o no aptas, respectivamente, para la inclusión en los ensayos clínicos.

10 LLA vs LNH

15 Casi un 80 % de los pacientes con LLA alcanzaron este umbral en el diagnóstico, donde las tasas de éxito declinaron lentamente durante el transcurso de la terapia y alcanzaron ~40 % durante la fase de mantenimiento (Fig. 22A). En claro contraste estuvieron las células recogidas de pacientes con LNH, que demostraron una expansión deficiente, donde tan solo un 25 % tuvo éxito en el diagnóstico, y pocas muestras (12,5 % de todos los puntos temporales restantes) demostraron alguna expansión después del inicio de la terapia (Fig. 22A). La diferencia en las tasas de éxito entre las muestras de leucemia y linfoma fue significativa en todos los puntos temporales (la Tabla 12 muestra los resultados del análisis estadístico).

Tabla 12 – Análisis estadístico de los datos de las FIG. 22A-22F, con los valores significativos subrayados.

	% con éxito en la expansión de prueba	Recuento de linfocitos T absoluto	
Leucemia vs. Linfoma	<u>0,005</u>	0,140	Antes de la quimioterapia
	<u>0,012</u>	0,490	Después de la inducción
	<u>0,025</u>	0,320	Después de la consolidación
	<u>0,012</u>	0,260	Después de la intensificación retrasada
	<u>0,025</u>	0,060	Después del mantenimiento intermedio
	<u>0,003</u>	0,360	Mantenimiento
LLA-RE vs. LLA-RA/RMA	0,210	0,314	Antes de la quimioterapia
	0,120	0,470	Después de la inducción
	<u>0,003</u>	<u>0,009</u>	Después de la consolidación
	<u>0,007</u>	<u>0,008</u>	Después de la intensificación retrasada
	<u>0,012</u>	0,275	Después del mantenimiento intermedio
	<u>0,023</u>	0,004	Mantenimiento

20 Riesgo estándar vs riesgo alto/muy alto

25 La estratificación de las muestras de LLA en los grupos de RE y RA/RMA NCI reveló que los linfocitos T de pacientes con LLA-RE demostraron una capacidad de expansión robusta y mantenida, con una disminución inicial en la primera parte de la terapia y una disminución modesta durante la fase de mantenimiento (Fig. 22B). Aunque las muestras de LLA-RA/RMA se expandieron bien en la primera parte de la terapia, las tasas de éxito descendieron rápidamente después de la fase de consolidación (Fig. 22B), lo que dio como resultado diferencias estadísticamente significativas en la tasa de éxito en la expansión de prueba en comparación con LLA-RE (Tabla 12).

30 Recuento de linfocitos T

35 El recuento de linfocitos absoluto (RLA) de la sangre periférica en el momento de la recogida fue más elevado en la primera parte de la terapia y disminuyó después de la consolidación (FIG. 22C y 22E). El recuento de linfocitos absoluto no fue diferente entre los pacientes con leucemia y linfoma, ni fue un componente predictivo de la función de los linfocitos T. La relación entre el RTA y el potencial de expansión se estudió para evaluar si esta diferencia funcional observada era simplemente un reflejo de la variabilidad de la cantidad de linfocitos T. El recuento de linfocitos T absoluto de la sangre periférica en el momento de la recogida de los pacientes que tuvieron éxito o no tuvieron éxito en cuanto a superar el umbral de expansión *in vitro* de 5 veces fue generalmente más elevado en la primera parte de la terapia (FIG. 22D y 22F). El RTA para las muestras de leucemia disminuyó después de la inducción hasta la terapia de mantenimiento (Fig. 22F), lo que demuestra una tendencia similar a las tasas de expansión. Las muestras de linfoma en algunos puntos temporales tuvieron un recuento de linfocitos T periféricos modesto (de 300 a 400 células/mL); sin embargo, incluso durante estos

ciclos, los linfocitos T demostraron una expansión deficiente. Aunque las muestras de leucemia demostraron una expansión significativamente mayor en comparación con el linfoma durante la terapia (Fig. 22A), no se observaron tales diferencias estadísticas en el RTA entre estas dos enfermedades. El examen de las muestras de LLA estratificadas según el grupo de riesgo demostró una disminución progresiva en el RTA de LLA-RE con un descenso significativo después de la intensificación retrasada (Fig. 24). Esta disminución progresiva en el RTA se correlacionó con la disminución progresiva en la expansión (Fig. 22B). El RTA de LLA-RA/RMA experimentó una aguda disminución después de la terapia de consolidación, que se correlacionó con la abrupta disminución en la expansión después de la consolidación (Fig. 22B). El RTA de LLA-RA/RMA permaneció bajo durante el resto de la terapia, donde el potencial de expansión demostró una disminución progresiva. Estos descubrimientos sugieren que en la LLA, el RTA puede tener cierta relevancia en el potencial de expansión; sin embargo esta asociación no se correlacionó directamente en cada ciclo. Para el LNH, el RTA parece no tener relevancia en el potencial de expansión.

Linfocitos T de linaje temprano asociados con una mayor expresión

Ya que la cantidad de linfocitos T no se asoció con la expansión en el LNH y tuvo solo una correlación general en la LLA, se evaluaron los fenotipos de memoria presentes en estas muestras como posibles contribuyentes a las diferencias funcionales observadas. Los linajes celulares se definieron mediante diversos patrones de marcadores de la superficie celular como se describe en el presente documento. El análisis se dividió en tres grupos de comparación, mostrados sobre cada columna en la Fig. 23 (éxito frente a sin éxito, Fig. 23A-23E; leucemia frente a linfoma, Fig. 23F-23J; LLA-RE frente a LLA-RA/RMA, Fig. 23K-23O).

La comparación de las muestras que tuvieron éxito en la expansión de prueba con las que no lo tuvieron (Fig. 23A-23E) reveló que el éxito de la expansión se asoció con un enriquecimiento significativo de linfocitos TN en todos los puntos temporales excepto después de la intensificación retrasada y el enriquecimiento en linfocitos TSCM en todos los puntos temporales excepto en el diagnóstico y después de la intensificación retrasada (Fig. 23A-23B). El recuento de TN disminuyó progresivamente durante la terapia tanto en las muestras que tuvieron éxito como las que no lo tuvieron, mientras que el recuento de TSCM permaneció relativamente estable. Las muestras que tuvieron éxito también estuvieron enriquecidas en TCM en la primera parte de la terapia (Fig. 23C) y linfocitos TEM en un punto temporal único (Fig. 23D); el recuento de Teff fue relativamente equivalente en ambos grupos (Fig. 23E). Este patrón general sugirió que las muestras que tenían éxito en la expansión de prueba estaban significativamente enriquecidas en fenotipos de linaje temprano en comparación con las que no tuvieron éxito después de casi cada ciclo de quimioterapia.

Las Figuras 23F-23J reflejan los fenotipos de linfocitos T que constituyen los RTA representados en la Fig. 22F. Hubo un enriquecimiento significativo de linfocitos TN en las muestras de LLA en el diagnóstico, después de la intensificación retrasada y durante el mantenimiento, y un enriquecimiento significativo de linfocitos TSCM después de todos los ciclos excepto después de la inducción y mantenimiento intermedio. Por el contrario, las muestras de linfoma tuvieron un recuento bajo de TN y TSCM durante la terapia, con una conservación relativa de los fenotipos de memoria y efectores (Fig. 23H-23J), lo que sugiere que la población de linfocitos T circulantes en los pacientes con linfoma está compuesta principalmente por linfocitos T diferenciados con un potencial de expansión limitado y pocos subtipos de linaje temprano incluso en el diagnóstico. Las muestras de LLA estuvieron enriquecidas en células de linaje temprano, lo que se correlaciona con una mejor expansión durante la terapia.

El análisis de las muestras de pacientes con LLA se dividió en LLA-RE y LLA-RA/RMA. Estos estudios fenotípicos, reflejan ahora los datos de expansión y RTA representados en las Fig. 22B y 24, respectivamente, que demuestran que en ambas poblaciones los linfocitos TN están elevados inicialmente pero demuestran una acusada disminución durante la terapia; para LLA-RE, esta disminución ocurrió después de la intensificación retrasada y para LLA-RA/RMA, esta ocurrió después de la consolidación (Fig. 23K). Esta variación en el momento de la disminución de TN dio como resultado una diferencia significativa en el recuento de TN absoluto después de la consolidación y después del mantenimiento intermedio; esta significación se perdió cuando el recuento de TN en LLA-RE disminuyó después de la intensificación retrasada. El momento de la depleción del recuento de linfocitos TN se correlaciona directamente con el momento de la disminución en RTA demostrado en la Fig. 24. Por otra parte, los linfocitos TSCM permanecieron relativamente estables en las muestras de LLA-RE, aunque disminuyeron progresivamente en las muestras de LLA-RA/RMA (Fig. 23L). Esta disminución de nuevo dio como resultado una diferencia significativa después de la consolidación y mantenimiento intermedio que se perdió después de la intensificación retrasada. La Figura 22B demostró una diferencia significativa en la expansión que también surgió (y se mantuvo) después de la consolidación, congruente con las diferencias observadas en el recuento de linfocitos TN y TSCM, lo que sugiere que la depleción de estas células de linaje temprano anuló la expansión con éxito. El examen de las tendencias en células con un linaje más tardío reveló varias observaciones adicionales. El recuento de TCM permaneció relativamente estable en las muestras de LLA-RE y demostró una disminución después de la intensificación retrasada en las muestras de LLA-RA/RMA, pero esta disminución no se mantuvo (Fig. 23M). El recuento de linfocitos TEM fue bajo durante la terapia en los grupos de ambas enfermedades, con un grado de variabilidad elevado (Fig. 23N). Finalmente, el recuento de linfocitos Teff demostró una disminución progresiva en las muestras de LLA-RE pero permaneció relativamente estable en las muestras de LLA-RA/RMA (Fig. 23O; para los resultados del análisis estadístico, véase la Tabla 13). Los resultados de los tres grupos de comparación se resumen en la Tabla 9.

5 Tanto LLA-RE como -RA/RMA comenzaron con un recuento de células de linaje temprano equivalente en el diagnóstico y el patrón de la depleción condujo al examen de las pautas quimioterápicas administradas. Se administraron dos agentes, ciclofosfamida y citarabina, a cada grupo de riesgo en los momentos de la disminución observada en linfocitos TN; concretamente los pacientes con LLA-RE los recibieron durante la intensificación retrasada y los pacientes con LLA-RA/RMA los recibieron con la consolidación. Estos agentes no se administraron en ningún otro momento en ninguno de los protocolos de tratamiento, y no se asociaron otros agentes con esta depleción constante y específica.

Tabla 13 – Análisis estadístico de los datos de las Fig. 23A-23O (todos los valores significativos subrayados)

		Antes de la quimioterapia	Después de la inducción	Después de la consolidación	Después del mantenimiento intermedio	Después de la intensificación retrasada	Mantenimiento	
Éxito	2A	<u>0,022</u>	<u>0,047</u>	<u>0,029</u>	<u>0,003</u>	0,143	<u>0,004</u>	Virgenes
	2B	<u>0,278</u>	<u>0,040</u>	<u>0,023</u>	<u>0,046</u>	0,730	<u>0,003</u>	SCM
	2C	<u>0,045</u>	<u>0,008</u>	<u>0,027</u>	0,074	0,839	0,054	CM
	2D	<u>0,071</u>	<u>0,016</u>	0,371	0,404	<u>0,635</u>	<u>0,336</u>	EM
	2E	<u>0,060</u>	<u>0,260</u>	<u>0,169</u>	<u>0,131</u>	<u>0,395</u>	<u>0,136</u>	TE
Leucemia	2F	<u>0,010</u>	<u>0,215</u>	<u>0,124</u>	<u>0,173</u>	<u>0,004</u>	<u>0,0004</u>	Virgenes
	2G	<u>0,020</u>	<u>0,124</u>	<u>0,021</u>	<u>0,079</u>	<u>0,006</u>	<u>0,0009</u>	SCM
	2H	<u>0,108</u>	<u>0,755</u>	<u>0,178</u>	<u>0,033</u>	<u>0,061</u>	<u>0,117</u>	CM
Linfoma	2I	<u>0,083</u>	<u>0,303</u>	<u>0,770</u>	<u>0,222</u>	<u>0,074</u>	<u>0,016</u>	EM
	2J	<u>0,0002</u>	<u>0,0002</u>	<u>0,004</u>	<u>0,074</u>	<u>0,007</u>	<u>0,000</u>	TE
LLA-RE	2K	<u>0,456</u>	<u>0,600</u>	<u>0,005</u>	<u>0,001</u>	<u>0,066</u>	<u>0,5</u>	Virgenes
	2L	<u>0,355</u>	<u>0,527</u>	<u>0,004</u>	<u>0,025</u>	<u>0,386</u>	<u>0,423</u>	SCM
LLA-RA/RMA	2M	<u>0,791</u>	<u>0,809</u>	<u>0,0002</u>	<u>0,076</u>	<u>0,415</u>	<u>0,512</u>	CM
	2N	<u>0,300</u>	<u>0,041</u>	<u>0,014</u>	<u>0,000</u>	<u>0,174</u>	<u>0,5</u>	EM
	2O	<u>0,400</u>	<u>0,000</u>	<u>0,200</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,00</u>	TE

10 Enriquecimiento de la expansión rescatada de linfocitos TSCM

15 Se ha pensado que el enriquecimiento de la población de TSCM mediante la adición de citocinas IL-7 e IL-15 refuerza los fenotipos de linfocitos T menos maduros. Dada la asociación entre las células de linaje temprano y la expansión, se evaluó el efecto de estas citocinas en el fenotipo y capacidad de expansión de las células. Se recogieron las muestras y se dividieron en dos cultivos, uno con citocinas y otros sin ellas. Este análisis se estratificó solo por el tipo de enfermedad, no por la categoría de riesgo o el ciclo de terapia. Para referencia, el análisis incluyó el porcentaje de todas las muestras que tuvieron éxito en la expansión de prueba para cada grupo de enfermedad, lo que incluyó todas las muestras recogidas previamente que no fueron parte de los experimentos de cultivo dividido (es decir, las muestras analizadas en las Figs. 22A-22B, 22F, 24 y 23A-23O).

20 Las muestras recogidas de pacientes con leucemia y linfoma demostraron un enriquecimiento significativo en poblaciones de TSCM después del cultivo con IL-7 e IL-15 (Fig. 25A; para los resultados del análisis estadístico, véase la Tabla 14). Esta expansión de TSCM se produjo a expensas de casi todos los demás tipos celulares, con la excepción de un aumento en la población de Teff en las muestras de leucemia. Este aumento en linfocitos TSCM se asoció con una mayor expansión en muestras tanto de leucemia como de linfoma (Fig. 25B). Esta mayor expansión fue más pronunciada en muestras de pacientes con linfoma, que demostraron una mejora estadísticamente significativa ($P = 0,003$), que refleja una tasa de éxito global de un 57,7 % cuando se enriquecieron en linfocitos TSCM y una tasa de éxito de un 15,3 % cuando se cultivaron sin citocinas. Esta tasa de éxito se acercó a la demostrada por las muestras de leucemia (60,3 %).

30 Tabla 14 - Análisis estadístico de los datos presentados en las Fig. 25A-25B, todos los valores significativos están subrayados

	Todas las muestras	Leucemia	Linfoma
Virgenes	0,12	0012	0455
SCM	<u>0009</u>	<u>0023</u>	<u>0001</u>
CM	<u>0041</u>	0112	0097
EM	0275	0179	0172
TE	0345	<u>0006</u>	0386

Tabla 9 - Resumen de las diferencias significativas en las Fig. 23A-23O (las * representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de comparación, representados en la izquierda. SCM, linfocitos T de memoria central madre; CM, linfocitos T de memoria central; EM, linfocitos T de memoria efectores; Teff, linfocitos T efectores terminales.)

		Vírgenes	SCM	CM	EM	TE
Éxito vs sin éxito	Antes de la quimioterapia					
	Después de la inducción	*	*	*	*	
	Después de la consolidación	*	*	*		
	Después del mantenimiento intermedio	*	*			
	Después de la intensificación retrasada					
	Mantenimiento	*	*			
LLA vs LNH	Antes de la quimioterapia	*	*			*
	Después de la inducción					*
	Después de la consolidación		*			
	Después del mantenimiento intermedio			*		
	Después de la intensificación retrasada	*	*			
	Mantenimiento	*	*			
LLA-RE vs LLA-RA/RMA	Después de la quimioterapia					
	Después de la inducción				*	*
	Después de la consolidación	*	*	*	*	
	Después del mantenimiento intermedio	*	*			
	Después de la intensificación retrasada					
	Mantenimiento					

5

Conclusiones

El análisis de la LLA se estratificó en enfermedad de riesgo estándar (LLA-RE) y riesgo alto/muy alto (LLA-RA/RMA). Las muestras de LLA-RE mantuvieron una expansión robusta hasta una parte tardía en la terapia, mientras que las muestras de RA/RMA demostraron una expansión inicial con éxito que disminuyó de manera acusada en asociación con la administración de ciclofosfamida y citarabina. Parece que la ciclofosfamida y citarabina provocaron la depleción selectiva de linfocitos TN en ambos grupos de riesgo de LLA, que se correspondió con la disminución en la expansión de linfocitos T en LLA-RA/RMA. El cultivo con interleucina-7 (IL-7) e IL-15 exógenas durante la expansión aumentó significativamente el recuento de linfocitos TSCM, y este enriquecimiento mejoró significativamente la capacidad de expansión de los linfocitos T de linfoma.

Los pacientes con LLA de riesgo estándar tuvieron una expansión de linfocitos T mejorada en comparación con los pacientes con LLA de riesgo alto o riesgo muy alto. Los pacientes con linfoma tuvieron una expansión de linfocitos T deficiente durante la terapia. Los pacientes con poblaciones de linfocitos T enriquecidas en células de linaje temprano se expandieron mejor *in vitro* y los pacientes con LLA tuvieron una cantidad mayor de estas células con una mejora correspondiente en la expansión en comparación con células de pacientes con LNH. El examen de los fenotipos de los linfocitos T reveló que los pacientes con LLA tuvieron conjuntos de linfocitos TN y TSCM (células de linaje temprano) enriquecidos, mientras que los de linfoma tuvieron un recuento de células de linaje temprano muy bajo. Asimismo, poblaciones mayores de células vírgenes y de memoria central madre se correlacionaron con una mejor capacidad de expansión. Las células vírgenes y de memoria central madre sufrieron una depleción después de la intensificación retrasada en LLA de riesgo estándar y sufrió una depleción antes (después de la consolidación) en LLA de riesgo alto y muy alto. Las muestras con éxito a la expansión produjeron una población de aproximadamente un 50 % de TCM, mientras que las que no tuvieron éxito produjeron un producto celular que fue aproximadamente un 55 % de TEM y Teff, con un conjunto de Teff dos veces mayor que las que tuvieron éxito (19,6 % vs. 10,5 %). Véase la Figura 26. La población de TCM presente al final de la expansión de linfocitos T procedió principalmente de linfocitos TN y TSCM. Las células de linaje temprano sufrieron una depleción selectiva debida a la quimioterapia con ciclofosfamida y citarabina y ese cultivo con interleucina-7 (IL-7) e IL-15 enriqueció en células de linaje temprano seleccionadas y rescató la capacidad de expansión de los linfocitos T. Basándose en los resultados, la ciclofosfamida y citarabina es probable que sean las principales responsables de la depleción de linfocitos T con una elevada capacidad proliferativa. Las células de linaje

5 temprano son una gran ayuda para la aptitud de los linfocitos T para la expansión, y el enriquecimiento de esta población ya sea mediante la programación de la recogida de linfocitos T o mediante el método de cultivo puede aumentar el número de pacientes aptos para recibir terapias celulares modificadas sumamente activas. La recogida de linfocitos T antes de los ciclos que incluyen estos agentes aumentó la probabilidad de que estos pacientes fueran aptos para la terapia celular. Los resultados descritos en el presente documento proporcionan maneras de optimizar la expansión de las células terapéuticas ex vivo y de mejorar la persistencia de las células (p. ej., mediante la selección y mantenimiento de los linfocitos T).

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la idoneidad de una población de células efectoras inmunitarias para su uso en una terapia con CAR, que comprende
- 5 (i) proporcionar una población de células efectoras inmunitarias a partir de un sujeto pediátrico que padece una leucemia, en donde la población de células efectoras inmunitarias se adquiere antes de que se le haya administrado al sujeto ciclofosfamida y/o citarabina; y
- 10 (ii) evaluar dicha población para dictar la presencia de al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central, en donde la presencia de al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central es indicativo de la idoneidad de la población de células efectoras inmunitarias para su uso en la terapia con CAR.
2. Una población de células efectoras inmunitarias que expresa una molécula CAR («células que expresan CAR» o una «terapia con CAR») para su uso en un método para tratar leucemia en un sujeto pediátrico, o proporcionar inmunidad antitumoral a un sujeto pediátrico que padece una leucemia, en donde dicha población celular se administra en combinación con quimioterapia que comprende ciclofosfamida y/o citarabina, en donde el método comprende:
- 15 (i) adquirir células efectoras inmunitarias del sujeto pediátrico antes de que se le haya administrado al sujeto ciclofosfamida y/o citarabina;
- 20 (ii) seleccionar una población de dichas células efectoras inmunitarias que incluye al menos un 20 % de linfocitos T vírgenes, al menos un 2 % de linfocitos T de memoria central madre y/o al menos un 4 % de linfocitos T de memoria central;
- (iii) introducir en la población de células efectoras inmunitarias un ácido nucleico que codifica una molécula CAR;
- 25 y
- (iv) administrar una cantidad eficaz de la población de células efectoras inmunitarias que expresa la molécula CAR al sujeto pediátrico.
3. La población de células efectoras inmunitarias para uso de la reivindicación 2, en donde la molécula CAR es un CAR CD19, opcionalmente en donde la molécula CAR comprende una secuencia de acuerdo con la Tabla 1 o Tabla 4.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, o la población de células efectoras inmunitarias para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde el sujeto tiene una edad de 18 años o menos (p. ej., 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o menos).
- 35 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, o la población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 o 4, en donde:
- (i) la leucemia se elige entre una o más de: leucemia linfocítica aguda de linfocitos B (LLA-B), leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (LLA-T), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia promielocítica de linfocitos B y tricoleucemia, p. ej., LLC o LLA;
- 40 (ii) el sujeto se clasifica como uno que padece LLA de riesgo estándar, riesgo alto o riesgo muy alto; y/o
- (iii) el sujeto no padece un cáncer en recaída.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 5, en donde la adquisición de la población de células efectoras inmunitarias ocurre antes de la administración de quimioterapia al sujeto.
- 45 7. La población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde la adquisición de la población de células efectoras inmunitarias ocurre
- (i) antes de la administración de quimioterapia al sujeto;
- 50 (ii) antes de que el sujeto se haya sometido a 2, 3, 4 o 5 ciclos de quimioterapia; o
- (iii) después de que el sujeto se haya sometido a 1 ciclo de quimioterapia, pero antes de que el sujeto se haya sometido a más de 1 ciclo (p. ej., más de 1, 2, 3, 4 o 5 ciclos) de quimioterapia.
8. La población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 7, en donde la quimioterapia o ciclo de quimioterapia comprende uno o más de un ciclo de inducción, de consolidación, de mantenimiento intermedio, de intensificación retrasada o de terapia de mantenimiento, opcionalmente en donde:
- 55 (i) la población de células efectoras inmunitarias se adquiere del sujeto antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de consolidación de quimioterapia o un ciclo de inducción de quimioterapia;
- (ii) la población de células efectoras inmunitarias se adquiere del sujeto antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de consolidación de quimioterapia;
- 60 (iii) el sujeto se clasifica como uno que padece un cáncer (p. ej., LLA) de riesgo alto o riesgo muy alto y las células se recolectan antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de consolidación;
- (iv) la población de células efectoras inmunitarias se adquiere del sujeto antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de intensificación retrasada; o
- 65 (v) el sujeto se clasifica como uno que padece un cáncer (p. ej., LLA) de riesgo alto o riesgo muy alto y las células se recolectan antes de que el sujeto se haya sometido a un ciclo de intensificación retrasada.

9. La población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, 7 u 8, en donde la quimioterapia comprende una o más de vincristina, dexametasona, PEG-L-asparaginasa, daunorrubicina, 6-mercaptapurina, metotrexato, doxorubicina, 6-tioguanina y/o prednisona.
- 5
10. La población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 7-9, en donde uno o más fármacos o ciclos de quimioterapia se eligen entre:
- (a) para el tratamiento de LLA de riesgo estándar:
- 10
- i. inducción - 6 mg/m² de vincristina, 6 mg/m² de dexametasona, 2500 U/m² de PEG-L-asparaginasa;
- ii. consolidación - 1,5 mg/m² de vincristina, 75 mg/m² de 6-mercaptapurina;
- iii. mantenimiento intermedio - 7,5 mg/m² de vincristina, 500 mg/m² de metotrexato;
- iv. intensificación retrasada - 4,5 mg/m² vincristina, 10 mg/m² de dexametasona, 75 mg/m² de doxorubicina, 2500 U/m² de PEG-L-asparaginasa, 1 g/m² de ciclofosfamida, 60 mg/m² de citarabina, 60 mg/m² de 6-tioguanina;
- 15
- v. mantenimiento intermedio II - 7,5 mg/m² de vincristina, 500 mg/m² de metotrexato; y
- vi. mantenimiento - 1,5 mg/m² de vincristina, 6 mg/m² de dexametasona, 75 mg/m² de 6-mercaptapurina, 20 mg/m² de metotrexato; o
- (b) para el tratamiento de LLA de riesgo alto:
- i. inducción - 6 mg/m² de vincristina, 6 mg/m² de dexametasona, 2500 U/m² de PEG-L-asparaginasa, 100 mg/m² de daunorrubicina;
- 20
- ii. consolidación - 1,5 mg/m² de vincristina, 60 mg/m² de 6-mercaptapurina, 1 g/m² de ciclofosfamida, 75 mg/m² de citarabina, 2500 mg/m² de PEG-L-asparaginasa;
- iii. mantenimiento intermedio - 7,5 mg/m² de vincristina, 20 mg/m² de metotrexato, 25 mg/m² de 6-mercaptapurina;
- iv. intensificación retrasada - 7,5 mg/m² de vincristina, 10 mg/m² de dexametasona, 75 mg/m² de doxorubicina, 5000 U/m² de PEG-L-asparaginasa, 1 g/m² de ciclofosfamida, 60 mg/m² de citarabina, 60 mg/m² de 6-tioguanina;
- 25
- y
- v. mantenimiento - 1,5 mg/m² de vincristina, 40 mg/m² de prednisona, 75 mg/m² de 6-mercaptapurina, 20 mg/m² de metotrexato;
- o en donde la quimioterapia comprende un fármaco y pauta posológica de acuerdo con (a) o (b).
- 30
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4-6, o la población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 7-10, en donde:
- (i) la población de células efectoras inmunitarias adquirida comprende un recuento absoluto de linfocitos T de al menos 400 células/microlitro, un recuento absoluto de linfocitos T vírgenes de al menos 200 células/microlitro, un recuento absoluto de linfocitos T de memoria central madre de al menos 20 células/microlitro y/o un recuento
- 35
- absoluto de linfocitos T de memoria central de al menos 40 células/microlitro;
- (ii) la población de células efectoras inmunitarias adquirida se selecciona basándose en la expresión de uno o más marcadores, p. ej., CCR7, CD62L, CD45RO y CD95, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T) es CCR7+ y CD62L+; y/o
- 40
- (iii) los linfocitos T vírgenes se identifican basándose en un patrón de expresión de CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95-, en donde los linfocitos T de memoria central madre se identifican basándose en un patrón de expresión de CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95+, y en donde los linfocitos T de memoria central se identifican basándose en un patrón de expresión de CCR7+, CD62L+, CD45RO+, CD95+.
- 45
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4-6 u 11, o la población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, o 7-11, en donde:
- (i) el método comprende además eliminar los linfocitos T reguladores, p. ej., linfocitos T CD25+, de la población de células inmunitarias adquiridas, para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+, opcionalmente en donde la población de células con depleción de linfocitos T reguladores contiene
- 50
- (a) menos de un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+;
- (b) menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales;
- (c) menos de un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de las células de leucemia, p. ej., células de LLC o células de LLA;
- 55
- (d) menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células de LLC; y/o
- (e) la población de células con depleción de linfocitos T reguladores contiene menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células CD25+ y menos de un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de células tumorales, p. ej., células de LLC; y/o
- 60
- (iii) la población de células efectoras inmunitarias adquirida son células de un sujeto que padece un cáncer que expresa CD25 tal como, p. ej., leucemia linfocítica crónica (LLC).
13. La población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 7-12, en donde:
- 65
- (i) el método comprende además eliminar células de la población de células efectoras inmunitarias adquirida que expresan un tumor antigénico, p. ej., un tumor antigénico que no comprende CD25, p. ej., CD19, CD30, CD38,

- CD123, CD20, CD14 o CD11b, para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., depleción de CD25+, y de células con depleción de antígenos tumorales que son adecuadas para la expresión de un CAR; y/o
- 5 (ii) el método comprende además eliminar células de la población de células efectoras inmunitarias adquiridas que expresan un inhibidor de un punto de control, p. ej., uno o más de células PD1+, células LAG3+ y células TIM3+, para proporcionar de esta manera una población de células con depleción de linfocitos T reguladores, p. ej., células con depleción de CD25+, y células con depleción de un inhibidor de un punto de control, p. ej., células con depleción de PD1+, LAG3+ y/o TIM3+.
- 10 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4-6, 11 o 12, o la población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 7-13, en donde la población de células efectoras inmunitarias adquirida se ha seleccionado en función de la expresión de uno o más marcadores, p. ej., CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO, p. ej., la población proporcionada de células efectoras inmunitarias (p. ej., linfocitos T) son CD3+ y/o CD28+.
- 15 15. La población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 7-14, en donde el método comprende transducir una célula de la población de células efectoras inmunitarias con un vector que comprende el ácido nucleico que codifica un CAR, opcionalmente en donde el método comprende además expandir la población de células efectoras inmunitarias, p. ej., modificadas para expresar un CAR, p. ej., un CAR CD19.
- 20 16. La población de células efectoras inmunitarias para uso de la reivindicación 15, en donde:
- (i) la población de células se expande durante un periodo de 8 días o menos, p. ej., 7, 6 o 5 días;
- (ii) la población de células se expande en cultivo durante 5 días y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo, opcionalmente en donde
- 25 (a) las células expandidas durante 5 días muestran al menos un aumento de una, dos, tres o cuatro veces en las duplicaciones de células después de la estimulación con el antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo; o
- (b) las células se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes muestran una producción mayor de citocinas proinflamatorias, p. ej., niveles de IFN- γ y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células
- 30 expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo; y/o
- (iii) la población de células se expande cultivando las células en presencia de un antígeno que estimula una señal asociada con el complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células, opcionalmente en donde el agente es una perla conjugada con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de este, y/o un anticuerpo anti-CD28, o un fragmento de este.
- 35 17. La población de células efectoras inmunitarias para uso de la reivindicación 15 o 16, en donde la población de células
- (i) se expande en un medio apropiado que incluye una o más interleucinas que dan como resultado un aumento de al menos 200 veces (p. ej., 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces) en células durante un periodo de expansión de 14 días, p. ej., según se mide mediante un método tal como citometría de flujo, opcionalmente en
- 40 donde la población de células se expande en presencia de una citocina, p. ej., IL-15 y/o IL-7 (p. ej., IL-15 e IL-7); y/o
- (ii) se crioconserva después del periodo de expansión.
- 45 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 4-6, 11, 12 o 14, o la población de células efectoras inmunitarias para uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 7-17, en donde el sujeto es un ser humano.

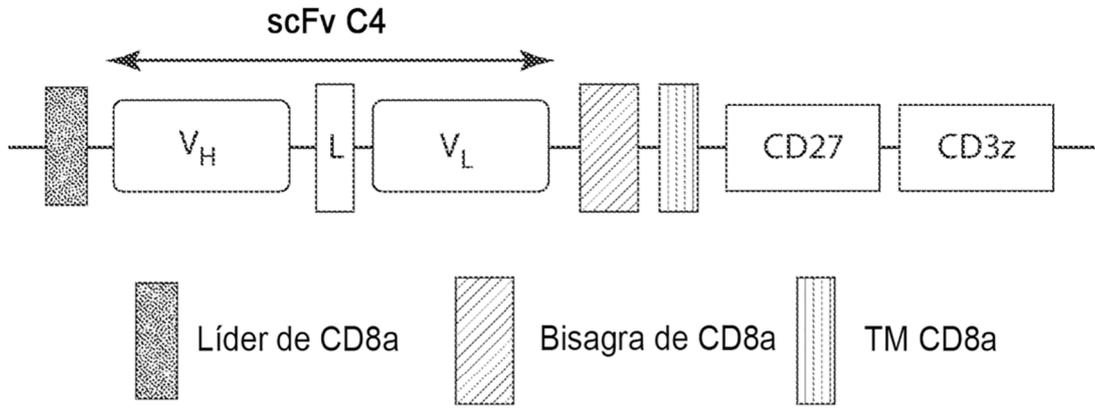


FIG. 1A

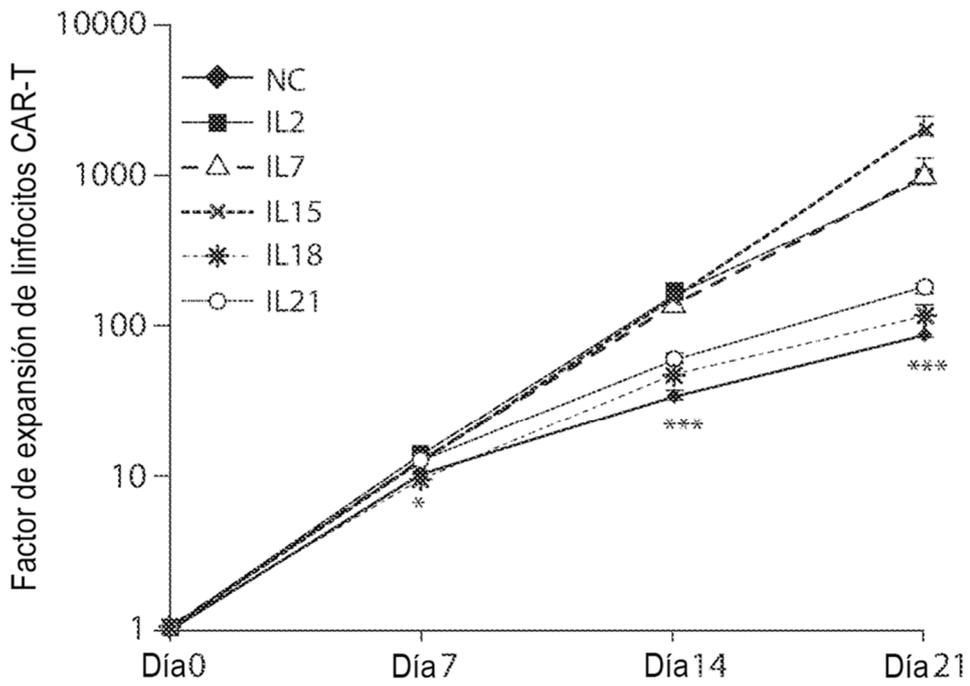


FIG. 1B

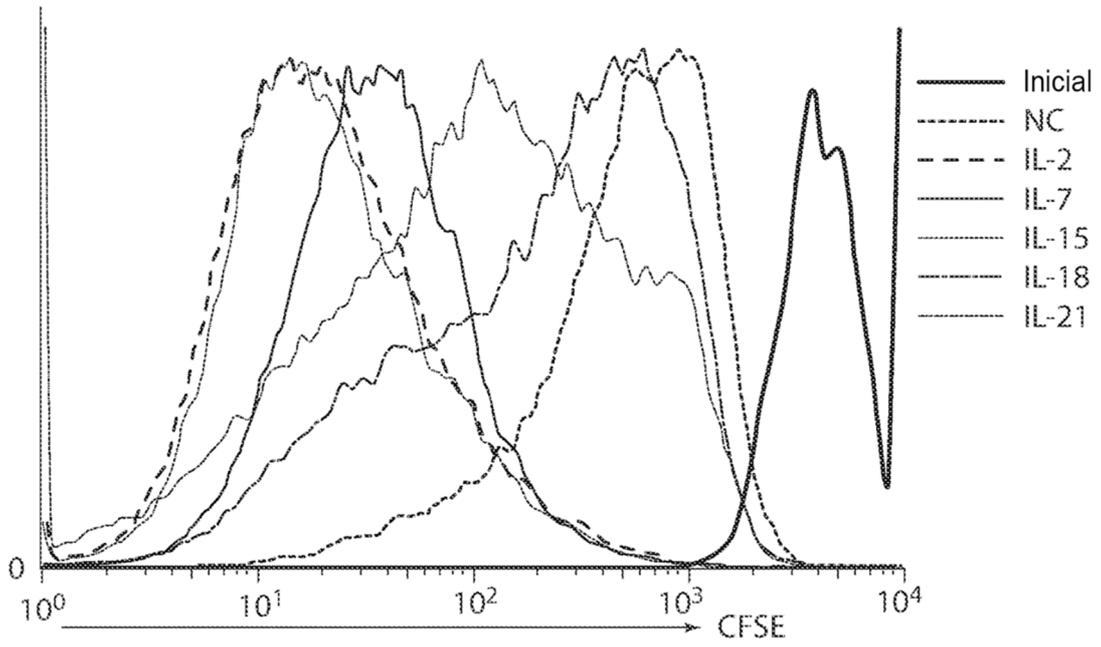


FIG. 1C

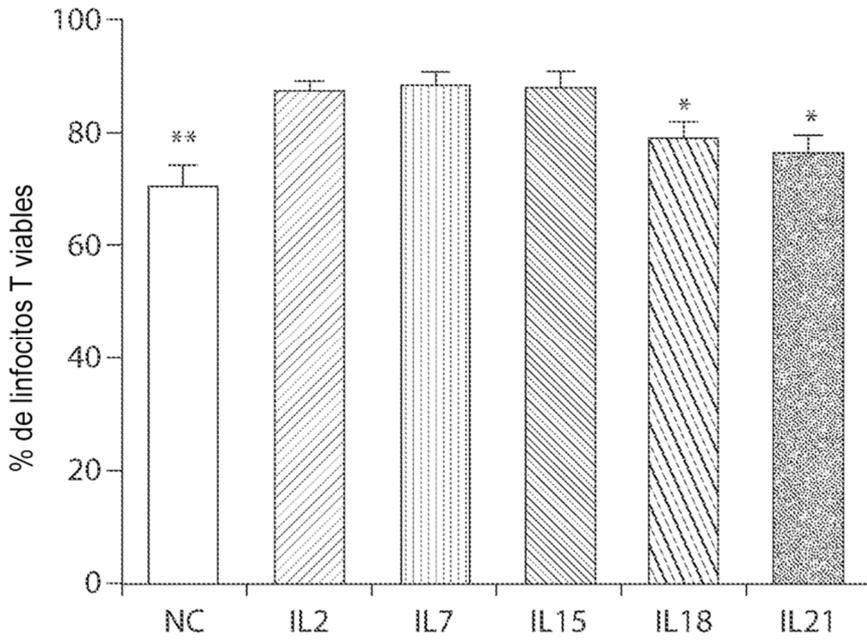


FIG. 1D

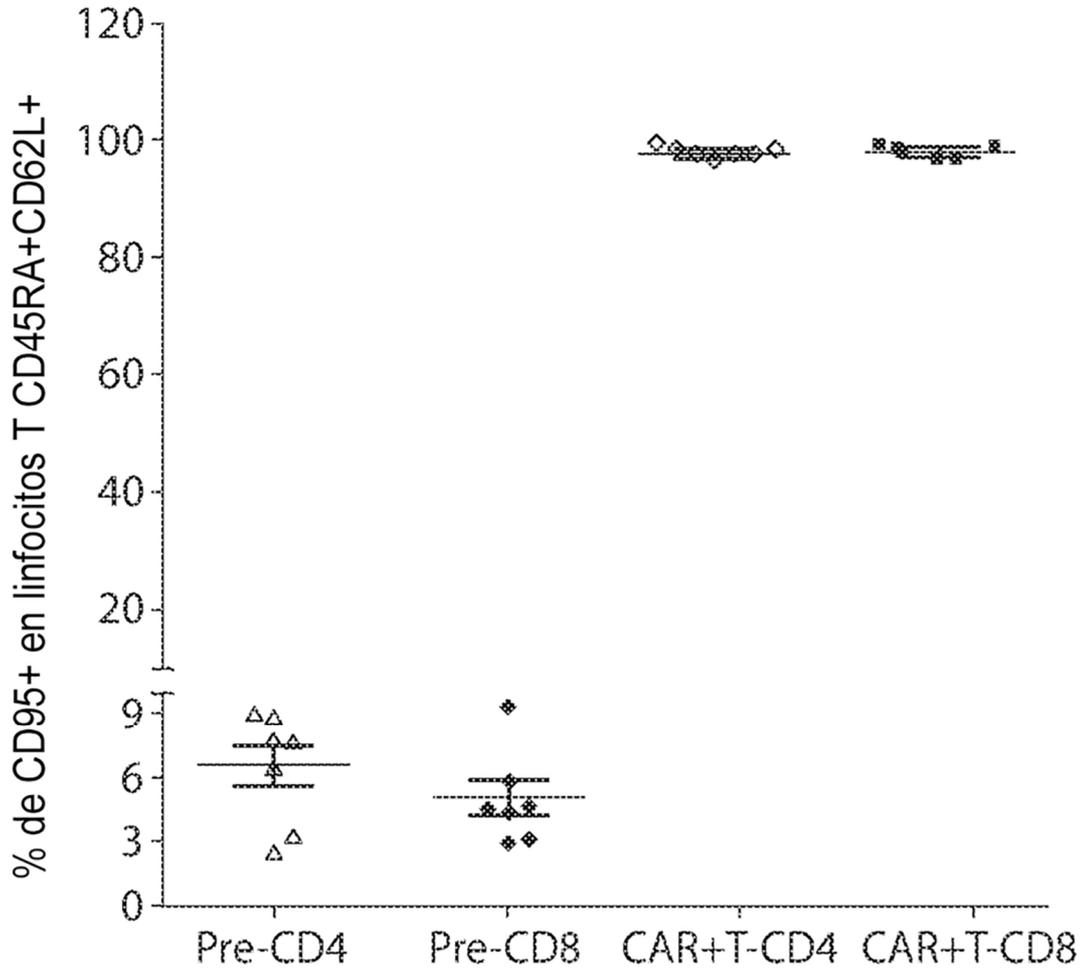


FIG. 2A

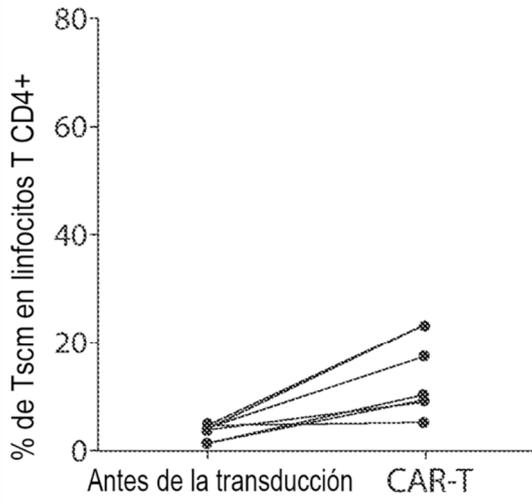


FIG. 2B

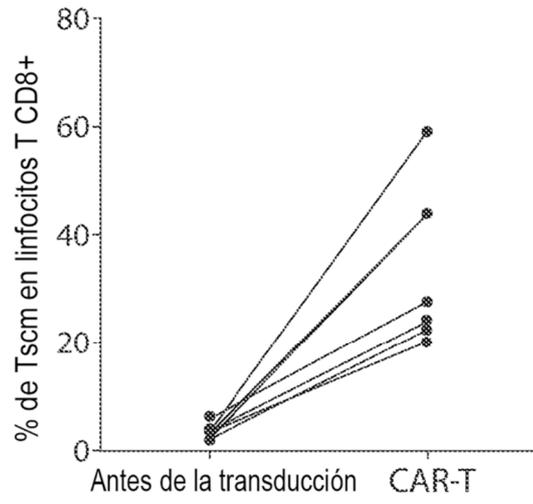


FIG. 2C

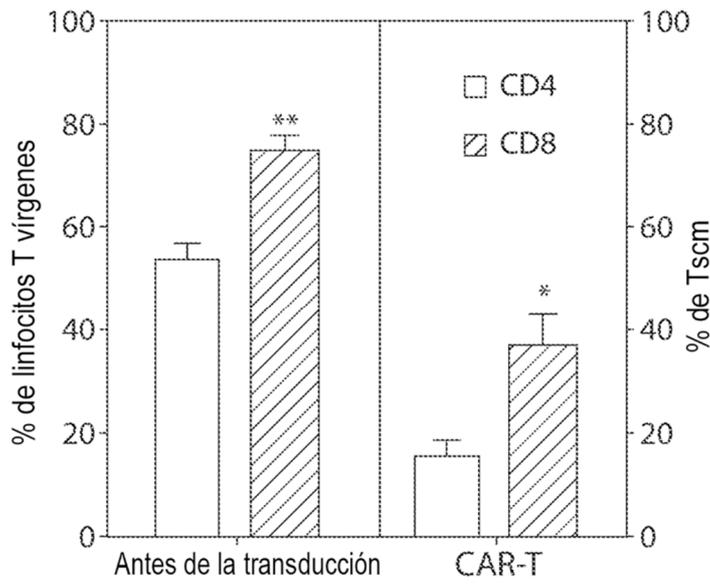


FIG. 2D

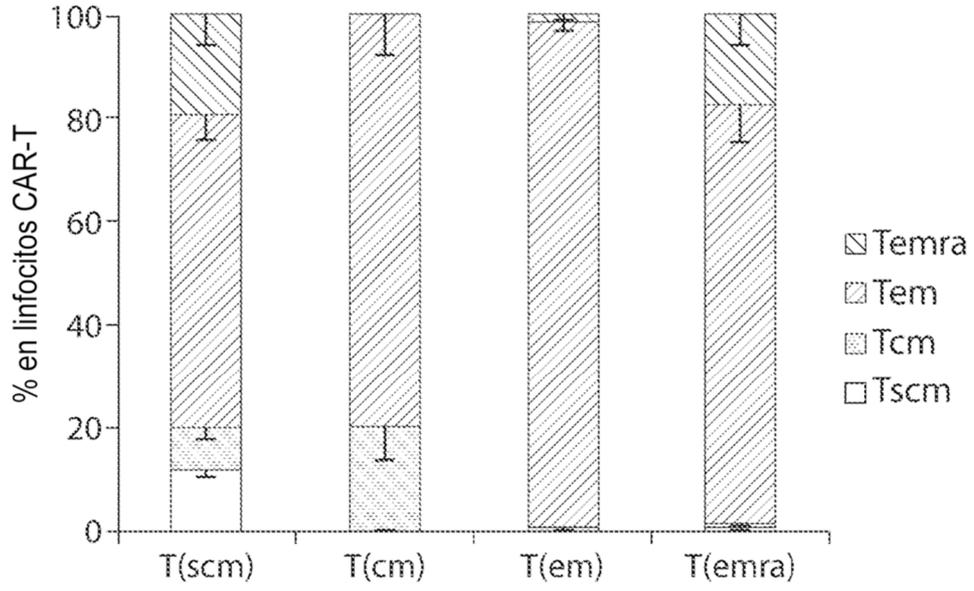


FIG. 2E

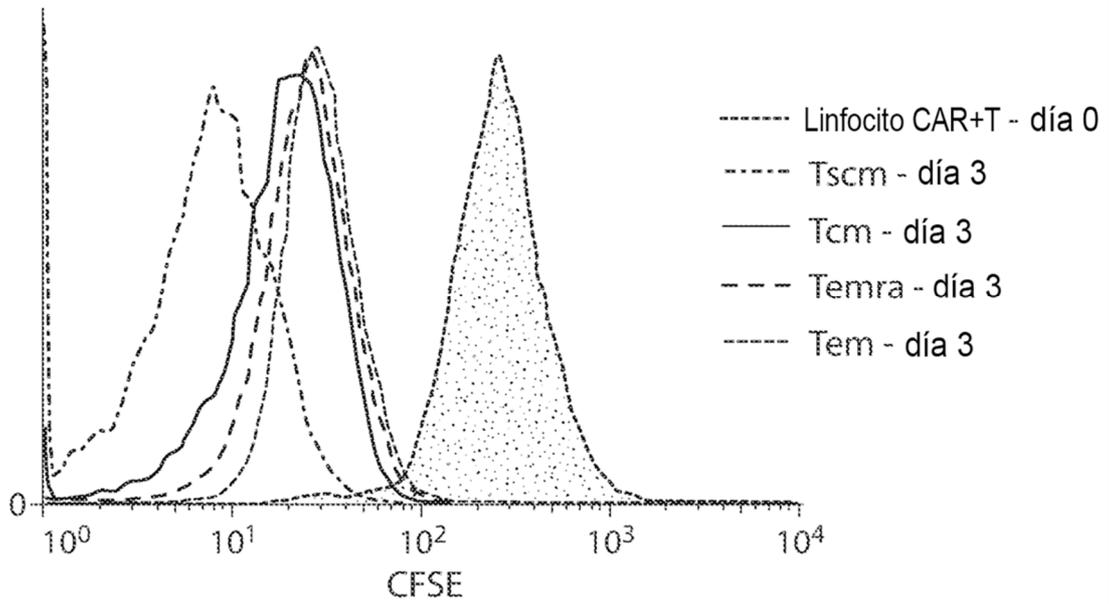


FIG. 2F

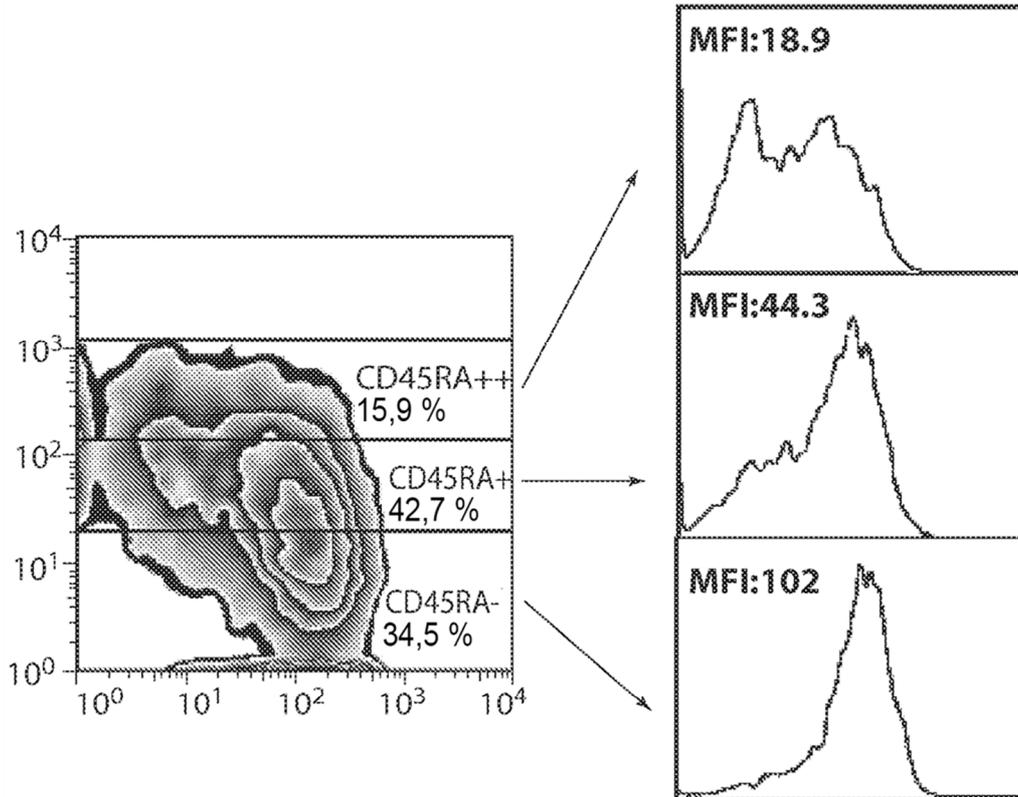


FIG. 3A

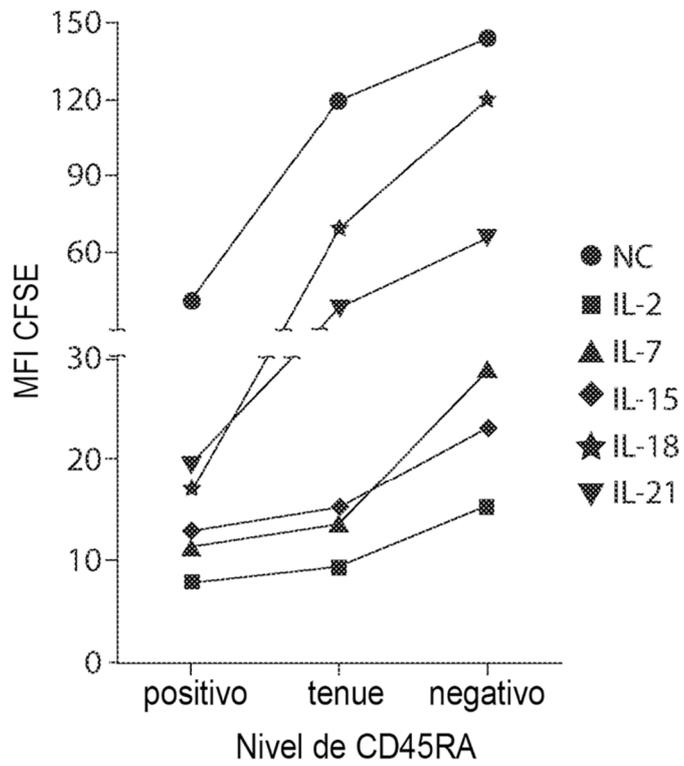


FIG. 3B

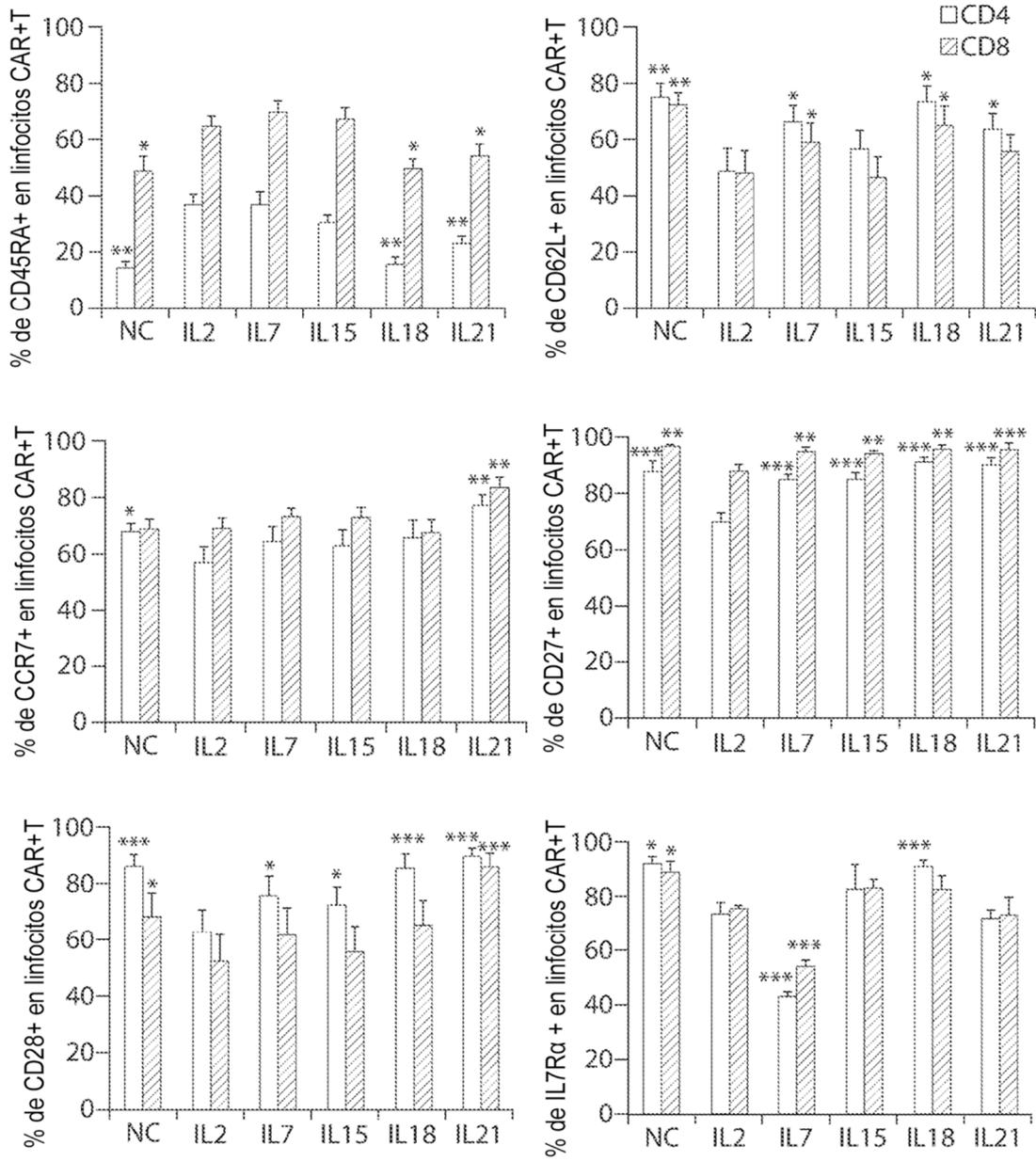


FIG. 4

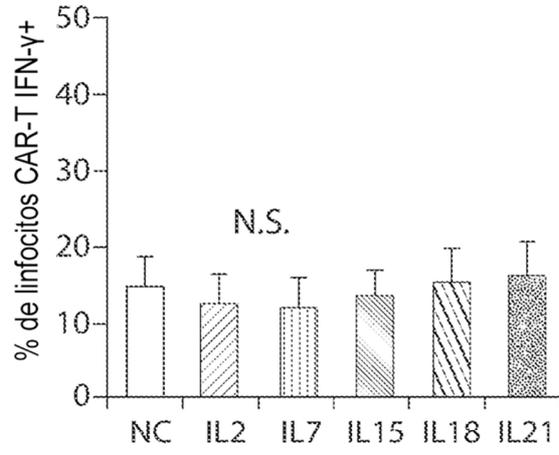


FIG. 5A

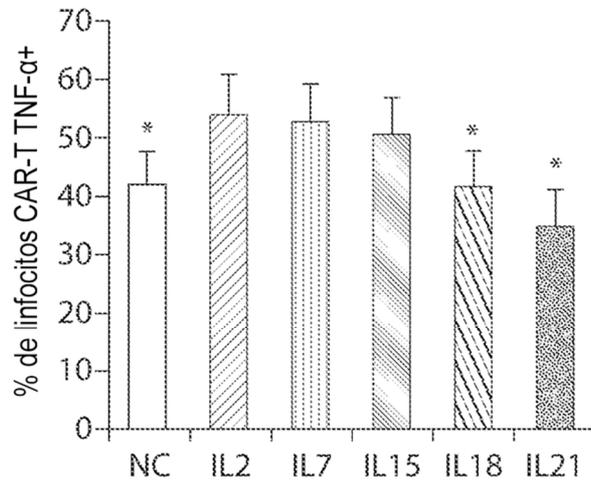


FIG. 5B

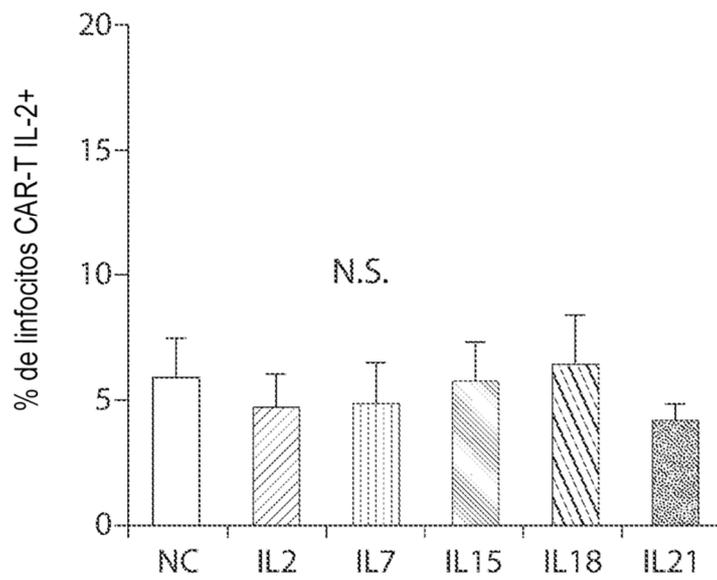


FIG. 5C

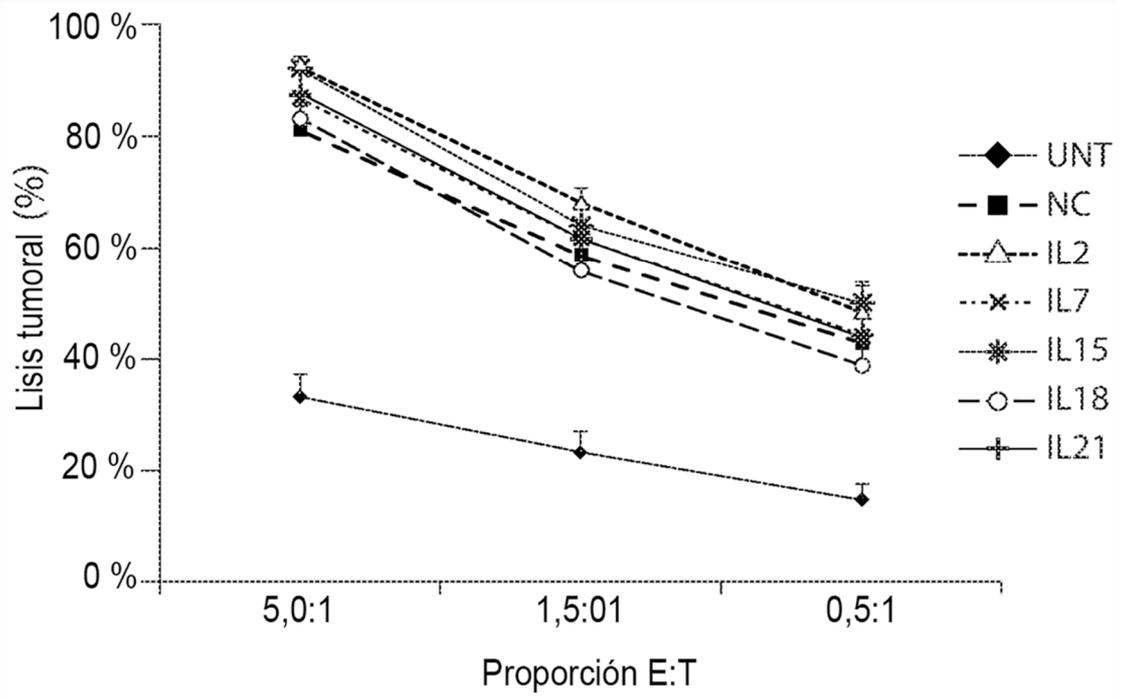


FIG. 5D

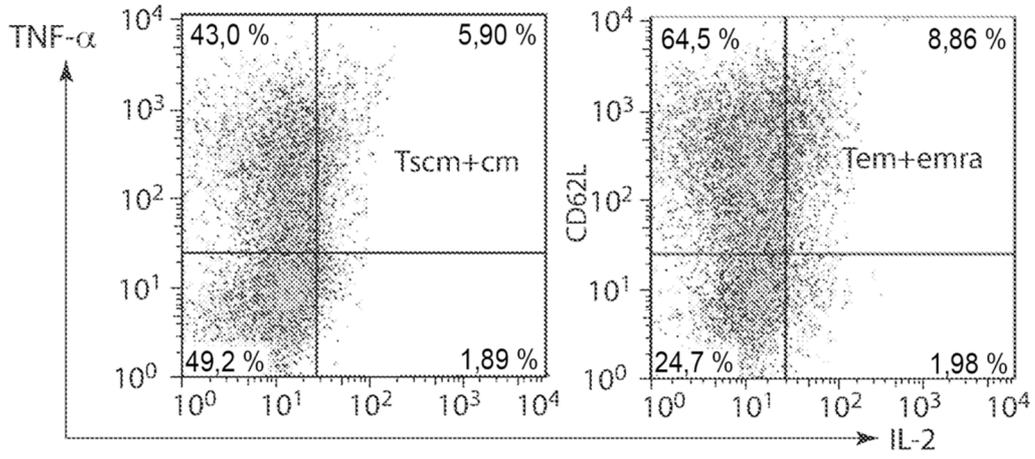


FIG. 6A

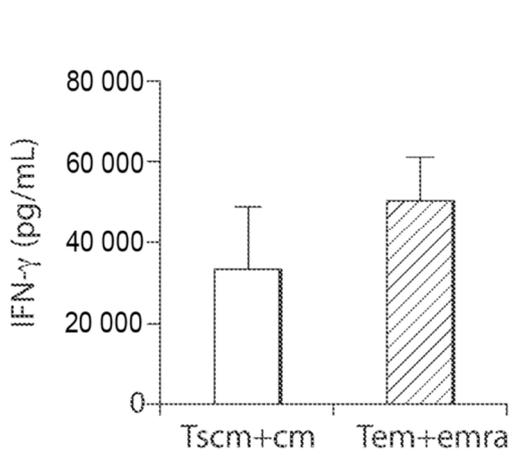


FIG. 6B

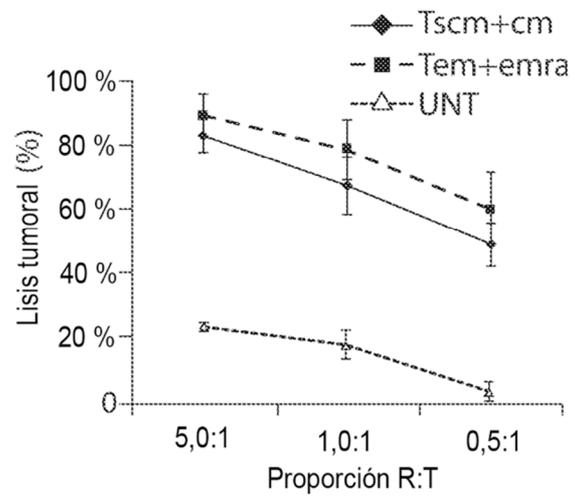


FIG. 6C

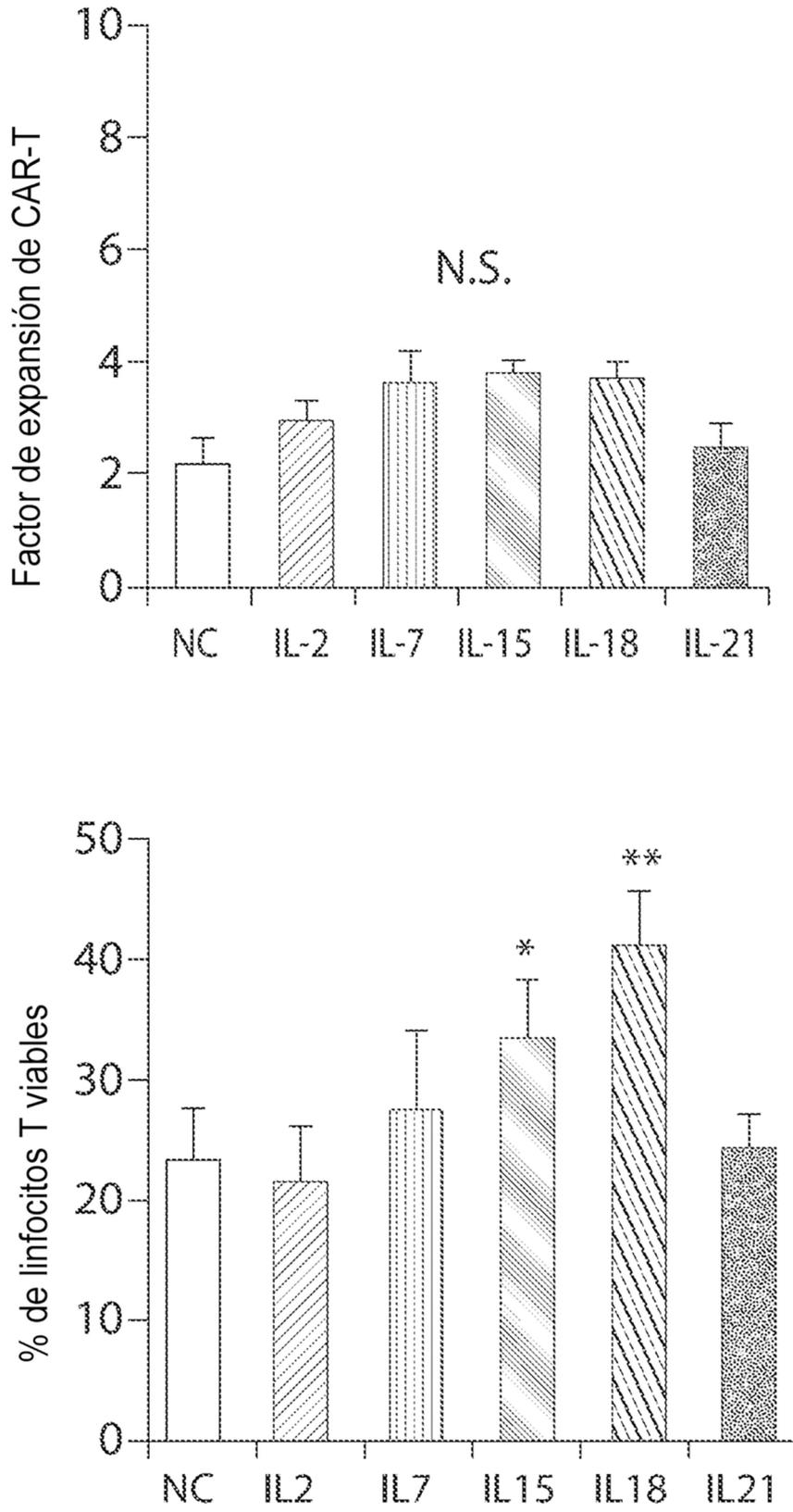


FIG. 7A

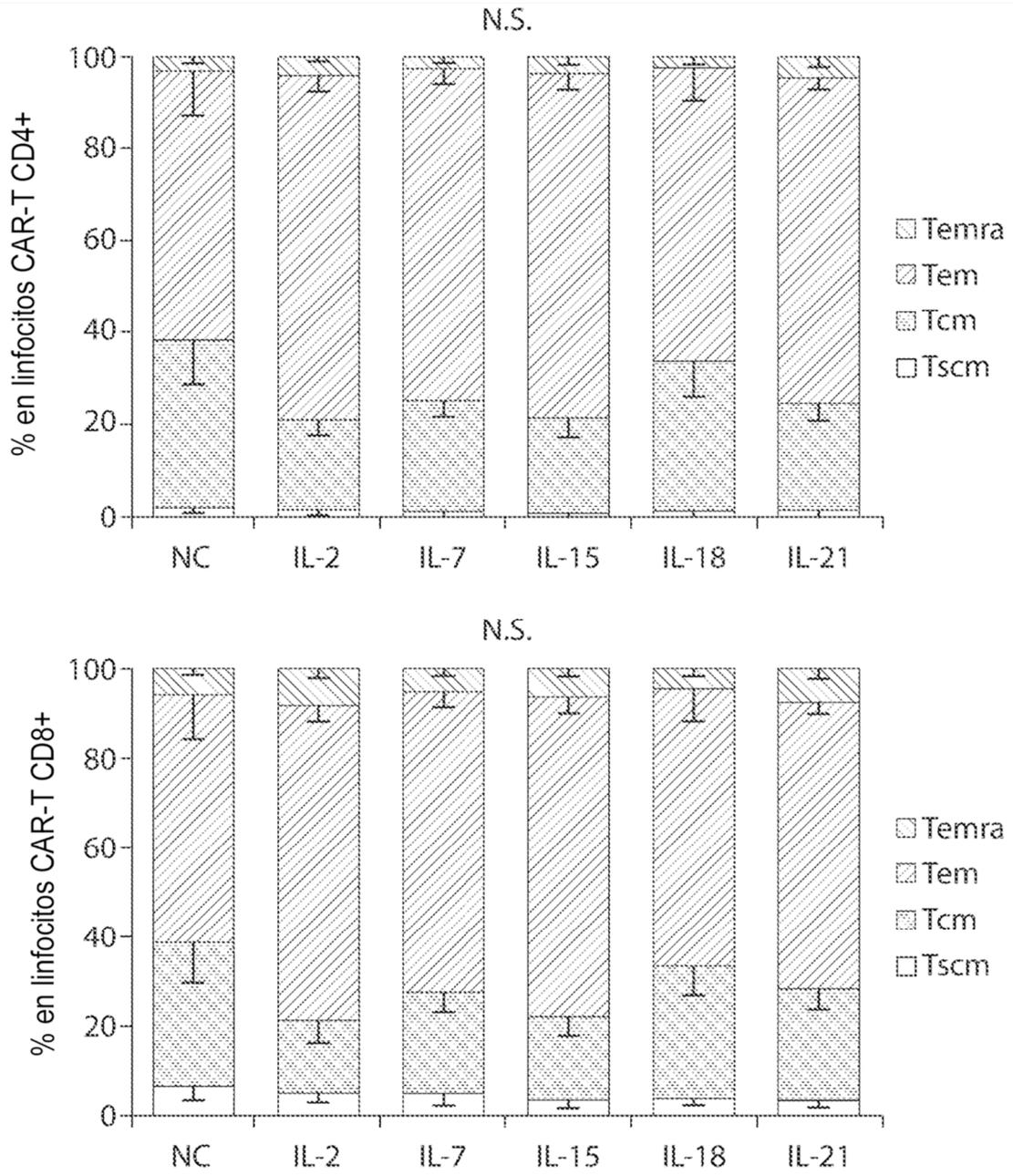


FIG. 7B

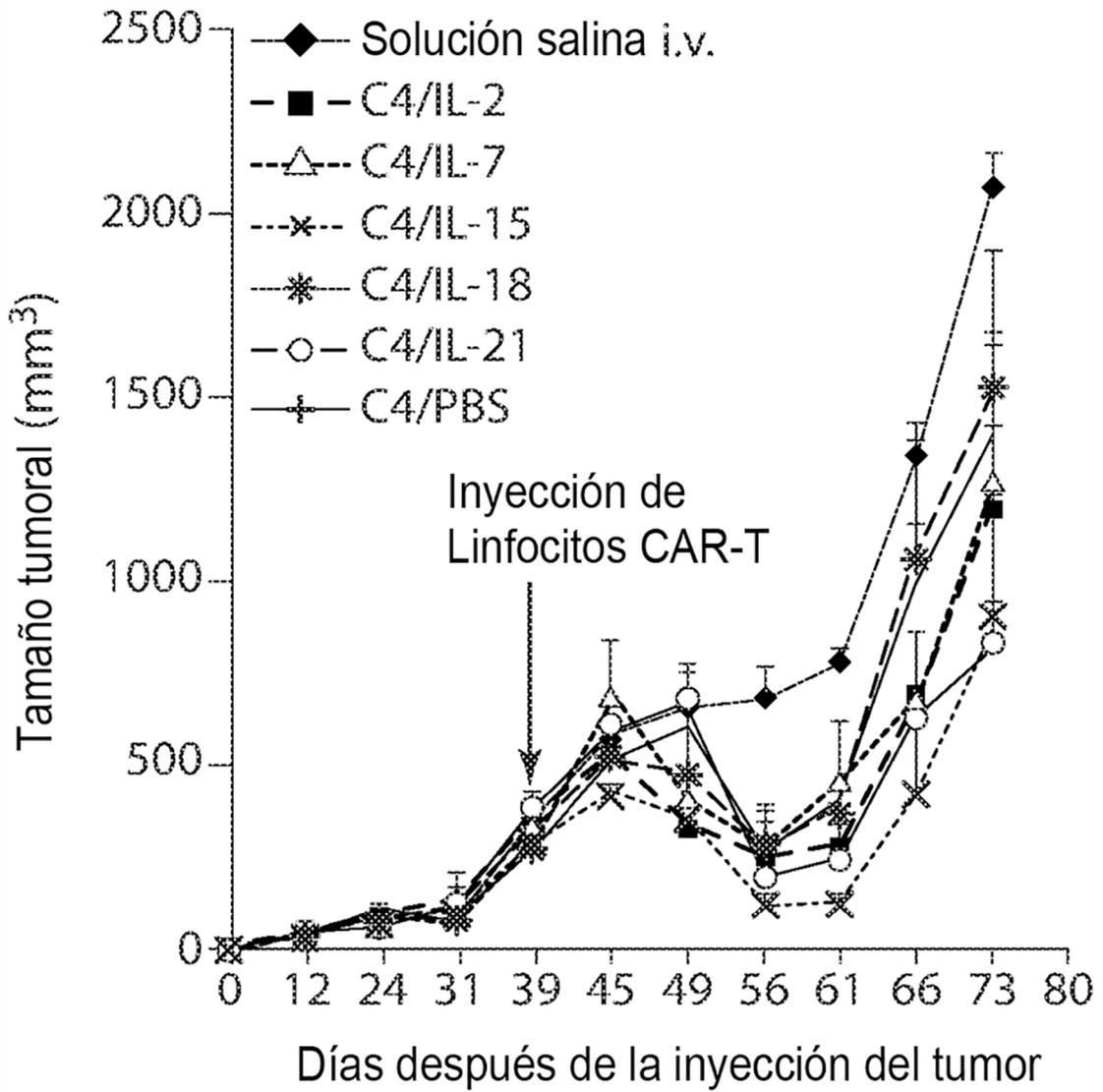
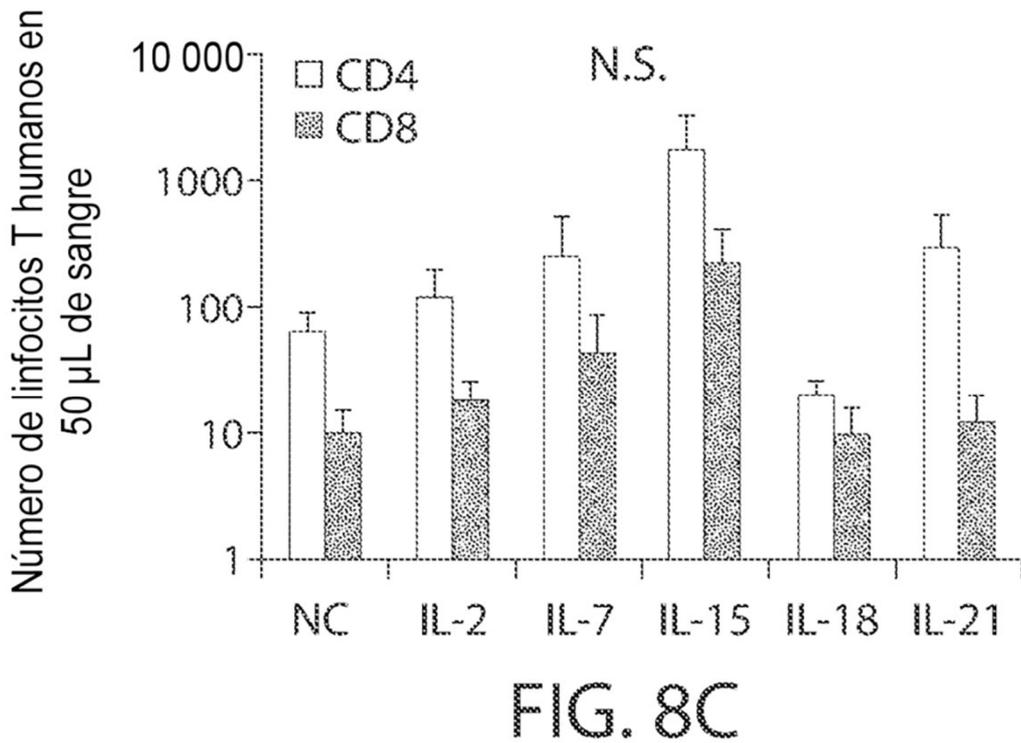
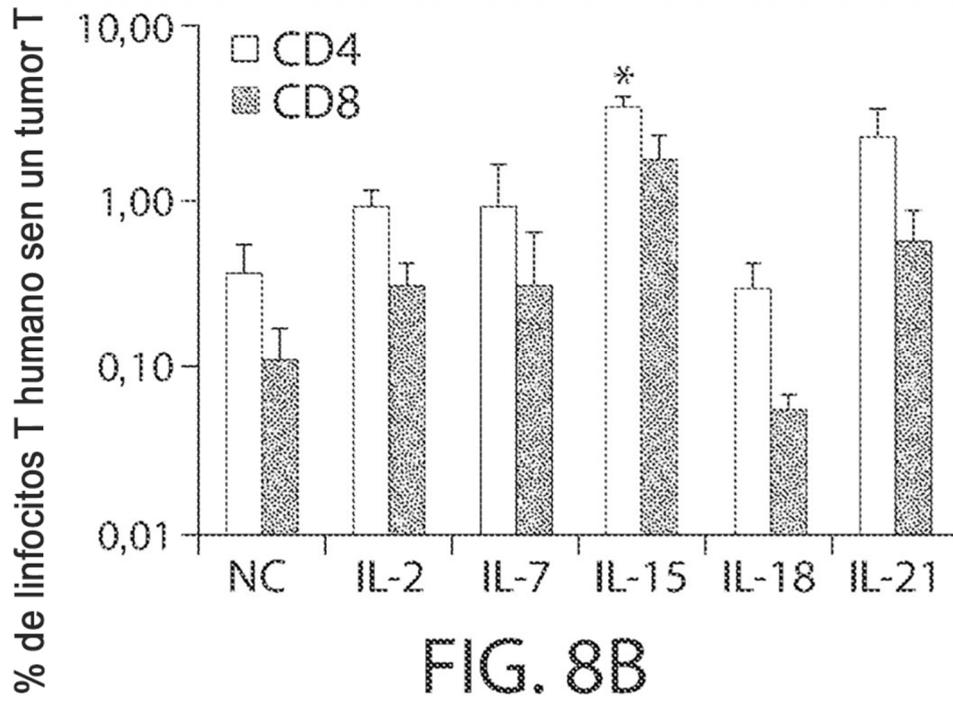


Fig. 8A



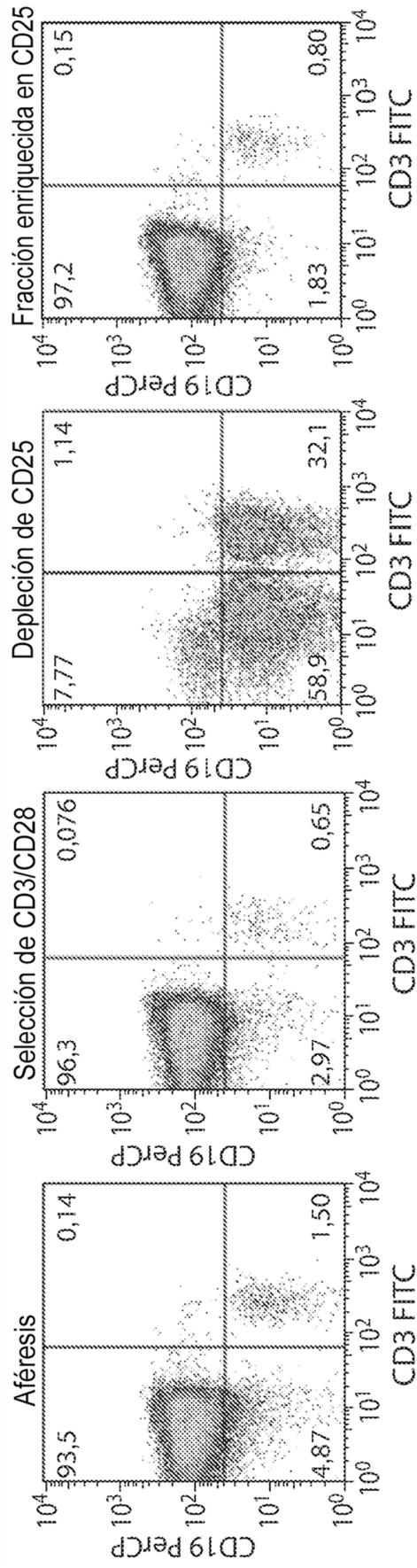
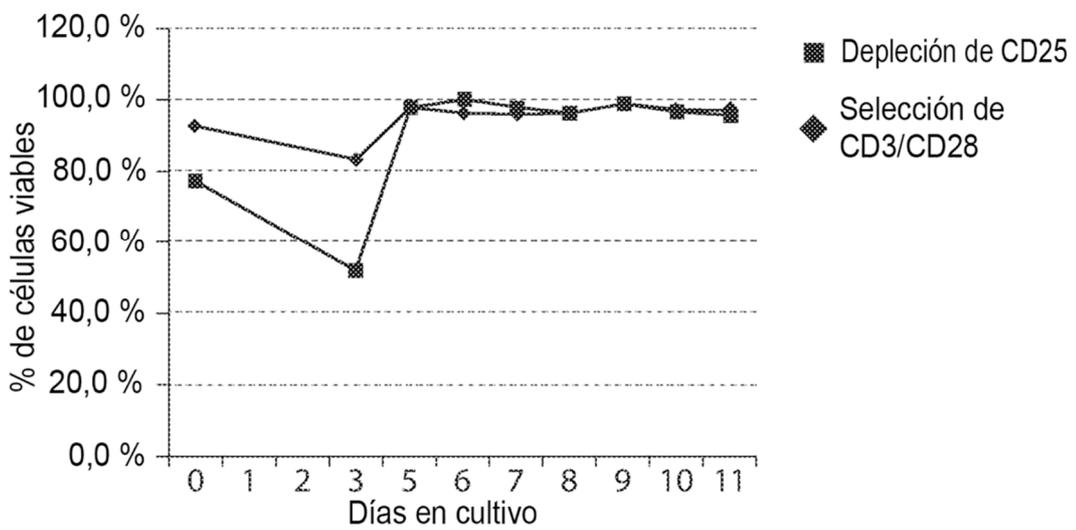
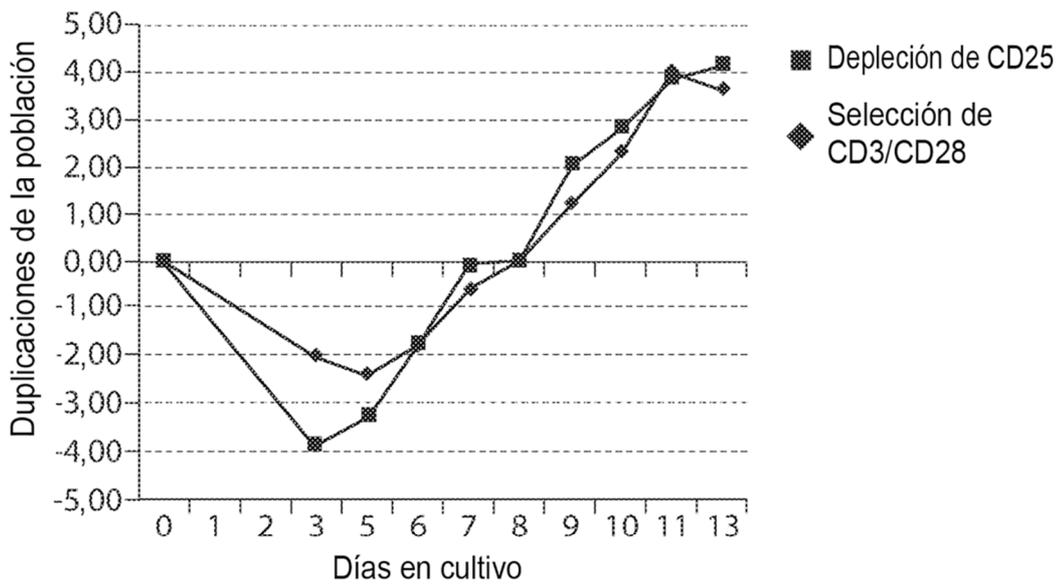
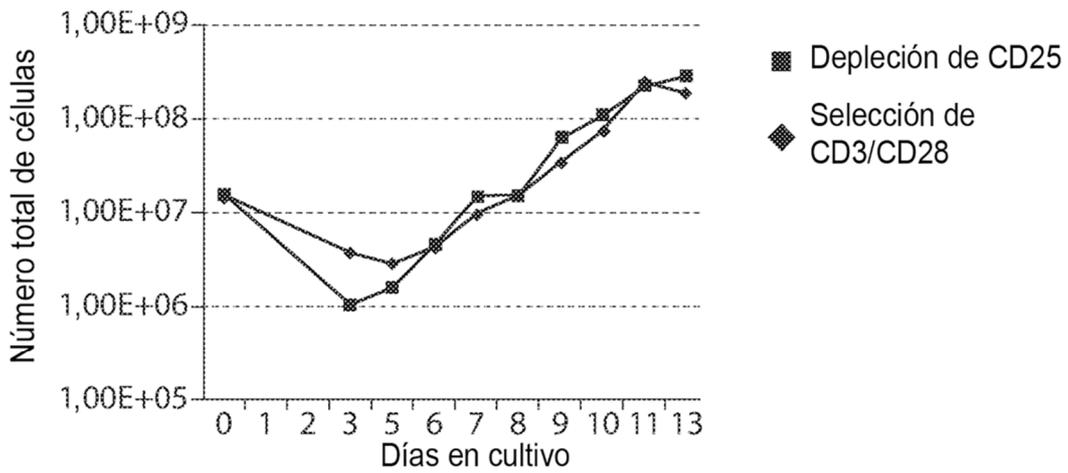


FIG. 9



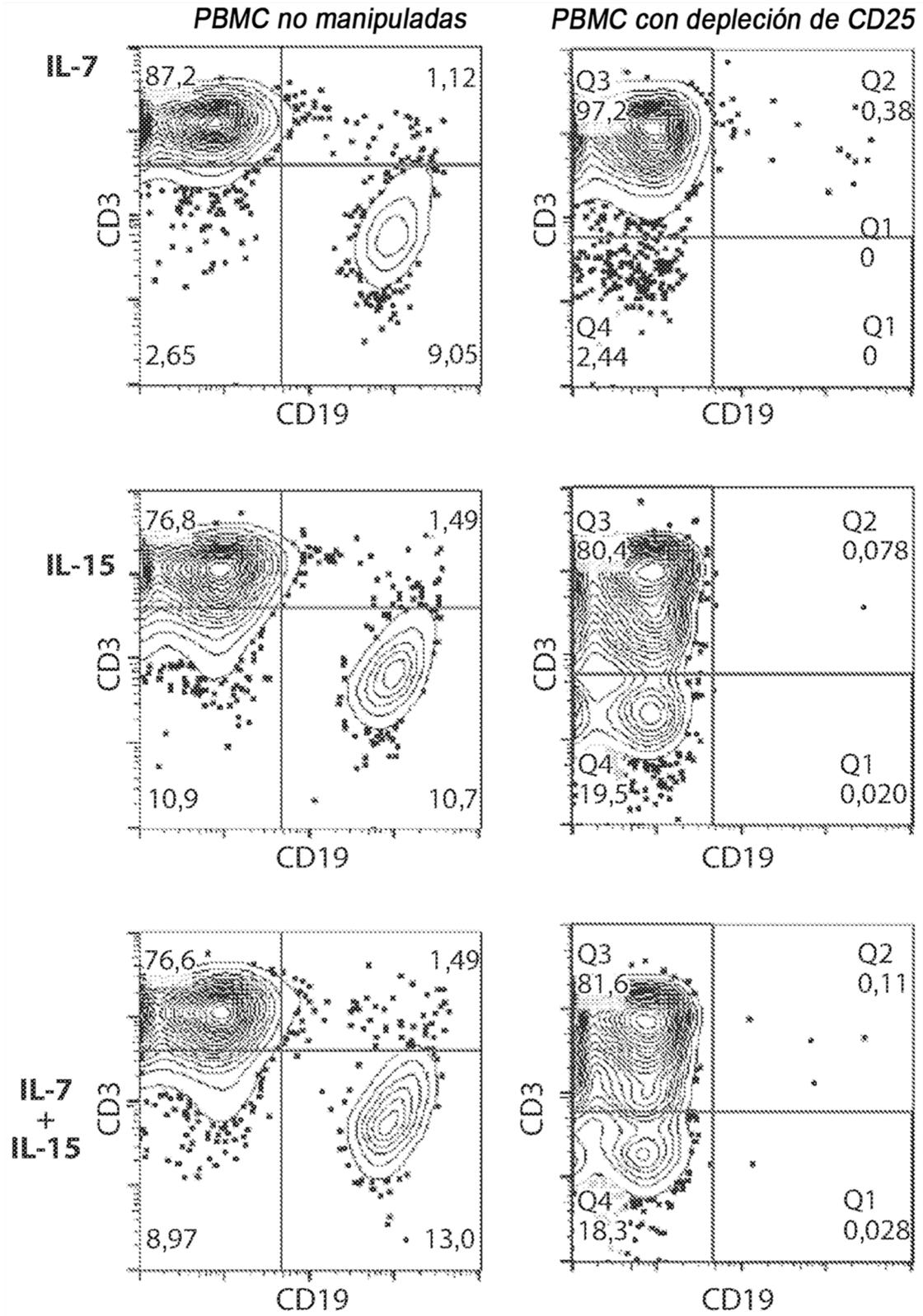


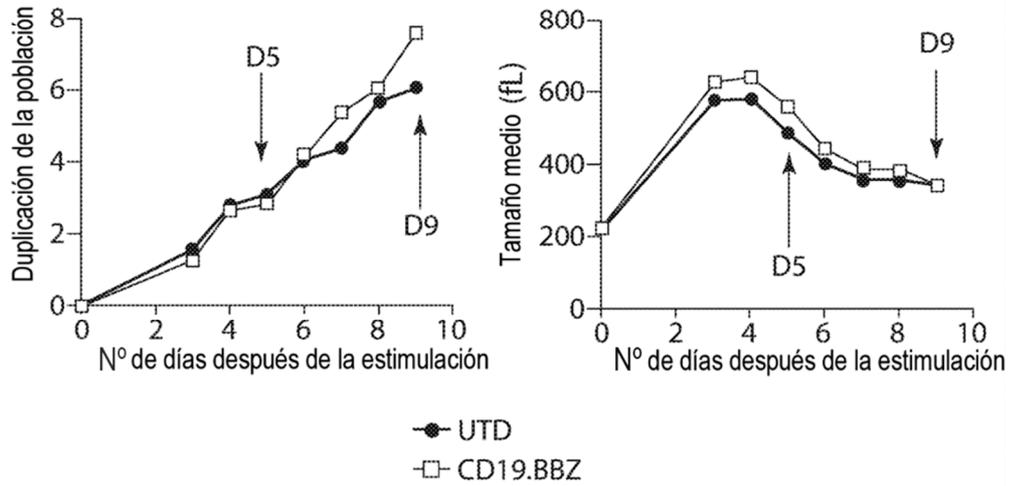
FIG. 11

PBMC ND447 activadas, transducidas, con eliminación de las perlas y recolectadas en el Día 5 y Día 9 para el rendimiento comparativo in vitro e in vivo

Perfil de expansión inicial con 3x28 perlas

Las flechas indican los puntos temporales de recolección

Células normales de donante



Los procedimientos replicaron el protocolo CVPF

FIG. 12

No hay diferencia en la destrucción de linfocitos CART19 de células aisladas en el día 5 y día 9 de la expansión

Ensayo de citotoxicidad (18 h)

Diana: K562-CD19

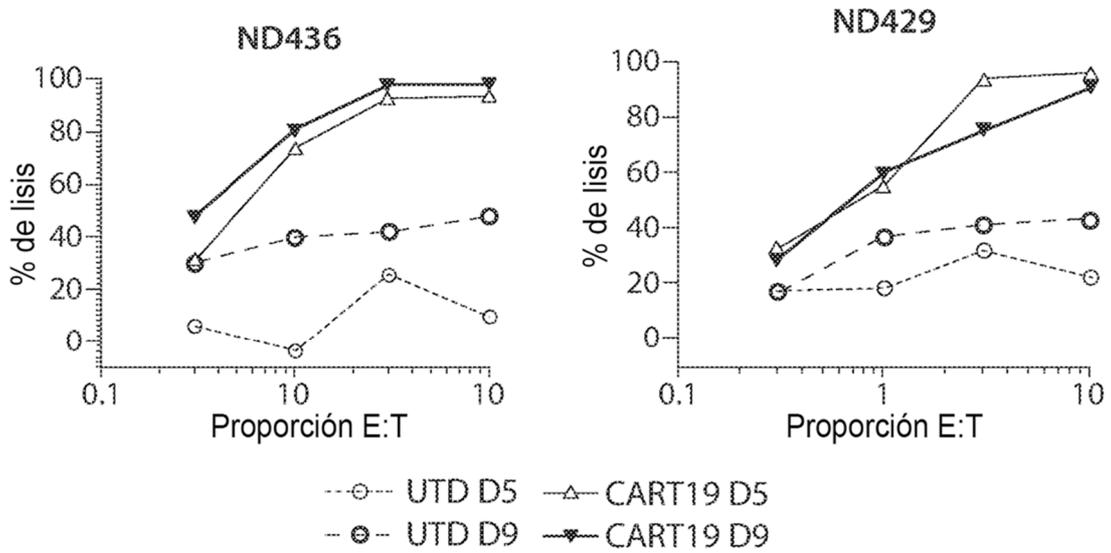
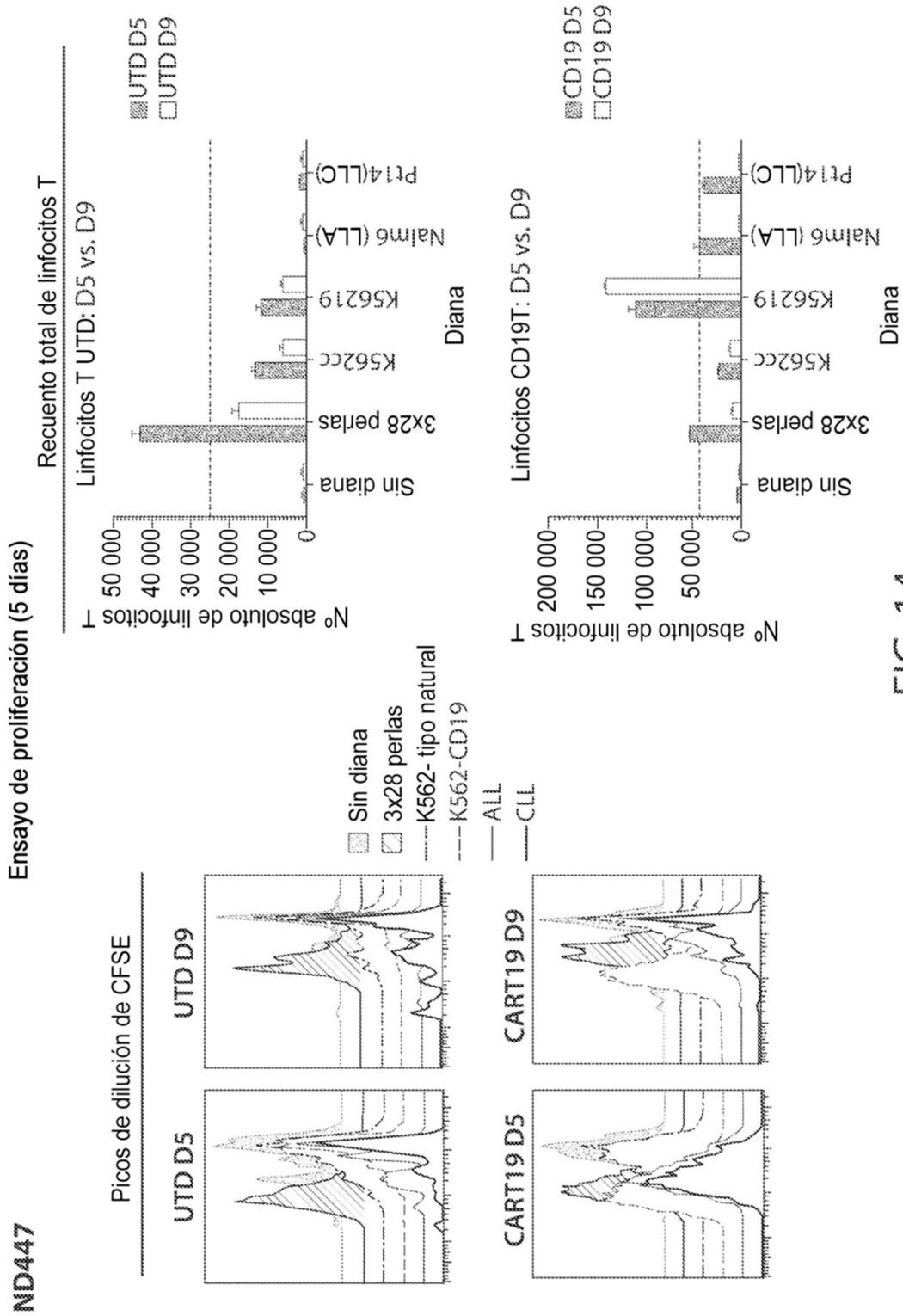


FIG. 13



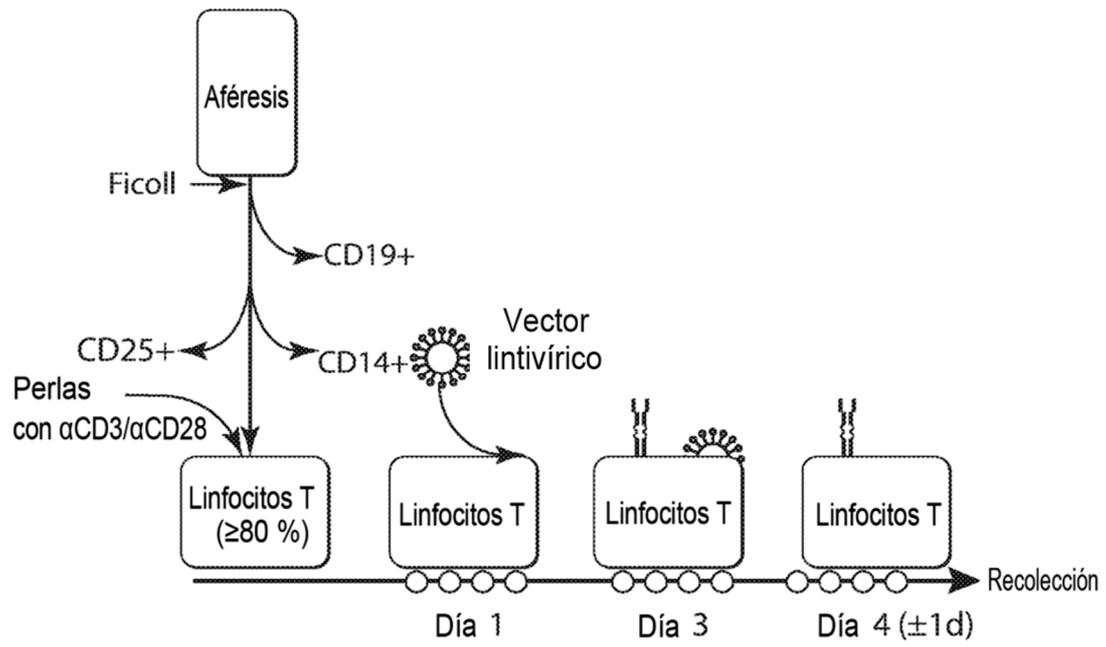


FIG. 15

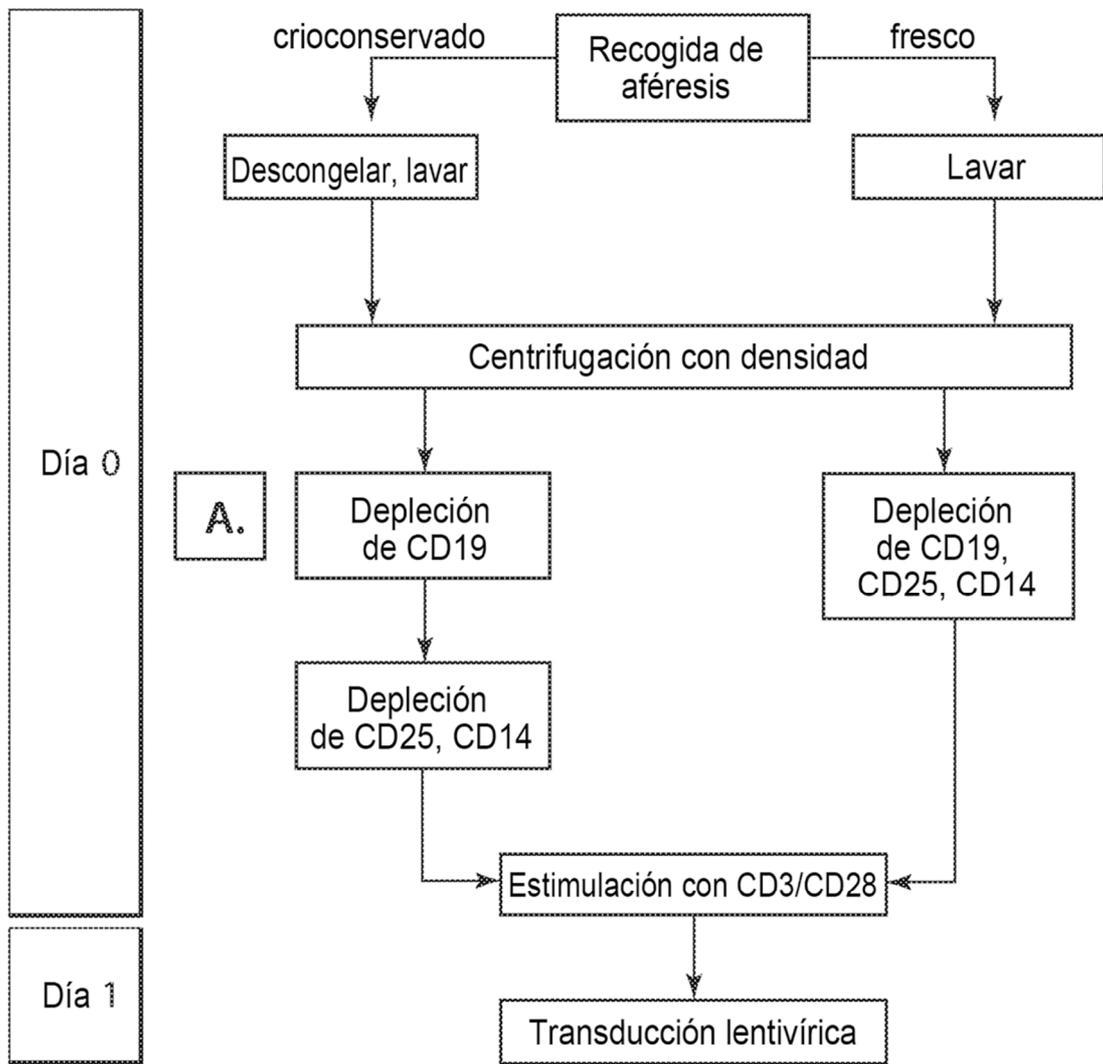


FIG. 16

Las células recolectadas en D5 proliferaron mejor que las células recolectadas en D9 después de 7 días de estimulación con CD19 que expresa K562s.

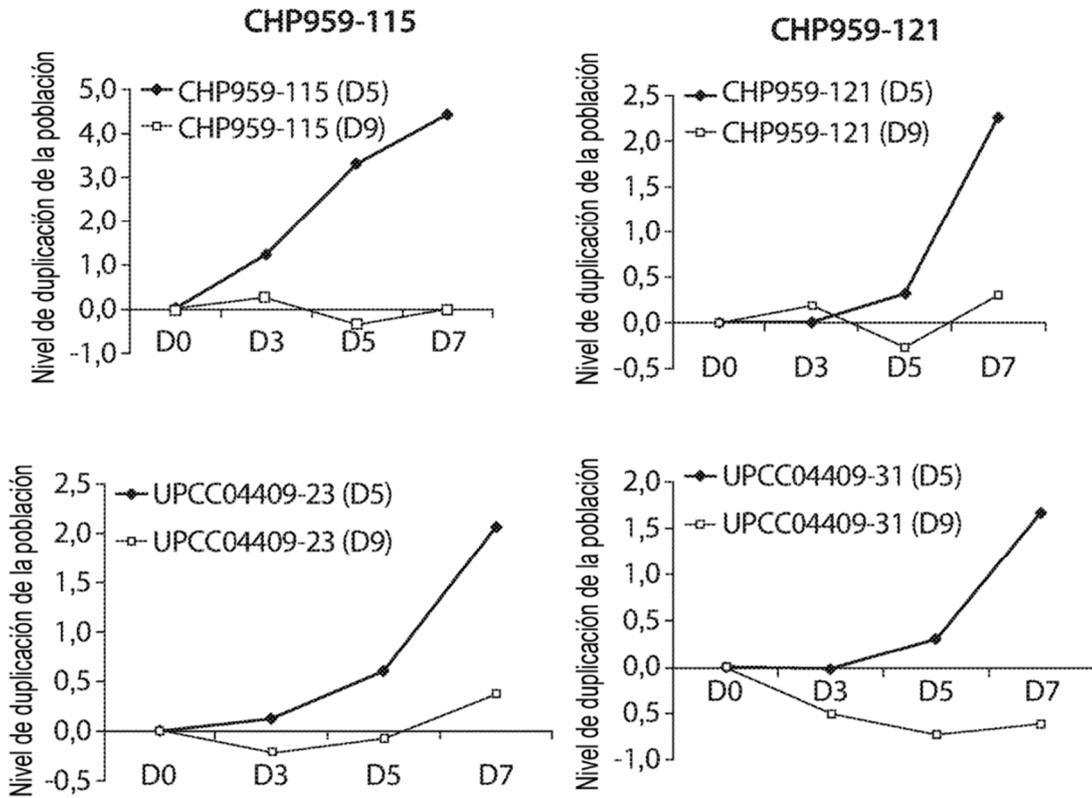


FIG. 17

Producción de citocinas mayor o comparable a partir de linfocitos CART19 recolectados en D5 tras el reconocimiento de las dianas

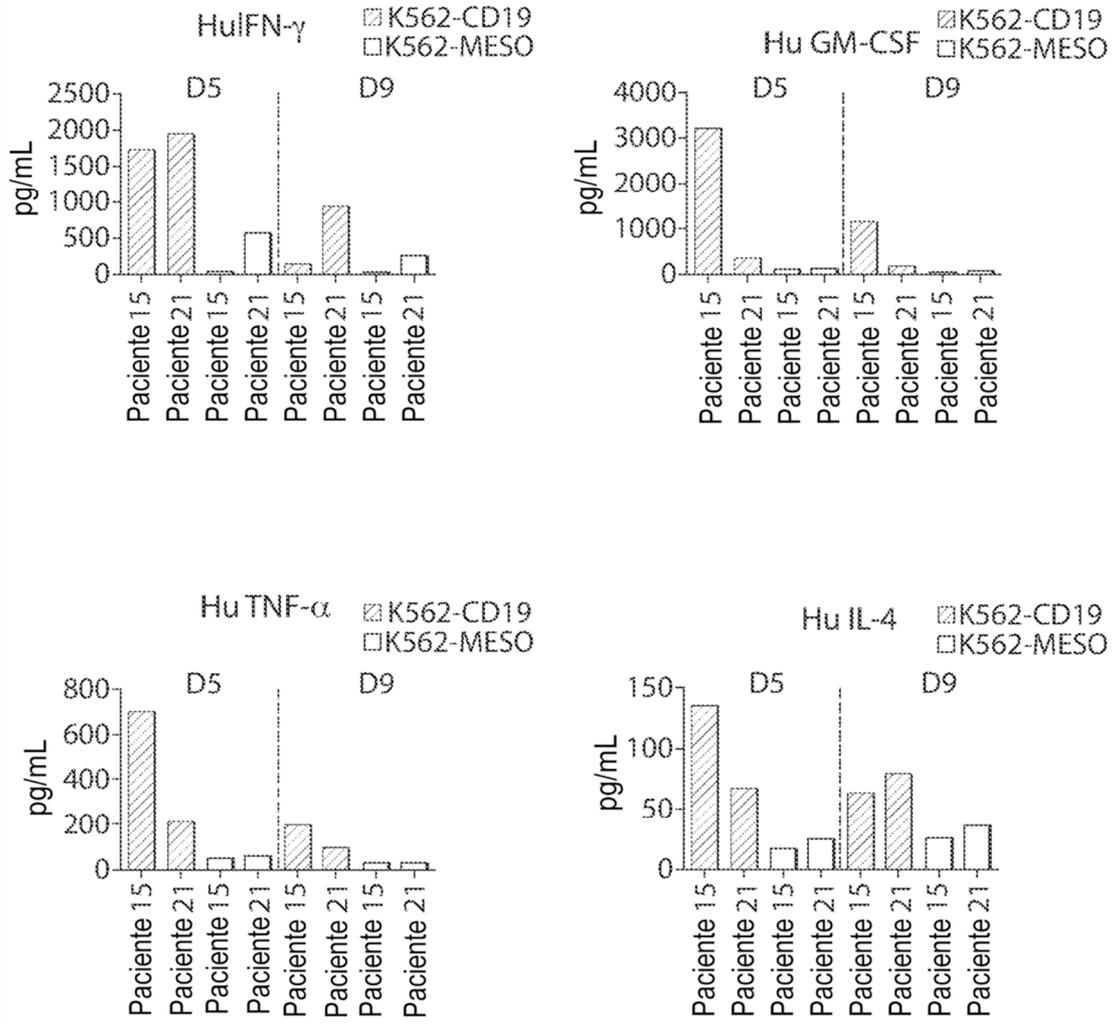
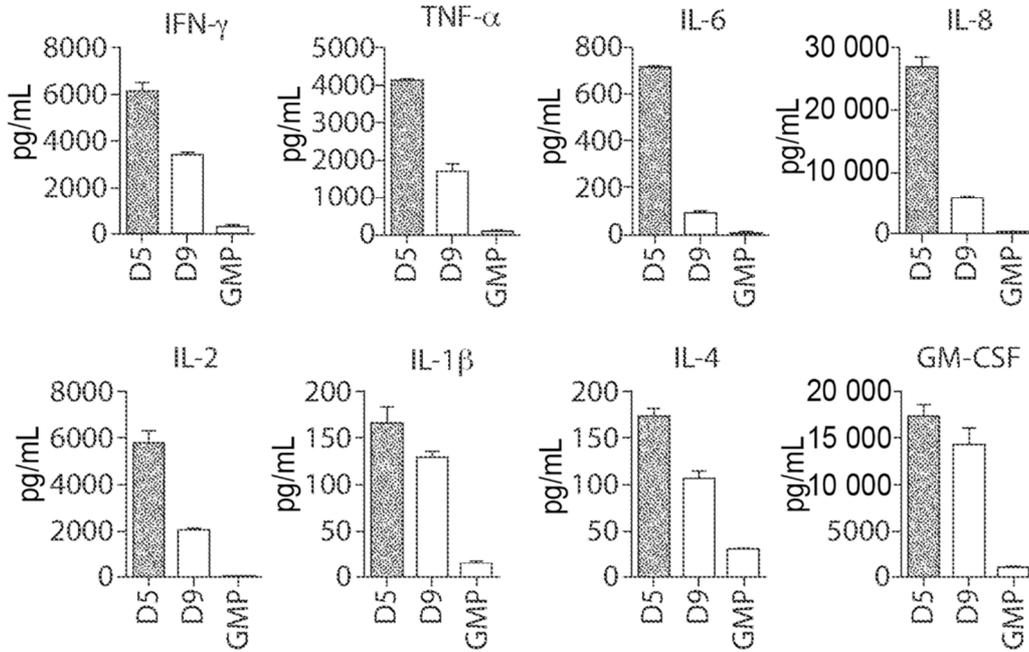


FIG. 18

Se producen mayores niveles de múltiples citocinas en linfocitos CART19 recolectados en el día 5 tras el reconocimiento de las dianas

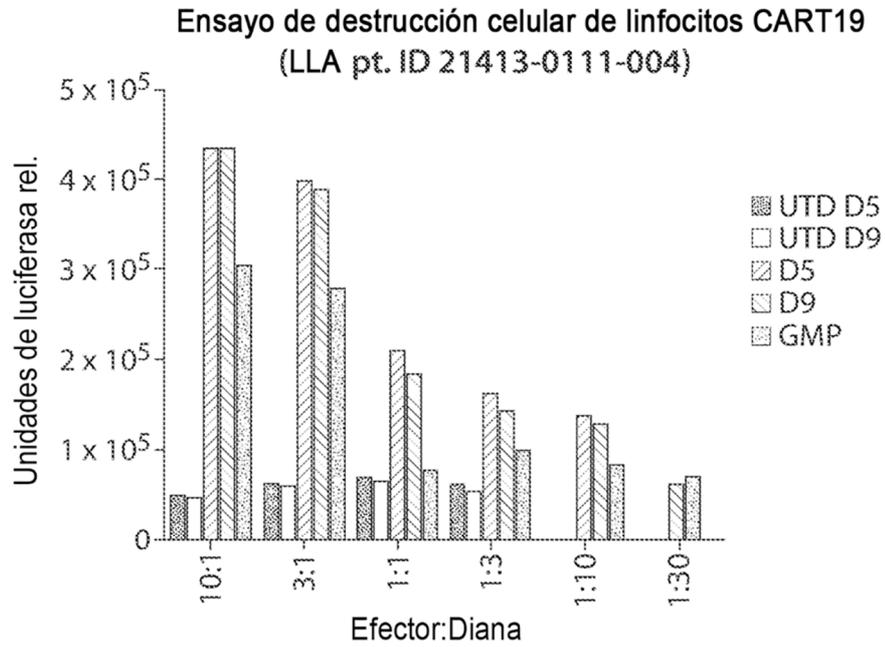
LLA pt. ID 21413_0111_004



- Los linfocitos CART19 se estimularon con perlas de control o recubiertas con Ab anti-idiotipo-CAR19 durante 24 h.
- Los niveles detectados de citocinas con las perlas de control fueron nulos o muy bajos (<200 pg/mL).

FIG. 19

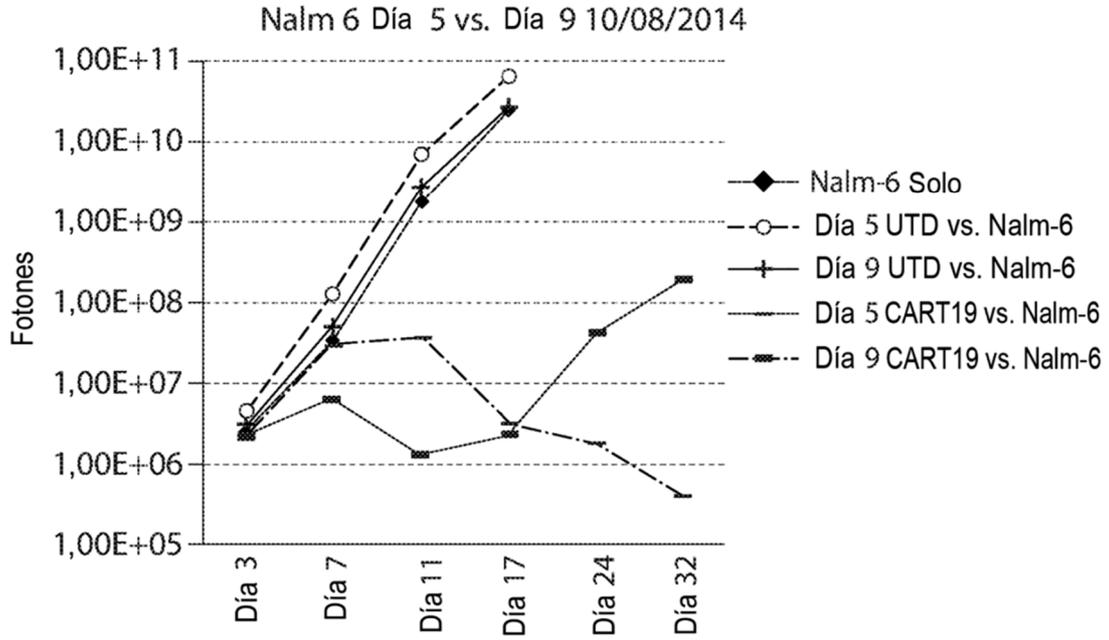
Los linfocitos CART19 recolectados en el día 5 poseen una mejor capacidad de destrucción celular



- Los linfocitos CART19 se cocultivaron con células NALM6-Luc con proporciones crecientes de E:T durante 16 h.
- Se examinaron los lisados celulares totales con el ensayo de luciferasa.

FIG. 20

Linfocitos CART 19 recolectados en el día 5 poseen una mejor capacidad de destrucción celular a largo plazo *in vivo*



- 10^6 NALM6 (CBG/GFP+)/ratón
- 10^6 CART19 o UTD/ratón

FIG. 21

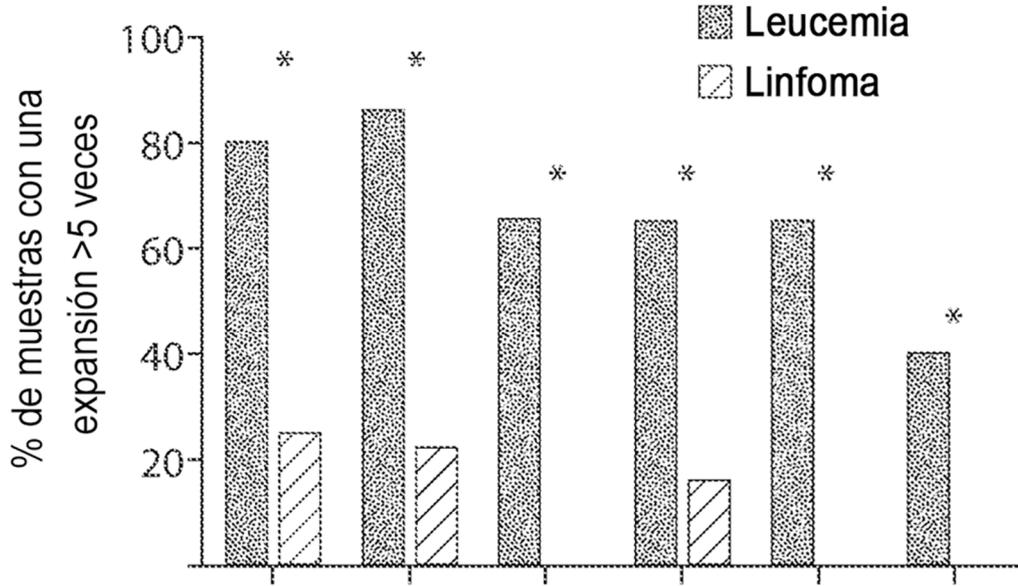


FIG. 22A

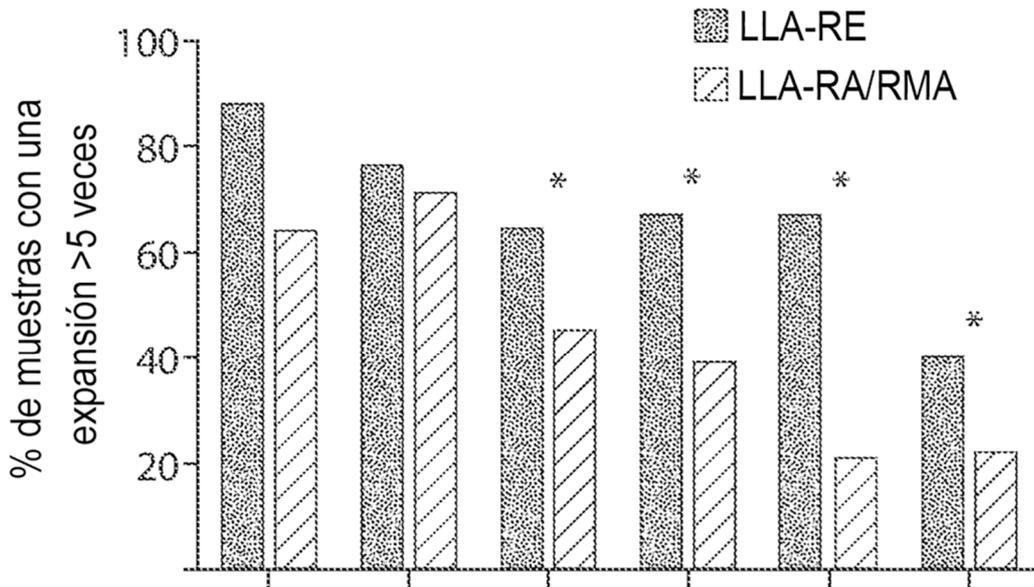


FIG. 22B

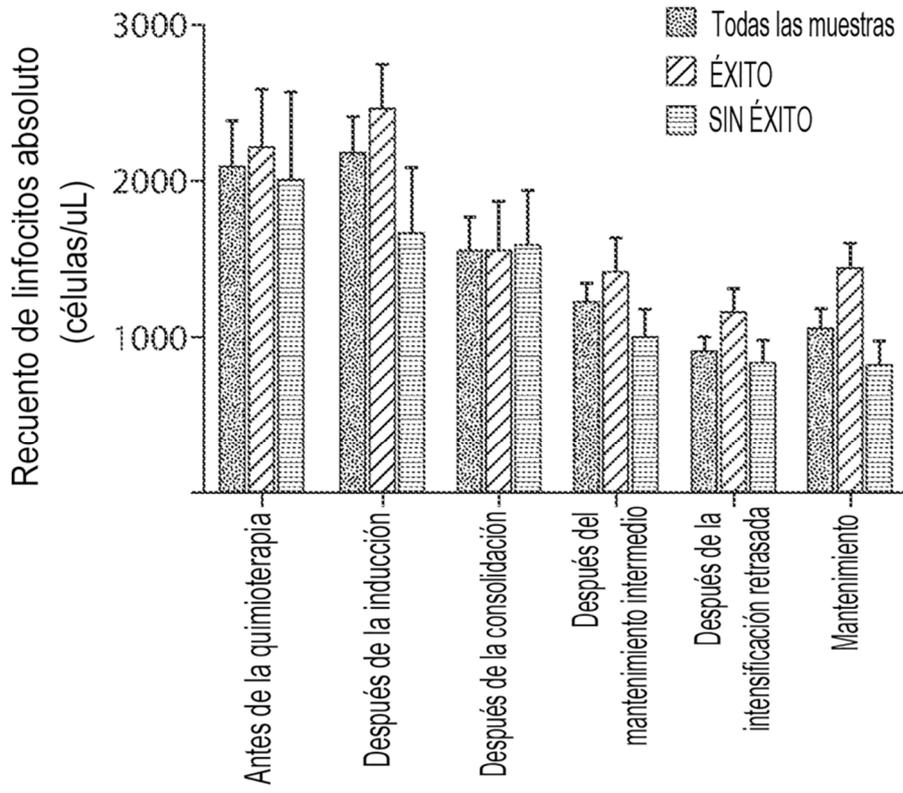


FIG. 22C

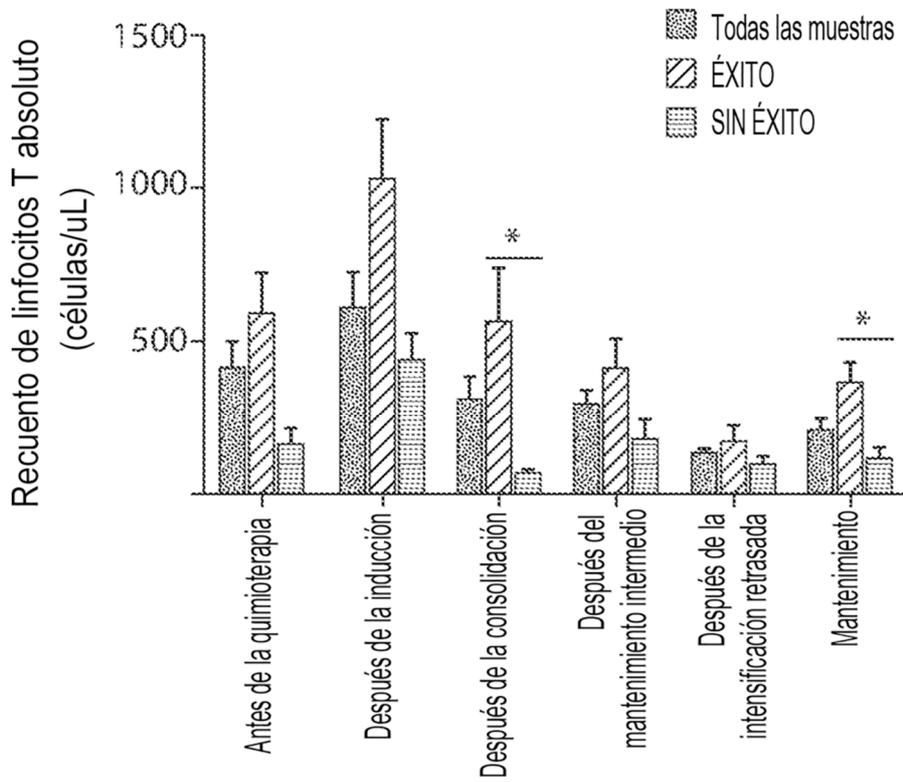


FIG. 22D

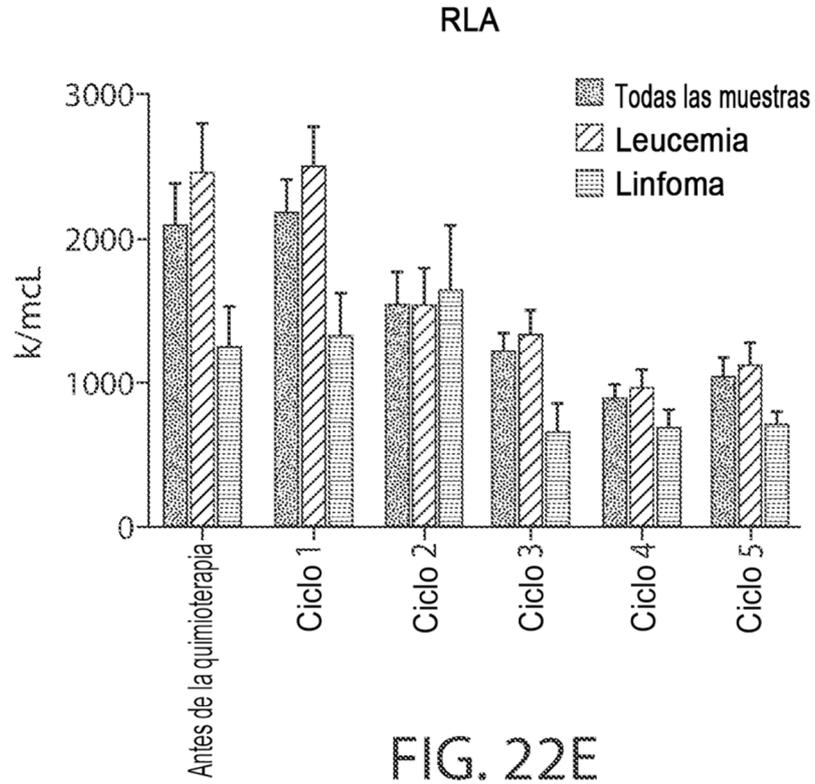


FIG. 22E

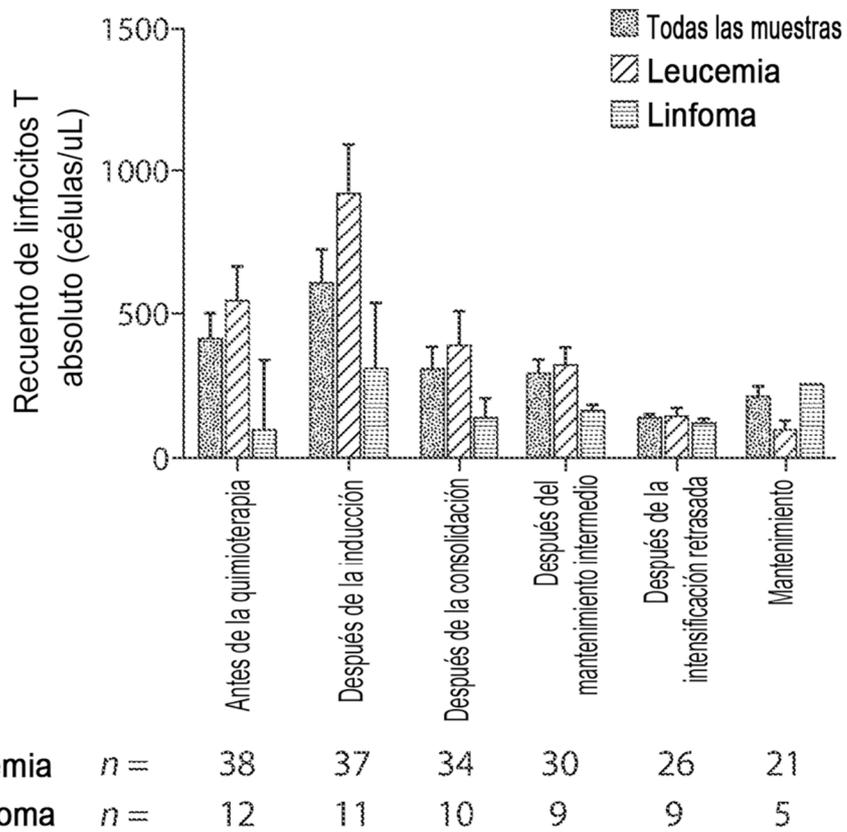


FIG. 22F

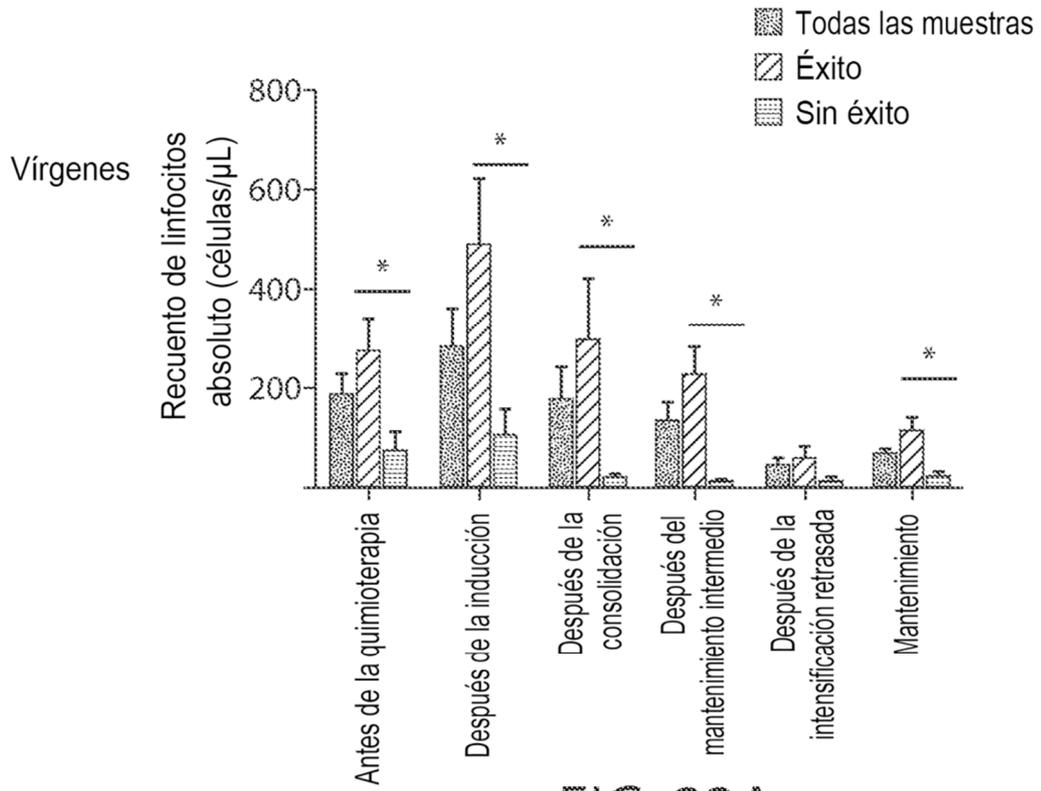


FIG. 23A

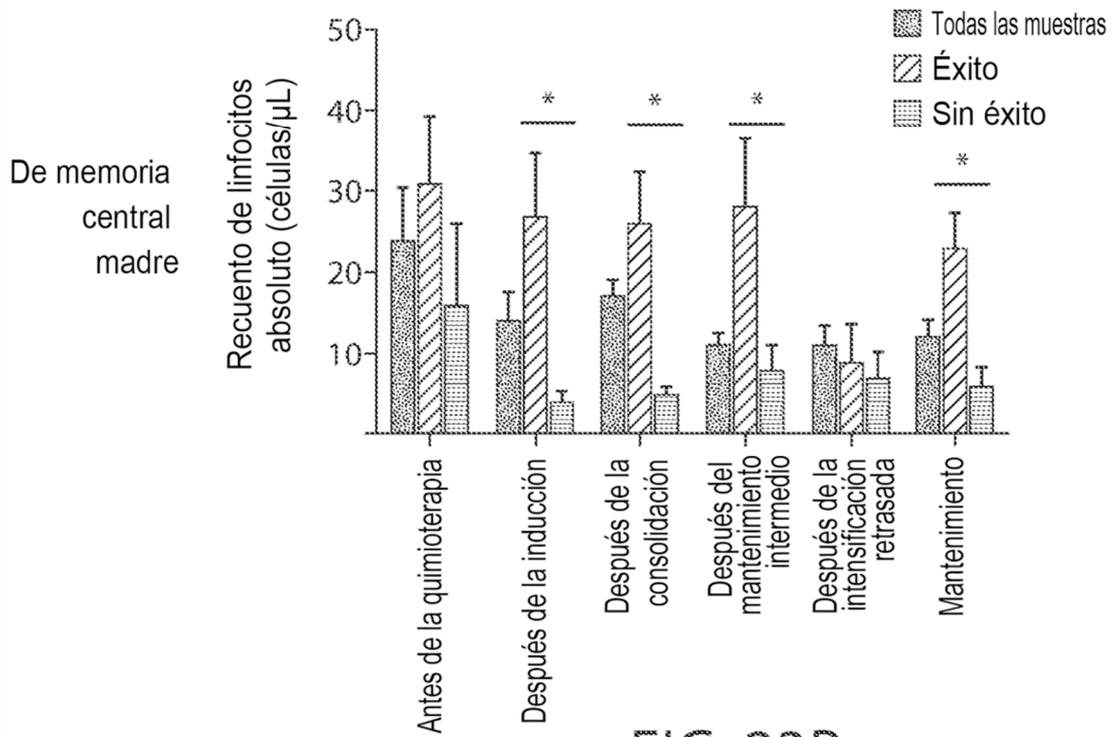


FIG. 23B

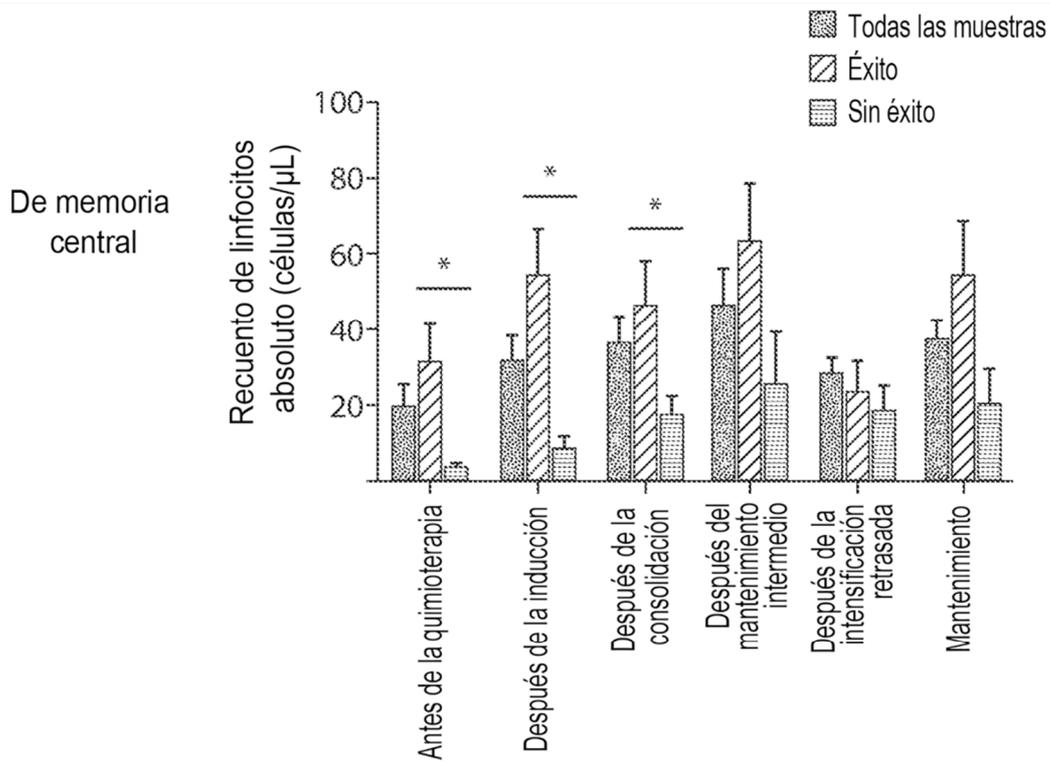


FIG. 23C

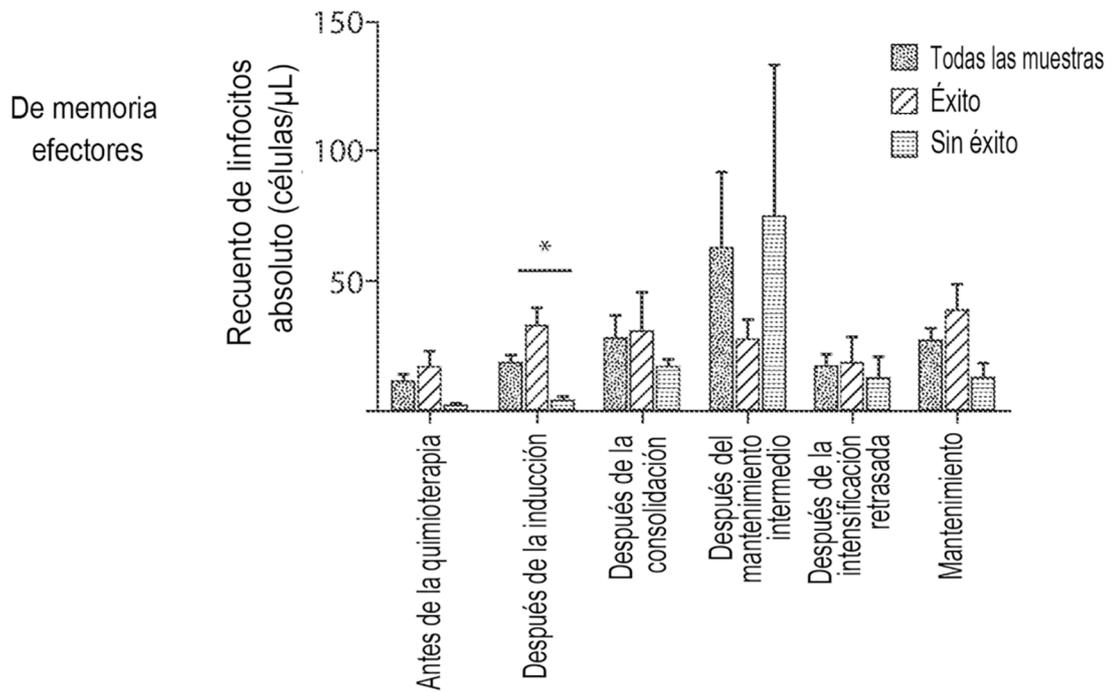


FIG. 23D

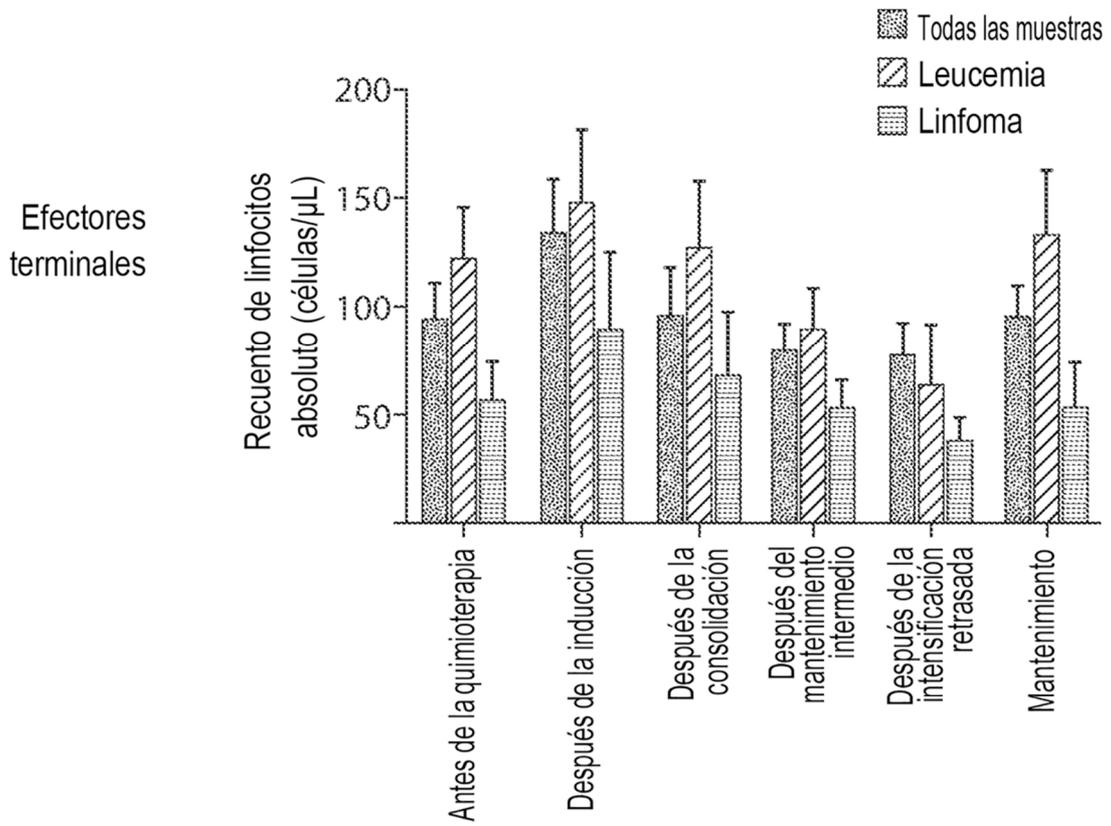


FIG. 23E

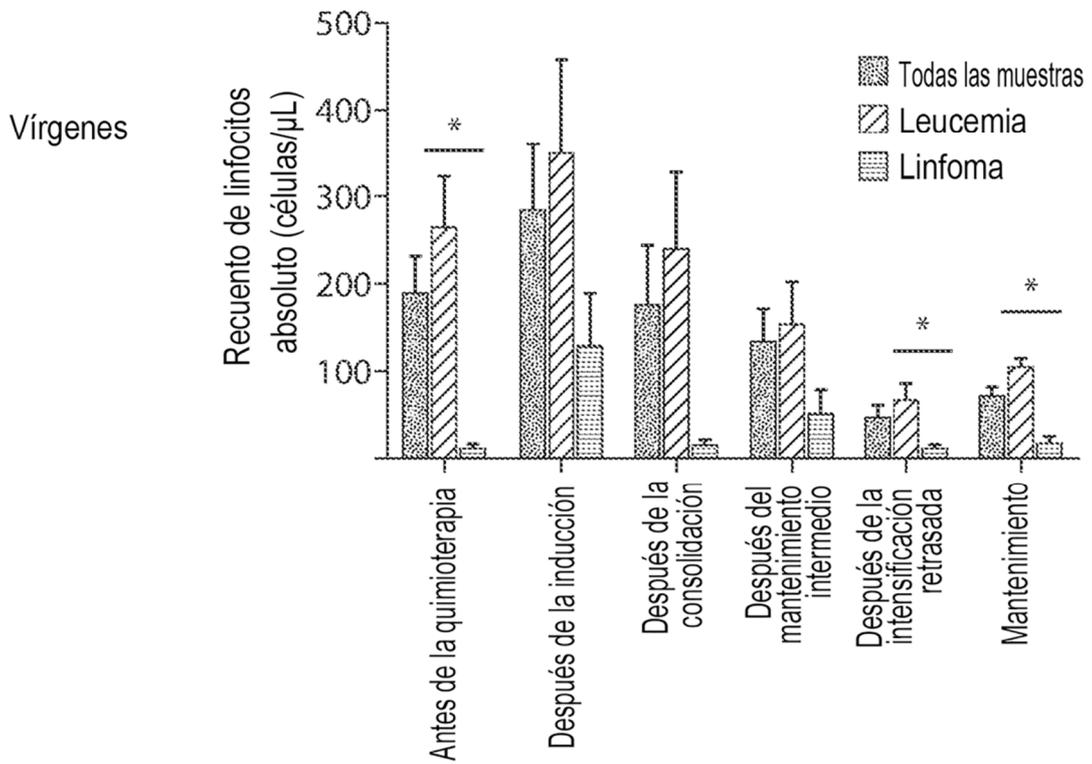


FIG. 23F

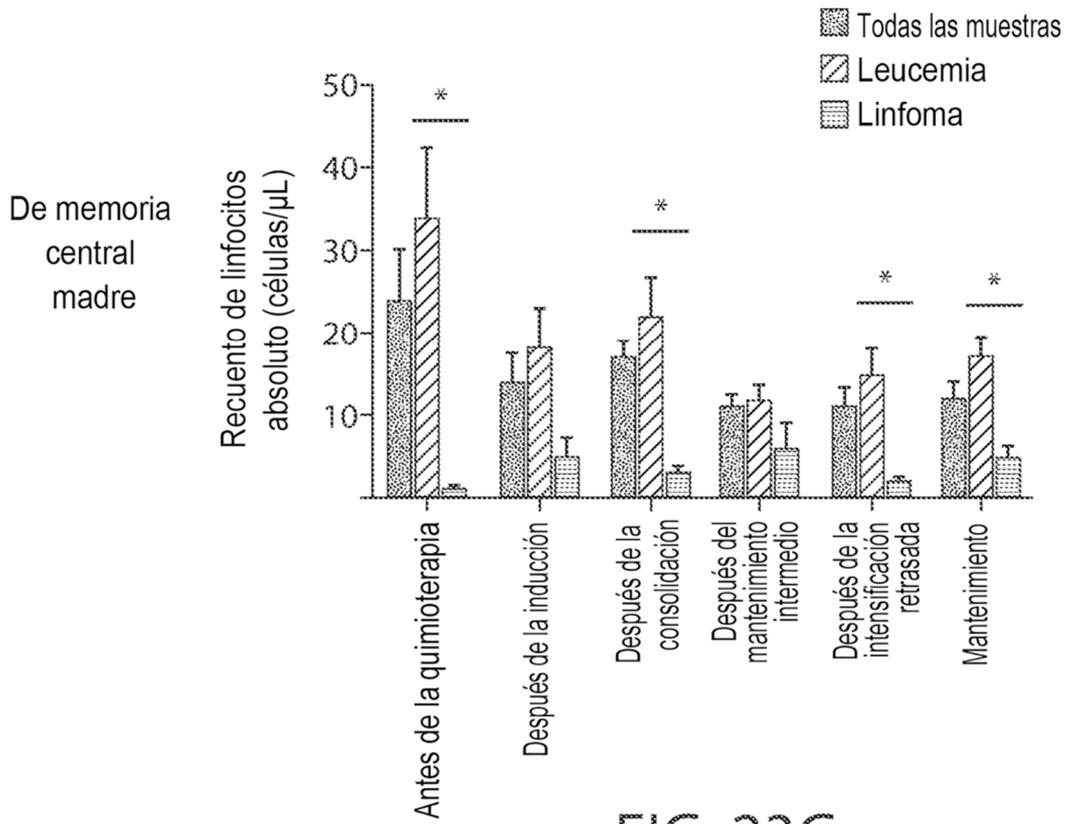


FIG. 23G

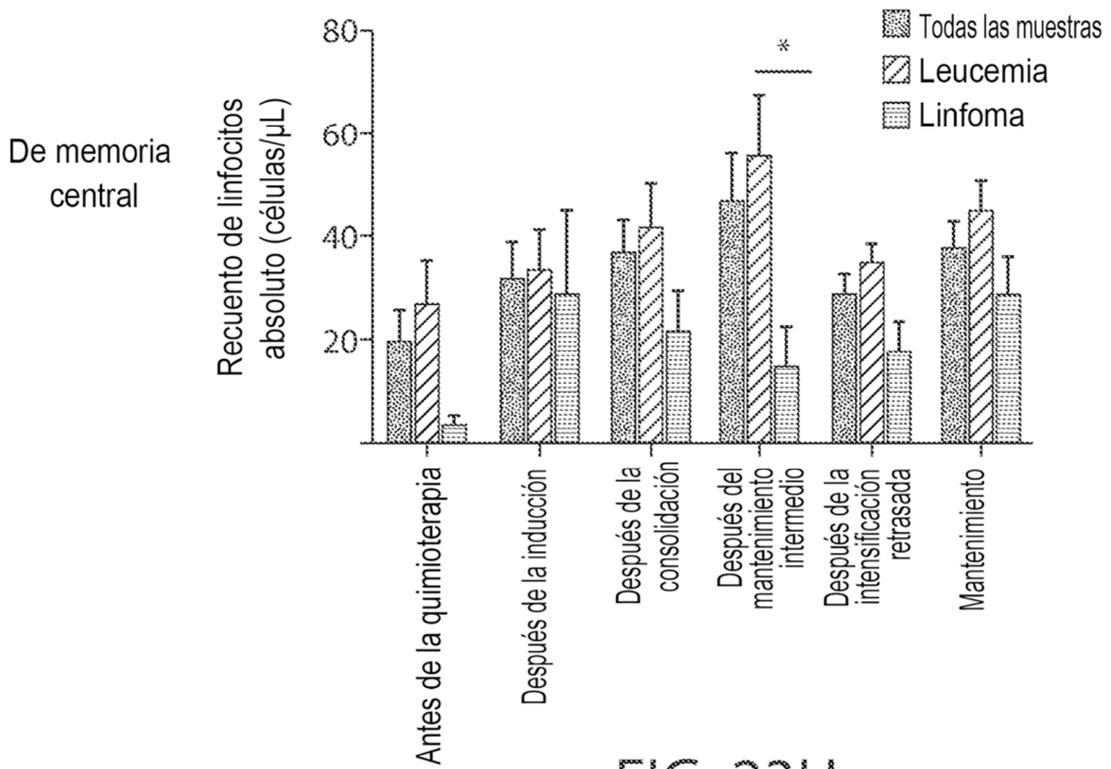


FIG. 23H

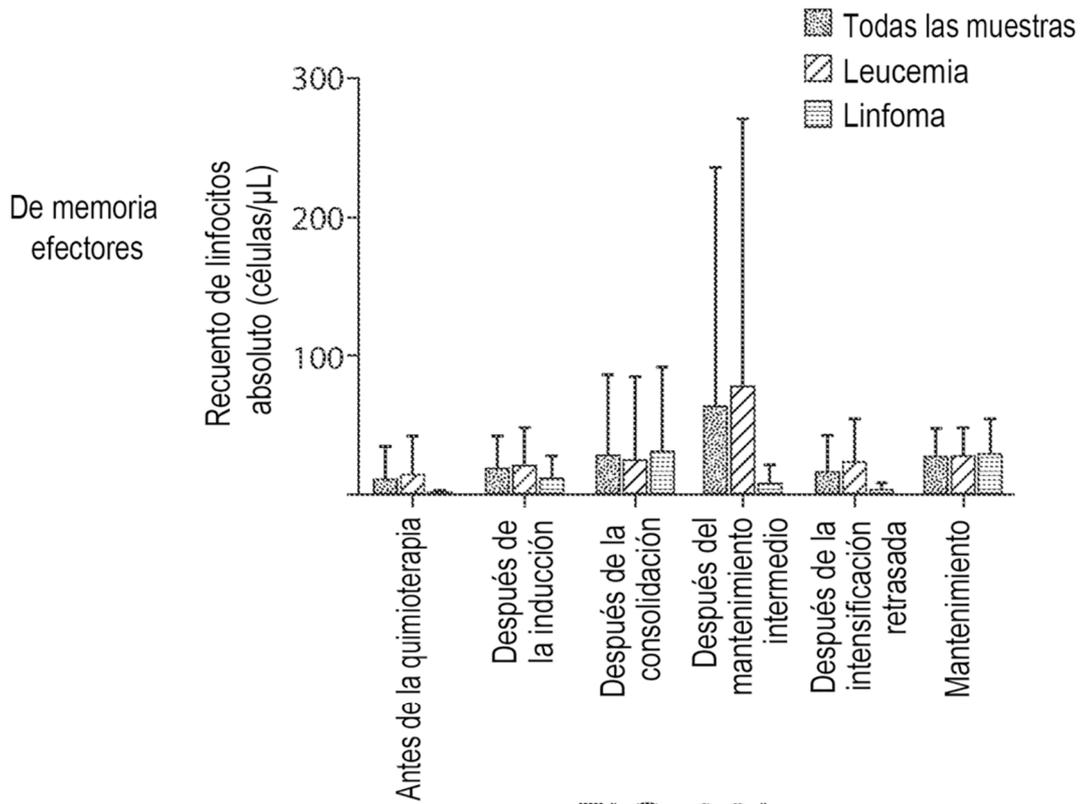


FIG. 23I

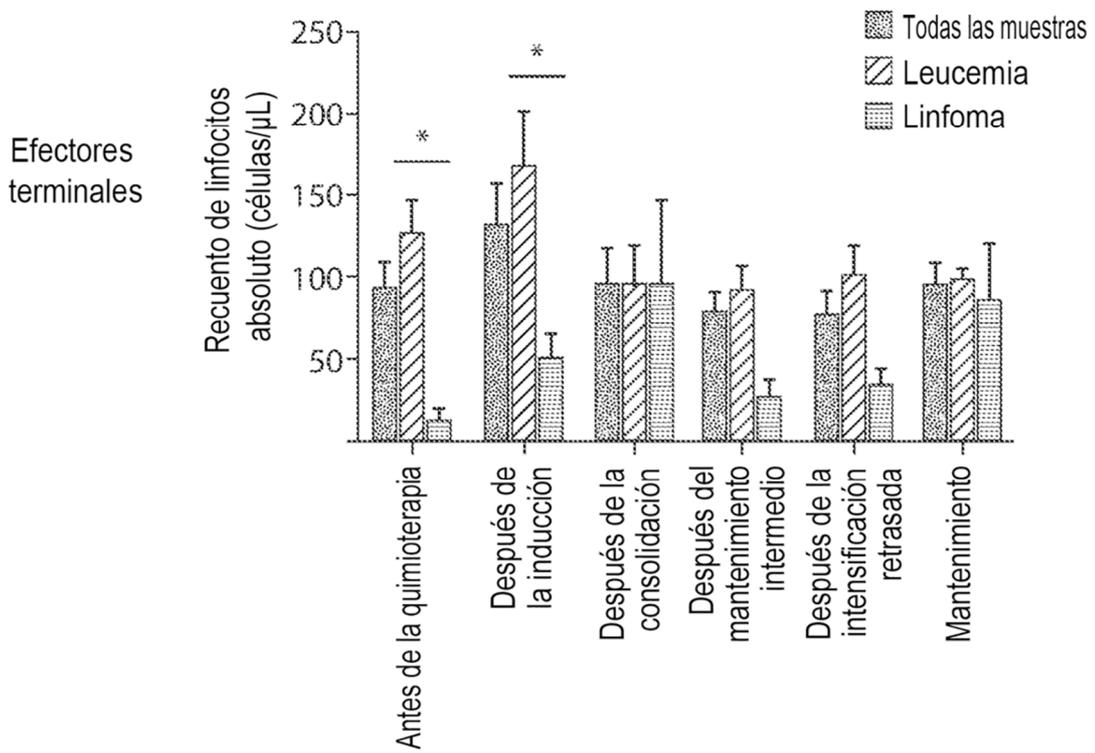


FIG. 23J

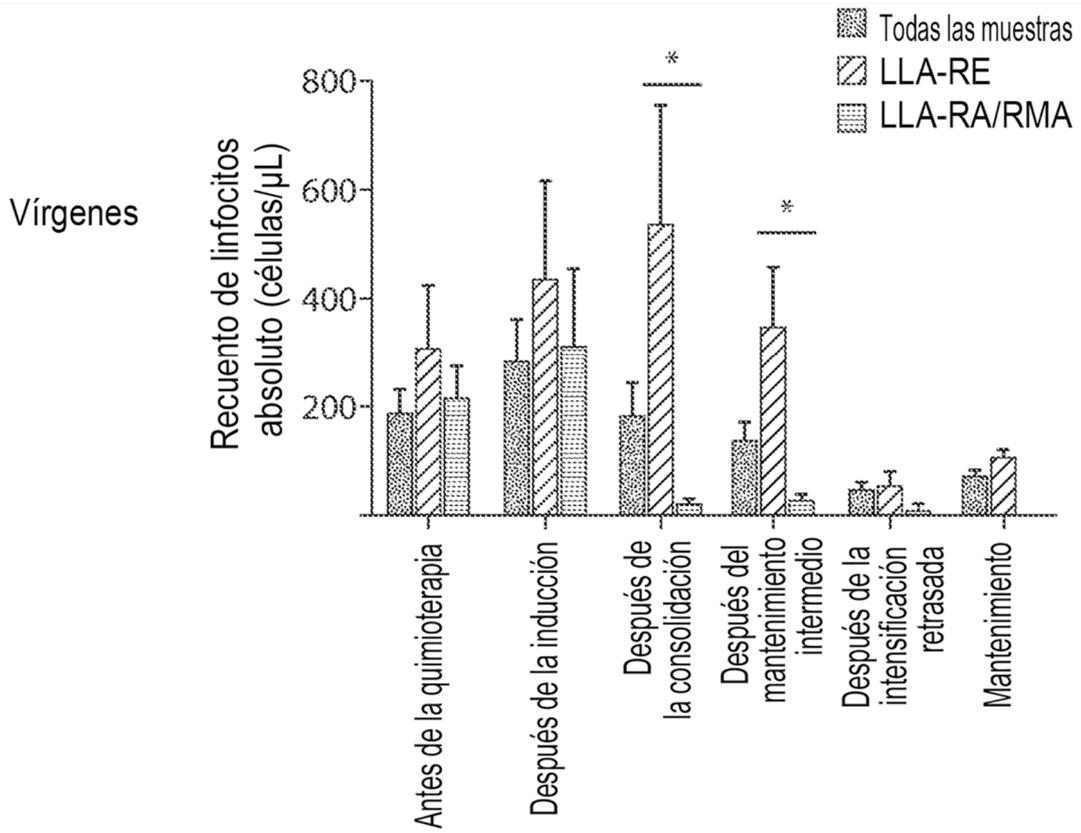


FIG. 23K

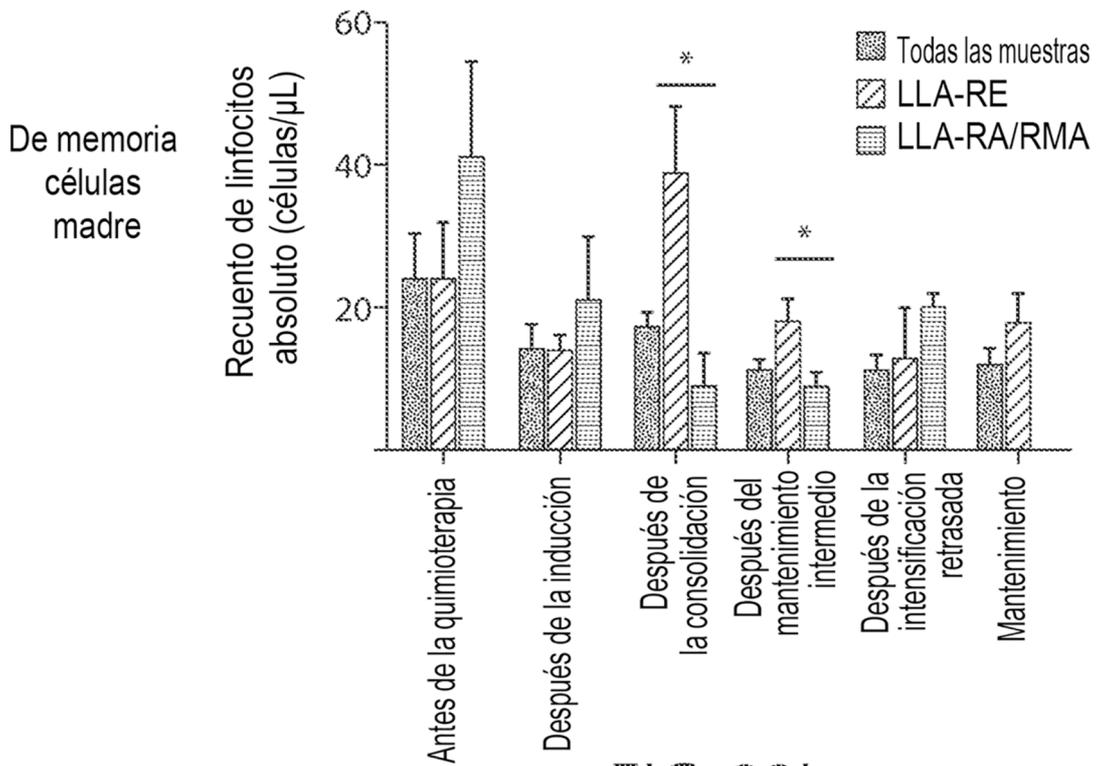


FIG. 23L

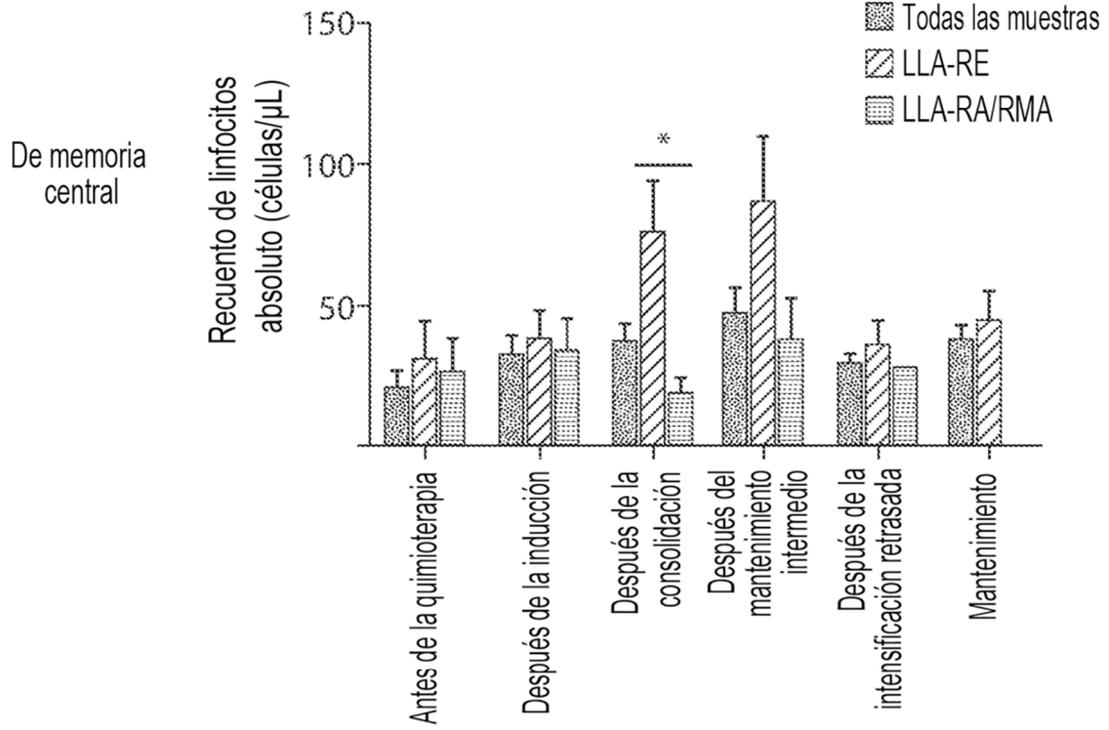


FIG. 23M

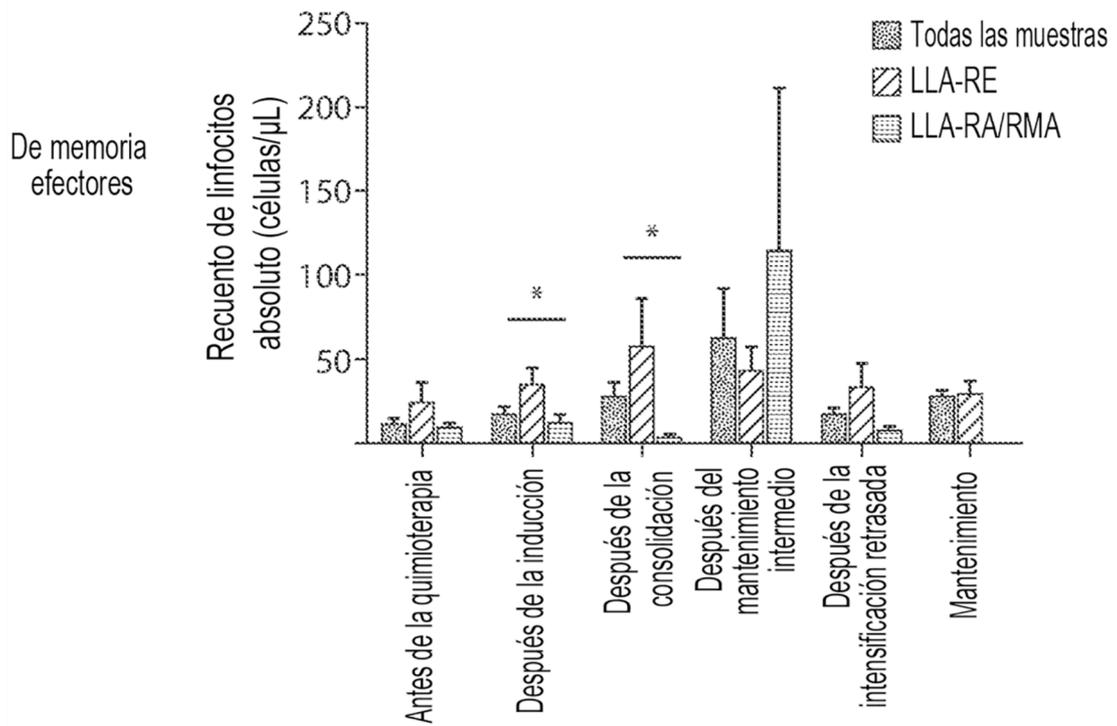
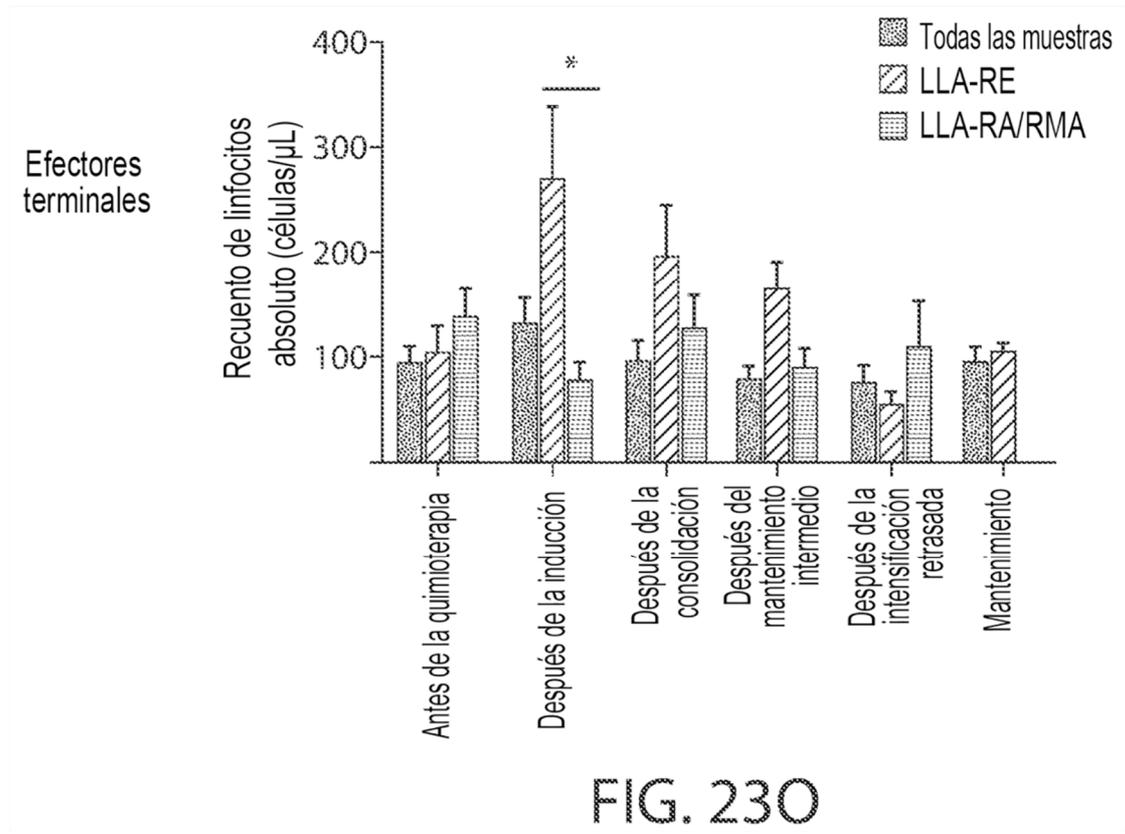


FIG. 23N



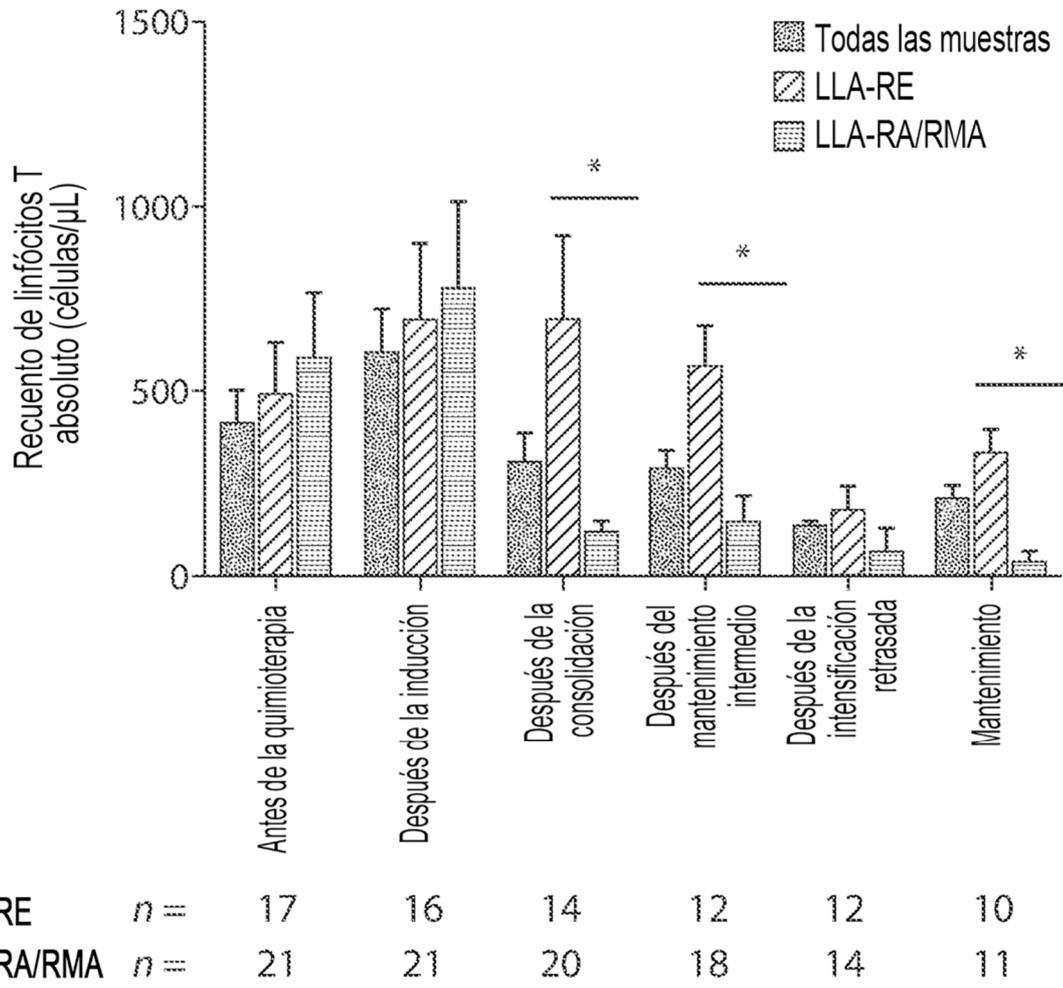


FIG. 24

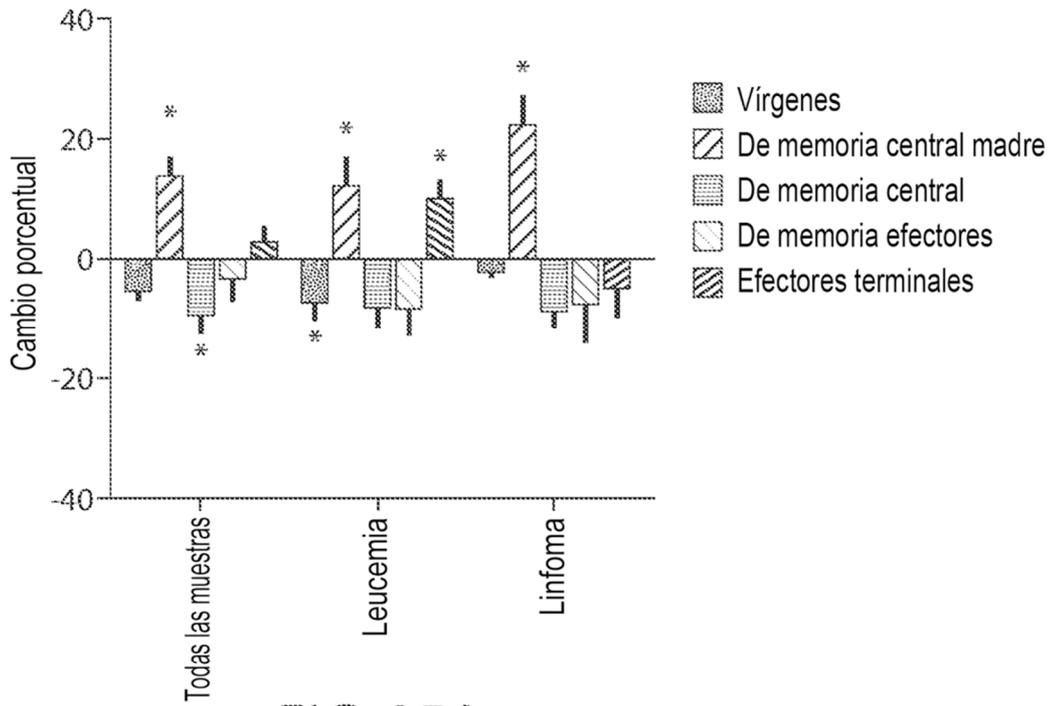


FIG. 25A

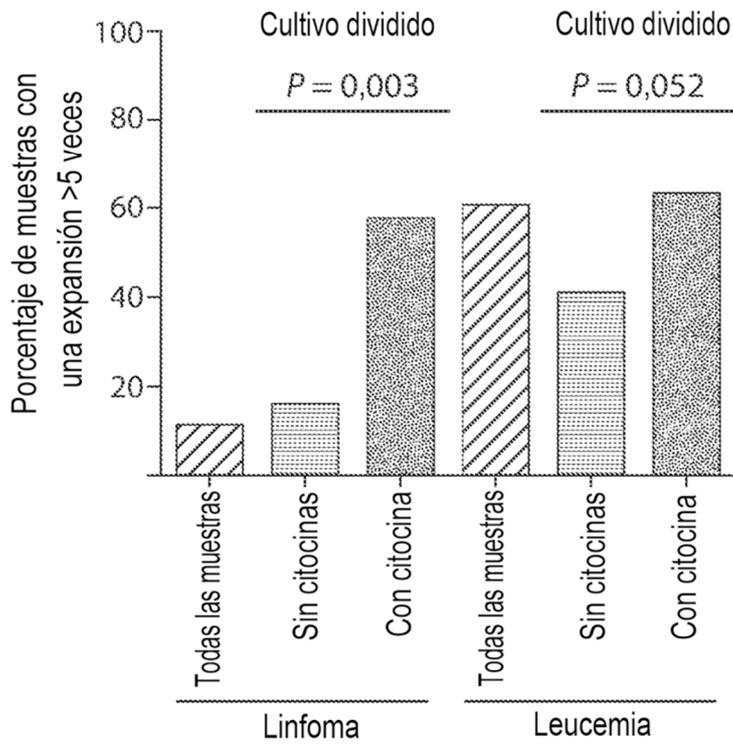


FIG. 25B

- Vírgenes
- ▨ Central madre
- ▩ De memoria central
- ▧ De memoria efectores
- ▦ Efectores terminales

Éxito

Sin éxito

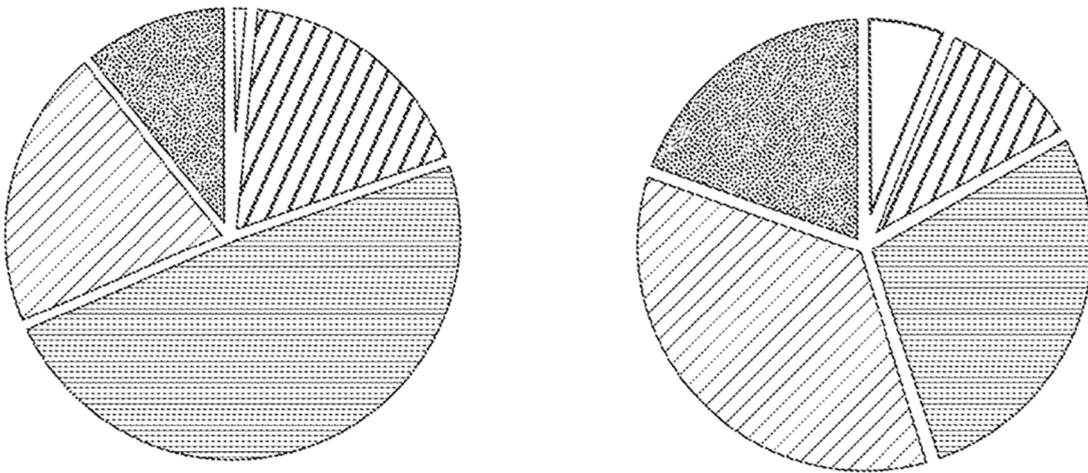


FIG. 26