

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 981 703**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2017 PCT/US2017/049923**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2018 WO18045325**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2017 E 17780539 (7)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024 EP 3507304**

(54) Título: Composiciones y métodos para tratar cáncer con DuoCars

(30) Prioridad:

02.09.2016 US 201662382791 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2024

(73) Titular/es:

**LENTIGEN TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
910 Clopper Road, Suite 200 South Building
Gaithersburg, MD 20878, US**

(72) Inventor/es:

**ORENTAS, RIMAS;
SCHNEIDER, DINA;
HASO, WALEED M.;
MILTENYI, STEFAN y
DROPULIC, BORO**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 981 703 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para tratar cáncer con DuoCars

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad según 35 U.S.C. Sección 119(e) a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 62/382.791, presentada el 2 de septiembre de 2016.

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

Esta solicitud se refiere al campo del cáncer, particularmente a una composición que comprende al menos dos vectores que codifican receptores de antígeno químéricos funcionales, y a métodos de uso de los mismos en inmunoterapia específica de paciente.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer es una de las amenazas más letales para la salud humana. Sólo en Estados Unidos, el cáncer afecta a casi 1,3 millones de nuevos pacientes cada año, y es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares, representando aproximadamente 1 de cada 4 muertes. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de esas muertes. Aunque ha habido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos cánceres, la tasa de supervivencia general a 5 años para todos los cánceres ha mejorado sólo alrededor 10% en los últimos 20 años. Los cánceres, o tumores malignos, metastatizan y crecen rápidamente de manera descontrolada, lo que hace que el tratamiento sea extremadamente difícil. Una de las dificultades de los tratamientos modernos contra el cáncer es la cantidad de tiempo que transcurre entre la biopsia y el diagnóstico del cáncer y el tratamiento eficaz del paciente. Durante este tiempo, el tumor de un paciente puede crecer sin impedimentos, haciendo que la enfermedad progrese más antes de que se aplique el tratamiento. Esto afecta negativamente el pronóstico y a la evolución del cáncer.

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

Los motivos enlazantes de un CAR pueden ser un dominio estructural relativamente estable, tal como el dominio constante de IgG, o se pueden diseñar para ser un enlazador flexible extendido. Se pueden usar motivos estructurales, tales como los derivados de dominios constantes de IgG, para extender el dominio de unión de scFv lejos de la superficie de la membrana plasmática de las células T. Esto puede ser importante para algunas dianas tumorales en las que el dominio de unión está particularmente cerca de la membrana de la superficie de la célula tumoral (tal como para el disialogangliósido GD2; Orentas et al., observaciones no publicadas). Hasta la fecha, los motivos de señalización utilizados en los CAR siempre incluyen la cadena CD3-ζ debido a que este motivo central es la señal clave para la activación de las células T. Los primeros CAR de segunda generación informados presentaban dominios de señalización de CD28 y la secuencia transmembrana de CD28. Este motivo se usó también en los CAR de tercera generación que contenían los motivos de señalización de CD137 (4-1BB) (Zhao Y et al *J Immunol*. 2009; 183 (9): 5563-74). Con la llegada de la nueva tecnología, la activación de células T con perlas unidas a los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, ya no era necesario que el propio CAR codificara la presencia de la "señal 2" canónica de CD28. Usando la activación de perlas, se descubrió que los vectores de tercera generación no eran superiores a los vectores de segunda generación en ensayos *in vitro*, y no proporcionaban un beneficio claro sobre los vectores de segunda generación en modelos de ratón de leucemia (Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, Fitzgerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013; 121 (7):1165-74; Kochenderfer JN et al. *Blood*. 2012; 119 (12):2709-20). Esto se ve confirmado por el éxito clínico de los CAR específicos de CD19 que se encuentran en un CD28/CD3-ζ de segunda generación (Lee DW et al. American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, LA; December 7-10, 2013) y un formato de señalización CD137/CD3-ζ (Porter DL et al. *N Engl J Med*. 2011; 365 (8): 725-33). Además de CD137, otros miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, tales como OX40, también pueden proporcionar señales de persistencia importantes en las células T transducidas con CAR (Yvon E et al. *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5852-60). Igualmente importantes son las condiciones de cultivo en las que se cultivaron las poblaciones de células T CAR.

Los retos actuales en la adaptación más amplia y efectiva de la terapia de CAR para el cáncer se refieren a la escasez de dianas convincentes. Actualmente es fácil crear ligantes para los antígenos de la superficie celular, pero descubrir un antígeno de la superficie celular que sea específico para los tumores y que no cubra los tejidos normales sigue siendo un reto formidable. Una forma potencial de imbuir una mayor especificidad de las células diana para las células

5 T que expresan CAR es usar enfoques combinatorios de CAR. En un sistema, las unidades de señal de CD3-ζ y CD28 se dividen entre dos constructos CAR diferentes expresados en la misma célula; en otro, dos DuoCAR se expresan en la misma célula T, pero uno tiene una afinidad menor y por lo tanto requiere que el CAR alternativo se acople en primer lugar para lograr la actividad completa del segundo (Lanitis E et al. Cancer Immunol Res. 2013;1(1):43-53; Kloss CC et al. Nat Biotechnol. 2013;31(1):71-5). Un segundo reto para la generación de un CAR sencillo basado en 10 scFv como agente inmunoterapéutico es la heterogeneidad de las células tumorales. Al menos un grupo ha desarrollado una estrategia de CAR para el glioblastoma mediante la que la población de células efectoras se dirige contra múltiples antígenos (HER2, IL-13Ra, EphA2) al mismo tiempo con la esperanza de evitar la proliferación de poblaciones diana negativas al antígeno (Hedge M et al. Mol Ther. 2013;21(11):2087-101).

15 La inmunoterapia basada en células T se ha convertido en una nueva frontera en la biología sintética; se prevén múltiples promotores y productos genéticos para dirigir estas células altamente potentes contra el microambiente tumoral, en el que las células T pueden evadir señales reguladoras negativas y mediar en la destrucción eficaz del tumor. La eliminación de células T no deseadas por medio de la dimerización inducida por fármacos de constructos de caspasa 9 inducibles con AP1903 muestra una forma en la que se puede iniciar farmacológicamente un potente 20 interruptor que puede controlar las poblaciones de células T (Di Stasi A et al. N Engl J Med. 2011;365(18):1673-83).

20 La creación de poblaciones de células T efectoras que son inmunes a los efectos reguladores negativos del factor β de crecimiento transformante mediante la expresión de un receptor señuelo demuestra adicionalmente el grado en el que las células T efectoras pueden modificarse genéticamente para lograr una actividad antitumoral óptima (Foster AE et al. J Immunother. 2008;31(5):500-5).

25 Hedge et al. describen en Molecular Therapy, vol. 21, no. 11, 1 noviembre 2013, en las páginas 2087-2101 que la dianización combinatoria compensa el escape del antígeno y mejora las funciones efectoras de las células T transferidas adoptivamente en glioblastoma.

K. Bielamowicz et al. describen en Neuro-Oncology, vol. 17, no. supl. 3, 23 abril 2015, página iii16, células T CAR multiespecíficas para el tratamiento de glioma de alto grado.

30 El documento WO 2014/055657 A1 describe composiciones y métodos para inducir una señal trans mediada por CAR en una célula T.

El documento WO 2015/075468 A1 describe una célula que coexpresa un primer CAR y un segundo CAR en la superficie celular.

El documento WO 2016/102965 A1 describe una célula que coexpresa un primer CAR y un segundo CAR en la superficie celular.

35 Por lo tanto, aunque parece que los CAR pueden desencadenar la activación de las células T de forma similar a un receptor de células T endógeno, un impedimento importante para la aplicación clínica de esta tecnología basada en CAR ha sido hasta la fecha la expansión *in vivo* limitada de células T CAR+, la rápida desaparición de las células después de la infusión, la actividad clínica decepcionante, la recaída de la enfermedad o afección médica subyacente, y el tiempo excesivo entre el diagnóstico y el tratamiento oportuno del cáncer con tales células T CAR+.

40 En consecuencia, existe una necesidad urgente y desde hace tiempo percibida en la técnica de descubrir composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer usando una terapia basada en CAR que pueda mostrar atributos terapéuticos esperados específicos del cáncer sin los inconvenientes mencionados anteriormente.

45 La presente invención aborda estas necesidades proporcionando composiciones que comprenden al menos dos vectores que codifican receptores de antígeno químéricos funcionales, y métodos de uso de los mismos en inmunoterapia específica del paciente que se pueden usar para tratar cánceres y otras enfermedades y/o afecciones.

En particular, la presente invención como se divulga y describe aquí proporciona una composición de inmunoterapia 50 que comprende una o más moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican al menos dos vectores, codificando cada vector un DuoCAR funcional, por lo que la combinación de vectores da como resultado la expresión de dos o más dominios de unión no idénticos, en la que cada dominio o dominios de unión codificados por los vectores están enlazados covalentemente a un dominio transmembrana y a uno o más motivos de señalización intracelular no idénticos, composición de inmunoterapia la cual puede usarse para transducir linfocitos autólogos para generar poblaciones de células linfocíticas antitumorales específicas del paciente activas que pueden infundirse directamente de nuevo en el paciente para promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente que da como resultado la estabilización, reducción, eliminación, remisión del cáncer, o prevención o mejora 55 de la recaída del cáncer, o una combinación de los mismos, de una manera específica del paciente.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está definida por la reivindicación independiente. Las reivindicaciones dependientes describen realizaciones adicionales de la invención.

5 Se proporcionan aquí nuevas composiciones de inmunoterapia adoptiva que comprenden dos o más linfocitos transducidos con vector, así como métodos de uso de las mismas en una inmunoterapia de combinación específica del paciente que puede usarse para tratar cánceres y otras enfermedades y afecciones.

10 En una realización no limitativa para la fabricación de vectores de DuoCAR, cada una de las composiciones y métodos descritos en las realizaciones y aspectos mencionados más arriba, los dos vectores se pueden preparar por separado y después añadirse a las células T secuencialmente o al mismo tiempo. En otra realización no limitativa, el ADN plasmídico de los dos o más vectores puede combinarse antes o durante la transfección de células de producción, o 15 integrarse en el genoma de las células de producción, para producir una mezcla de vectores virales que contienen las múltiples partículas de vector de DuoCAR, posteriormente usadas para la transducción y modificación genética de células T del paciente.

15 Se entenderá que la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, los dos o más vectores lentivirales que expresan receptores de antígeno químéricos (DuoCAR), las células hospedantes, y los métodos como se describen más arriba, son útiles más allá de los aspectos y realizaciones específicos que se describen en detalle aquí. Las características y ventajas anteriores de la descripción resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La descripción detallada siguiente de las realizaciones preferidas de la invención se comprenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos de realizaciones que son preferidas en la presente invención. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a los montajes e instrumentos precisos de las realizaciones mostradas en los dibujos.

25 La FIGURA 1 representa cuatro (4) Productos (Ejemplos 1 a 4) que pueden producirse como entidades comerciales discretas. Estos conjuntos de DuoCAR se pueden crear para dirigirse contra tumores malignos de células B humanas que expresan tres antígenos asociados a leucemia, CD19, CD20 y CD22. En el Producto 1, se usan dos vectores génicos para cotransducir una población de células T activadas. El primer vector codifica dos dominios de unión a antígeno (CD19, CD20) enlazados a un único dominio intracelular (z, cadena zeta de CD3) conectado en virtud de una región transmembrana de CD8 (8). El segundo vector codifica un dominio de unión a CD22 y dos dominios de señalización (BB, derivado de CD137/4-1BB; y z). El segundo Producto, Ejemplo 2, presenta el primer vector con dominios de unión a CD19 y CD20 unidos a dominios de señalización de CD28 y z. El segundo vector codifica un dominio de unión a CD22 y los dominios de señalización de BB y z, y recapituló esencialmente el paquete de señalización de un vector CAR de tercera generación (tres dominios de señalización diferentes). En el 30 tercer Producto, Ejemplo 3, el primer vector codifica el dominio de unión a CD20 y CD22 enlazado a los dominios de señalización de BB y z, y el segundo vector codifica un dominio de unión a CD19 unido a los dominios de señalización de CD28 y z. En el cuarto Producto, Ejemplo 4, el primer vector codifica dominios de unión a CD20 y CD22 y dominios de señalización de BB y z. El segundo vector codifica un dominio de unión a CD19 y un dominio de señalización de z.

35 La FIGURA 2 representa todo el posible componente individual que se puede combinar en conjuntos de DuoCAR para un producto terapéutico que se dirige contra neoplasias malignas de células B. La nomenclatura es idéntica a la de la Figura 1.

40 La FIGURA 3 representa un esquema generalizado para conjuntos de DuoCAR que se pueden aplicar a múltiples necesidades terapéuticas, incluyendo enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias y enfermedades infecciosas. En la Figura, a-CDX, a-CDY, a-CDZ se refieren a dominios de unión a antígeno específicos para tres antígenos diana diferentes, CDX, CDY y CDZ, respectivamente. El aspecto intracelular de los CAR incluye el enlazador CD8 y el dominio transmembrana enlazado a dominios de señalización de CD3-zeta, CD28 o 4-1BB (como en la Figura 1). La combinación específica de cualquiera de estos dos vectores (por ejemplo A más F, en la que los antígenos X, Y y Z se seleccionarían como dianas mientras se proporciona señalización intracelular a través de CD3-zeta y 4-1BB) en un único vector se definirá según la necesidad terapéutica específica.

45 La FIGURA 4 representa un esquema generalizado para conjuntos de DuoCAR en los que dos antígenos se seleccionan como dianas por cada vector. Los vectores que son idénticos a los de la Figura 3 conservan su designación de letra específica (A en la Figura 3 y la Figura 4 son iguales). El nuevo, cuarto, dominio de unión a antígeno se indica mediante a-CDW. Un producto que se dirigiría contra 4 antígenos es un conjunto Duo CAR A+T. En este caso, los antígenos extracelulares CDX, CDY, CDZ y CDW se seleccionarían como dianas mientras se proporcionan señales intracelulares tanto de CD3-zeta como de CD28.

50 La FIGURA 5 representa los CAR actuales en la bibliografía (A, B, C, D) en comparación con los DuoCAR de la presente invención (E, F, G). Pueden crearse vectores de expresión de CAR que induzcan la expresión de un único

dominio de unión (esferas pareadas negras, blancas o rayadas, cada una con especificidades separadas) conectado a un enlazador y dominio transmembrana (caja blanca única). En la figura, una línea gris gruesa representa la membrana celular plasmática. En esta figura, las esferas negras emparejadas podrían representar scFv anti-CD19, las esferas blancas emparejadas representan scFv anti-CD20, y las esferas rayadas emparejadas representan scFv anti-CD22, todas enlazadas uniendo secuencias de aminoácidos, por ejemplo multímeros (1, 2, 3, 4, 5 o 6 repeticiones) de GGGGS. Intracelularmente, los dominios de señalización de linfocitos derivados de 4-1BB (CD137), CD28 y la cadena CD3-zeta pueden combinarse como se muestra. (A) En CAR únicos, un dominio de unión único se combina con un dominio transmembrana y 2 dominios de señalización, creando un CAR de segunda generación. (B) En CAR divididos, dos ligantes diferentes se expresan con dominios de señalización individuales que deben combinarse para hacer eficaz la señalización de células T tras el reconocimiento de dos antígenos distintos. (C) En CAR en tandem, dos dominios de unión están unidos a un único dominio de señalización. En este caso, la unión de cualquier dominio induce la activación completa de las células T. (D) En CAR múltiples de un vector, dos CAR completamente funcionales se expresan a partir de un único vector, cada uno capaz de unirse a sólo un antígeno. (E) Por el contrario, los DuoCAR están compuestos de dos vectores y expresan al menos tres dominios de unión, con múltiples combinaciones de dominios de señalización posibles. Las características esenciales que diferencian el DuoCAR son la expresión de dos o más transcritos, la multiplicidad de dominios de unión (siendo al menos uno multi-diana), y las características de señalización completamente funcionales de al menos una de las dos proteínas de superficie celular expresadas. (F) En un formato de ligante soluble de especificidad sencilla de DuoCAR, la porción del CAR codificada por los vectores expresa una etiqueta o un motivo anti-etiqueta que también codifica motivos de señalización transmembrana e intracelular (vectores base de CAR, no idénticos con respecto a motivos intracelulares). Los vectores base se unen a proteínas solubles que contienen tanto los dominios de scFv que interaccionan con antígeno como una etiqueta o motivo antietiqueta para mediar en la unión a la propia proteína de base de CAR. Una vez que las proteínas solubles se unen a las proteínas base de CAR, se reconstituyen las mismas características estructurales que median la actividad antitumoral mediada por el DuoCAR [como en (E)]. (G) En un formato de ligante soluble de especificidad dual de DuoCAR, las interacciones de doble especificidad "etiqueta"- "anti-etiqueta" son únicas, de manera que sólo uno de los ligantes solubles puede unirse a sólo uno de los vectores base. En este caso, el diamante negro en el vector base y el ligante en forma de ángulo en la proteína scFv dual soluble pueden representar una interacción "biotina"- "anti-biotina", y la forma de media luna negra en el segundo vector base de CAR interactúa con el óvalo negro en la estructura de scFv de especificidad sencilla y puede representar una interacción "FITC"- "anti-FITC".

La FIGURA 6 representa los niveles de expresión en la superficie celular de constructos de CAR en células T humanas primarias transducidas con vectores de expresión de CAR que difieren entre formatos de segunda generación (dos dominios coestimuladores) y tercera generación (tres dominios coestimuladores). Las células T se transdijeron para expresar los siguientes CAR: sin CAR (simulado), un CAR de segunda generación (CAR-A-28z), un CAR de tercera generación (CAR-A-28BBz), y un CAR de segunda generación alternativo (CAR-A-BBz). El nivel de expresión en superficie del CAR se detectó mediante citometría de flujo, y se presenta como intensidad de fluorescencia media (MF), eje y. La MF de ambos CAR de segunda generación fue mucho más brillante, incluso aunque todos los constructos expresaron el mismo dominio de unión de CAR.

La FIGURA 7 representa la expresión en superficie de DuoCAR en células T humanas. Las células T humanas se activaron con nanomatriz CD3-CD28 (TransAct, Miltenyi Biotec) en presencia de IL-2, se transdijeron con dos vectores (uno que codifica un CAR CD20-CD19 en tandem y uno que codifica un CAR CD22 sencillo, por lo tanto, un formato 2+1 Duo-Set), y después se analizaron para determinar la expresión de los dominios CD19-, CD20- o CD22-scFv por citometría de flujo usando CD19, CD20 o CD22 recombinantes para la tinción. Las columnas emparejadas muestran tinción dual para los scFv de CD20 y CD19, columna izquierda, y los scFv de CD22 y CD19, columna derecha. La fila 1 muestra células T que no se transdijeron (UTD), y por lo tanto no muestran unión. La fila 2 muestra células T transducidas con LV que codifica un vector CAR CD20_CD19 con dominios transmembrana CD8 y de señalización intracelular de CD28 y CD3-zeta (20-19-28z). Aunque se observa tinción dual para la unión de CD20 y CD19 (panel izquierdo), sólo se observa la unión de CD19 en el panel derecho. La fila 3 muestra células T transducidas con un vector CAR CD22 con dominios transmembrana CD8 y de señalización intracelular de 4-1BB y CD3-zeta (22-BBz). No se observa tinción dual con CD19 o CD20 (panel izquierdo), y sólo se observa una única población de células capaces de unirse a CD22 (panel derecho). En la Fila 4, las células T se transducen con un DuoSet que comprende ambos vectores en la fila 2 y la fila 3. Sólo el DuoSet expresa los tres dominios de unión codificados por CAR (el 42 % de las células expresan CD20_19 (panel izquierdo), y el 38 % expresa los dominios de unión a CD22 y CD19 (panel derecho). Como scFv de CD22 y CD19 están en cada una de las dos proteínas transmembrana separadas que comprenden el DuoSet, el 38 % representa la población verdadera que expresa DuoSet en este ejemplo.

La FIGURA 8 representa la actividad citolítica antitumoral de células T que expresan DuoCAR. Las células T humanas transducidas con componentes de CAR sencillo (20_19-28z o 22-BBz) o DuoSets (20_19-28z + 22-BBz), como se describe en la Figura 7, se usaron en el ensayo de células T citotóxicas a cuatro relaciones de efecto a diana diferentes (20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1, como se indica). Las líneas celulares de leucemia usadas como dianas de CAR-T fueron: Raji (expresa los tres antígenos diana), REH (expresa los tres antígenos diana), K562 (control, sin dianas expresadas), K562-CD19 (expresa CD19), K562-CD20 (expresa CD20), y K562-CD22 (expresa CD22).

Sólo las células transducidas con DuoCAR (20-19-28z + 22-BBz, 2+1 DuoSet) presentaron alta actividad citolítica contra ambas líneas celulares de leucemia (Raji y REH), y las tres líneas celulares diana K562 de expresión única (K562-CD19, K562-CD20, K562-CD22).

5 La FIGURA 9 representa la expresión en la superficie celular de DuoCAR en células T humanas primarias, como se logra mediante dos métodos diferentes de preparación de LV. Se usaron los mismos métodos y análisis de datos que en la Figura 7; por lo tanto, se crearon células transducidas con un DuoCAR específico para CD19, CD20 y CD22 (un 2+1 DuoSet en el que un CAR es un ligante de CD20 y CD19 en tandem, y el segundo CAR está compuesto por un ligante de CD22). La primera columna de datos muestra el análisis de citometría de flujo para la expresión de los ligantes de CD19 y CD20, mientras que la segunda columna muestra el análisis de citometría de flujo para los ligantes de CD22 y CD19 presentes como los CAR en células que expresan DuoCAR para cuatro poblaciones distintas correspondientes a los no transducidos, los transducidos con CAR CD22 único, los transducidos dualmente con los CAR CD22 y CD20_19, y los transducidos individualmente con el CAR CD20_CD19 en tandem, en los cuadrantes inferior izquierdo, superior izquierdo, superior derecho e inferior derecho, respectivamente. Tanto el método de transducción LV (cotransducción) como el método de transducción LV individual (cotransfección) proporcionaron un patrón de tinción de DuoCAR similar, en el que más del 30 % de la población de células T fue específica para CD19, CD20 y CD22, en virtud de la expresión de ambas proteínas de superficie celular de CAR.

10

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

20 Como se usan aquí, las formas singulares "un", "una" y "el/la" se refieren tanto al singular como al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un antígeno" incluye antígenos individuales o una multitud de ellos, y puede considerarse equivalente a la frase "al menos un antígeno". Como se usa aquí, el término "comprende" significa "incluye". Por tanto, "que comprende un antígeno" significa "que incluye un antígeno", sin excluir otros elementos. La frase "y/o" significa "y" u "o". Debe entenderse además que todos y cada uno de los

25

30

tamaños de bases o aminoácidos, y todos los pesos moleculares o valores de masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos, son aproximados, y se proporcionan con fines descriptivos, a menos que se indique lo contrario. Aunque se pueden usar muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, a continuación se describen métodos y materiales particularmente adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las explicaciones de los términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos, y no pretenden ser limitativos. Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos:

La expresión "alrededor de", cuando se refiere a un valor medible, tal como una cantidad, una duración temporal, pretende abarcar variaciones de +/-20 %, +/-10 %, o más preferiblemente +/- 5 %, o +/- 1 %, o preferiblemente aún +/- 0,1 % del valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para llevar a cabo los procedimientos descritos.

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

40 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para tratar enfermedades y/o afecciones, así como cánceres que incluyen, pero no se limitan a, neoplasias hematológicas y tumores sólidos. La presente invención se refiere a una estrategia específica del tumor, específica del paciente, de transferencia celular adoptiva de células T transducidas con dos o más vectores para expresar uno o más DuoCAR.

45 La presente invención se refiere más particularmente a vectores lentivirales que expresan receptores de antígeno químéricos (DuoCAR), así como células hospedantes (por ejemplo, linfocitos, células T) transducidas con los vectores lentivirales que expresan los CARS, a moléculas de ácido nucleico que codifican los vectores lentivirales y receptores de antígeno químéricos, y también se proporcionan métodos de uso de los mismos, por ejemplo para tratar un cáncer en un sujeto.

50 Sorprendente e inesperadamente, los inventores han descubierto ahora que una composición de inmunoterapia que comprende una población de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente es mucho más eficaz como agente inmunoterapéutico antitumoral si la población de células de linfocitos autólogas se transduce con dos o más vectores lentivirales que codifican receptores de antígeno químéricos simples o múltiples (DuoCAR). El uso de al menos dos o más vectores lentivirales que expresan CARS sencillos o múltiples parece promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente que da como resultado la estabilización, reducción, eliminación o remisión del cáncer del tumor, o la prevención o mejora de la recaída del cáncer, o cualquier combinación de los mismos, de una manera específica del paciente.

55

Tales poblaciones de células T antitumorales específicas del paciente activas como se describe aquí pueden infundirse directamente de nuevo en el paciente para promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales

específicas del paciente que da como resultado la estabilización, reducción, eliminación, remisión del cáncer, o la prevención o mejora de la recaída del cáncer, o una combinación de las mismas, de una manera específica del paciente. Esto también incluye la expansión eficaz y la contracción rápida de la población celular terapéutica.

Así, en su aspecto más amplio, la novedad de esta inmunoterapia adoptiva reside en el uso de una combinación de vectores de expresión de CAR. La característica diferenciadora es que, al contrario que el uso convencional de un solo vector que expresa uno o más receptores de antígeno quiméricos, el enfoque de Duo CAR confiere tanto múltiple especificidad de antígeno como señalización óptima para la actividad de células T antitumorales *in vivo*. Crear un sistema mediante el cual tres o más antígenos son seleccionados eficazmente como dianas es muy superior a enfoques sencillos o en tandem que permiten que las células cancerosas tumorales generen variantes de escape que dan como resultado metástasis tumoral y/o recaída tumoral. El uso de dos o más vectores que codifican receptores de antígeno quiméricos (DuoCAR) únicos o múltiples en los que la combinación específica de al menos un dominio o dominios de unión en cada vector no es idéntica, junto con el requisito de que al menos una combinación o combinaciones de motivos de señalización no sean idénticas entre cada uno de los vectores, sirve para garantizar que una o más poblaciones de linfocitos modificadas genéticamente transducidas con tales duo CAR derivados de vectores lentivirales generen una población de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente capaz de promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células linfocitarias antitumorales específicas del paciente que da como resultado la estabilización, reducción, eliminación o remisión del tumor o cáncer, y/o la prevención o mejora de la recaída del tumor o cáncer, o cualquier combinación de los mismos, de una manera específica del paciente.

En un aspecto, se proporciona una composición de inmunoterapia que comprende una o más moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican al menos dos vectores (DuoCAR), codificando cada vector un CAR funcional, en la que al menos un dominio o dominios de unión en uno de los vectores no son idénticos, y mediante la que la combinación de vectores da como resultado la expresión de dos o más dominios de unión no idénticos, en la que cada dominio o dominios de unión codificados por vector están conectados covalentemente a un dominio transmembrana y a uno o más motivos de señalización intracelular no idénticos.

En otro aspecto, se proporciona una composición de inmunoterapia que comprende una o más moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican al menos dos vectores (DuoCAR), codificando cada vector un CAR funcional, por lo que la combinación de vectores da como resultado la expresión de dos o más dominios de unión no idénticos, en el que cada dominio o dominios de unión codificados por los vectores están covalentemente unidos a un dominio transmembrana y a uno o más motivos de señalización intracelular no idénticos, con la condición de que dicha composición de inmunoterapia excluya específicamente los CAR sencillos, los CAR divididos, los CAR en tandem, o los CAR múltiples representados en la Figura 5 (A), (B), (C) o (D), respectivamente.

La eficacia inmunoterapéutica y la prevención o la mejora de la recaída del tumor o el cáncer conseguidas con las células T modificadas con el vector lentiviral DuoCAR de la presente invención es significativamente mayor y sinérgicamente mayor que la conseguida con el diseño de CAR convencionales singulares. Es esta combinación única de beneficios terapéuticos biológicos la que se correlaciona con el aumento de expansión *in vivo*, la persistencia de células linfocitarias antitumorales específicas del paciente que da como resultado la estabilización, reducción, eliminación o remisión del tumor o cáncer en comparación con inmunoterapia convencional de células T basada en CAR.

Pueden crearse vectores de expresión CAR que induzcan la expresión de un único dominio de unión (esferas negras, blancas o rayadas, cada una con especificidades separadas, Figura 5) conectado a un enlazador y dominio transmembrana (caja blanca única). La Figura 5, más abajo, representa una comparación de los CAR convencionales frente a los DuoCAR de la presente invención. En la Figura 5, una línea gris gruesa representa la membrana celular plasmática. Intracelularmente, los dominios de señalización de linfocitos derivados de 4-1BB (CD137), CD28 y la cadena CD3-zeta pueden combinarse como se muestra. En todos los ejemplos y usos del dominio de señalización de CD3 aquí, se incluyen modificaciones de la cadena zeta de CD3 mediante la alteración de uno, dos o tres de los motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) mediante mutagénesis selectiva del resto de tirosina en ellos, u otras mutaciones de este tipo que hacen que el motivo ITAM ya no sea una diana para la fosforilación. En CAR individuales (Figura 5A), un dominio de unión individual se combina con un dominio transmembrana y 2 dominios de señalización. En los CAR divididos (Figura 5B), dos ligantes diferentes se expresan con dominios de señalización individuales que deben combinarse para proporcionar una señalización eficaz. En CAR en tandem (Figura 5C), dos dominios de unión están unidos a un único dominio de señalización. En CAR múltiples de un vector (Figura 5D), dos CAR completamente funcionales se expresan a partir de un único vector. Los Duo-CAR de la presente invención (por ejemplo, Figura 5E) codifican al menos dos vectores, codificando cada vector un CAR funcional, por lo que la combinación de vectores da como resultado la expresión de dos o más dominios de unión no idénticos, en el que cada dominio o dominios de unión codificados por vector están unidos covalentemente a un dominio transmembrana y a uno o más motivos de señalización intracelular no idénticos. Las características esenciales que diferencian los DuoCAR de la presente invención son el uso de dos o más vectores, la multiplicidad de dominios de unión, y las características de señalización completamente funcionales (con respecto a la expansión de células T *in vivo*) de al menos una de las dos proteínas de superficie celular expresadas.

En otro aspecto, los DuoCAR se usan para mejorar la respuesta inmunitaria al tumor mediada por la población de células T terapéuticas. La respuesta inmunitaria se mejora de al menos tres formas.

En primer lugar, al proporcionar a las células T una señal adicional para expandirse y sobrevivir en el cuerpo, los DuoCAR de la presente invención permiten la persistencia de la población de células T terapéuticas en virtud de la estimulación de la población de células T al encontrar un autoantígeno (por ejemplo CD19), cuya pérdida puede tolerarse por parte del paciente y aún así sirve para proporcionar una señal estimuladora para la población celular terapéutica que no reside en el propio tejido tumoral. Es bien conocido establecido que los DuoCAR de tercera generación (que expresan tres dominios coestimuladores intracelularmente, unidos a un único ligante similar a Ig extracelular) no se expresan tampoco en células T terapéuticas en comparación con los DuoCAR que expresan dos dominios coestimuladores intracelulares. Por ejemplo, en la Figura 6, más abajo, el nivel de expresión de constructos de CAR en células T humanas primarias difiere entre constructos de segunda generación (dos dominios coestimuladores) y tercera generación (tres dominios coestimuladores). Las células T se transdijeron para expresar los siguientes CAR: sin CAR (simulado), un CAR de segunda generación (CAR-A-28z), un CAR de tercera generación (CAR-A-28BBz), y un CAR de segunda generación alternativo (CAR-A-BBz). El nivel de expresión en superficie del CAR se detectó mediante citometría de flujo, y se presenta como intensidad de fluorescencia media (MF), eje y. La MF de ambos CAR de segunda generación fue mucho más brillante, incluso aunque todos los constructos expresaron el mismo dominio de unión a CAR.

Proporcionando una tercera secuencia activadora de células T en un constructo de CAR de vector separado, los inventores pueden recuperar la ventaja de expresar tres dominios coestimuladores, sin incurrir en la desventaja de la expresión disminuida del CAR en la superficie de células T.

En un segundo aspecto, los DuoCAR de la presente invención pueden dirigirse contra tipos celulares distintos del tumor que median efectos inmunosupresores. Por ejemplo, si las células B que expresan CD19 están presentes en la lesión tumoral y también inhiben una inmunidad antitumoral, como por la producción de IL-4 u otros mediadores, el segundo beneficio para el uso de la población de células T específicas del tumor que expresan DuoCAR es que también se elimina la población de células inmunosupresoras.

Por ejemplo, si las células B inmunosupresoras están presentes dentro de una lesión de tumor sólido, estas podrían eliminarse mediante el uso de un DuoCAR específico de células B (tal como DuoCAR específicos de CD19). Si están presentes células inmunosupresoras de tipo fibroblasto, estas podrían eliminarse mediante DuoCAR específicos del estroma (por ejemplo, seleccionando como diana la proteína alfa activadora de fibroblastos (FAP)). Si la vasculatura malformada es responsable de la falta de una respuesta inmunitaria eficaz, un DuoCAR específico para estos tipos de dianas específicas vasculares o de vasos linfáticos (tales como anti-VEGFR) también puede mejorar el resultado terapéutico.

En un tercer aspecto, los DuoCAR de la presente invención se dirigen contra una población inmunosupresora que se encuentra distal con respecto al tumor, es decir, está presente en otro compartimento en el cuerpo. Por ejemplo, usando un DuoCAR para dirigirlo contra células supresoras derivadas de mieloídes (MDSC), que pueden estar presentes en la propia lesión tumoral o en los ganglios linfáticos regionales o la médula ósea. Está bien establecido que los ganglios linfáticos de drenaje tumoral pueden ser lugares de activación inmunitaria o supresión inmunitaria. Esto depende del tono inflamatorio global del ganglio linfático así como de la diferenciación de células dendríticas distales antes de la migración al ganglio linfático. Si un ganglio linfático de drenaje tumoral está poblado con células supresoras derivadas de mieloídes (MDSC) o células presentadoras de antígeno diferenciadas erróneamente tales como células dendríticas, un DuoCAR que se dirija contra estos tipos celulares, aunque distal al propio tumor, también puede mejorar el resultado terapéutico. Más allá de las aplicaciones inmunoterapéuticas de los DuoCAR específicas de cáncer, una segunda aplicación de los DuoCAR sería la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias. La diferencia de las aplicaciones basadas en oncología es que las células reguladoras T (Treg), o las células reguladoras T inducidas (iTreg), u otras células cultivadas en condiciones que promueven respuestas inmunitarias similares a Th-2, serían el sustrato celular. Para la aplicación oncológica, las células similares a Th-1 son el sustrato celular. En aplicaciones terapéuticas tan diversas como la enfermedad de injerto contra hospedante (GvHD) después del trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), la inflamación alérgica de las vías respiratorias, del intestino, u otra inflamación de la mucosa, o la alergias cutáneas, la presencia de linfocitos modificados con CAR que producen citocinas inmunoinhibidoras, tales como el factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta), serviría para ejercer una amplia señal tolerogénica que mejora la enfermedad autoinmunitaria o activada por inflamación. Este enfoque incluye afecciones inflamatorias neurológicas del sistema nervioso periférico o central (SNC) tales como enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, lesión cerebral traumática, enfermedad de Parkinson, y CET (encefalopatía traumática crónica debida a concusiones o microconciusiones repetidas). Este enfoque también incluye enfermedades de cicatrización progresiva tales como EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

En el tratamiento de enfermedades inflamatorias, se crearían linfocitos específicos para antígenos tisulares, marcadores de angustia en la superficie de células inflamadas, o proteínas plegadas erróneamente (tales como proteína tau o beta-amiloide), generando vectores de expresión de DuoCAR que son específicos para estas dianas. La terapia basada en anticuerpos individuales para el Alzheimer ya está en desarrollo clínico (es decir, Solanezumab de Eli Lilly and Company, y Aducanumab de Biogen, Inc.). En la enfermedad de Alzheimer, el anticuerpo contra beta-amiloide monomérico o agregado podría usarse en un formato de CAR en lugar de ligantes para proteínas de la superficie celular. Los ligantes de la proteína tau o de los péptidos tau unidos por moléculas del MHC también podrían usarse como motivos de unión para los CAR. Los receptores que median la migración de linfocitos hacia tejidos

- periféricos específicos también pueden incluirse en un formato de CAR, para proporcionar especificidad regional a la población de Treg que expresa CAR. Los dominios de receptores de adhesión conocidos por activar la infiltración de linfocitos en tejidos específicos y secuencias de citocinas o receptores o ligantes de citocinas o quimiocinas podrían usarse como parte del dominio CAR. Se sabe que las moléculas de adhesión tales como CD44 e integrina alfa-4 dirigen los linfocitos al SNC, por lo que también se podrían usar dominios de moléculas de adhesión que se sabe que median el comportamiento migratorio del SNC de poblaciones de linfocitos para dirigir los linfocitos que expresan CAR a regiones de enfermedad. Lo mismo sería cierto para el intestino (es decir, ligantes para MAdCAM-1, expresión de una CCR9, o anti-CCL25, etc.), pulmón (es decir, P-selectina o mesotelina), piel (es decir, ligantes para E-selectina), u otras superficies mucosas.
- Para usar este enfoque, un paciente con una afección inflamatoria o cuya enfermedad podría tratarse por mitigación de patología inflamatoria, tal como la enfermedad de Alzheimer, se admitiría en el hospital y se recogería sangre periférica. Las Treg podrían seleccionarse directamente mediante perlas inmunomagnéticas (kit de aislamiento de linfocitos T reguladores, Miltenyi Biotec), o inducirse mediante cultivo en el medio de citocinas apropiado. Estos Treg o iTreg se transducirían entonces con un vector de DuoCAR, y si se requiere, se expandirían *in vitro* (kit de expansión de Treg, Miltenyi Biotec). Los dominios de unión a DuoCAR derivarían de anticuerpos o receptores que median en la migración específica de tejidos y ligantes asociados a enfermedad, tales como anti-beta amiloide. Las células efectoras inmunes manipuladas mediante ingeniería así generadas serían dirigidas contra el sitio apropiado, y producirían citocinas consistentes con su patrón de diferenciación de Th2 o Treg. También se sabe que las células CAR-T pueden modificarse mediante ingeniería para segregar cargas útiles genéticas específicas tras la activación del receptor CAR. Además de la carga útil de DuoCAR expresada a partir del vector, las poblaciones de células T modificadas mediante ingeniería podrían expresar o segregar proteínas o péptidos terapéuticos adicionales tales como: a) DP A-beta (proteasas que degradan beta amiloides), b) proteasas de la matriz (tales como MMP-9 e inhibidores de MMP9 en EPOC), c) péptidos o ligantes de tipo anticuerpo solubles que interfieren con la formación de placas, y d) citocinas (tales como TGF-beta, IL-4, IL-10).
- Los miARN también podrían expresarse dentro de las células para modular la función de las células T. Ejemplos de miARN son miR-92a, miR-21, miR-155, miR-146a, miR-3162, miR-1202, miR-1246 y miR-4281, miR-142, miR-17-92. También se pudieron desarrollar ARNhp para miARN. Los ejemplos son ARNhp dirigidos contra miR-28, miR-150 y miR-107, que normalmente se unen a PD1 y aumentan su expresión.
- Más allá de las aplicaciones basadas en oncología en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, una tercera aplicación de la tecnología de los Duo CAR es la generación de poblaciones de linfocitos terapéuticos específicos para antígenos virales, bacterianos o fúngicos. Por tanto, en cuanto a las aplicaciones oncológicas descritas para tumores malignos de células B, la selección de las enfermedades infecciosas como diana permitiría que los productos de DuoCAR mediaran la actividad immunoprotectora o immunoterapéutica contra los agentes infecciosos o los tejidos enfermos en los que residen basándose en el reconocimiento de antígenos microbianos. A diferencia de los enfoques basados en el receptor de células T (TCR), en los que el propio receptor de células T media el reconocimiento de péptidos codificados por patógenos, el enfoque de Duo CAR utilizaría proteínas de unión expresadas en un formato de vector de CAR que daría reconocimiento similar a un anticuerpo (es decir, que no requiere procesamiento de antígenos) a la población de células T transducidas. La activación de la población terapéutica de células T daría como resultado un locus de activación immune capaz de eliminar las células infectadas, y si el antígeno microbiano no está asociado a células, liberar mediadores solubles como interferón gamma que permitirían montar una respuesta inmune eficaz contra el agente infeccioso.
- Por ejemplo, se sabe que el VIH es altamente variable, y aún así pueden clasificarse clados o familias específicas y crearse anticuerpos contra la proteína de la envoltura viral específica del clado (env, gp120). Usando el enfoque de DuoCAR, se incluyen tres o más ligantes de tipo anticuerpo específicos del clado en los constructos de CAR, dando como resultado una amplia actividad inmunitaria anti-VIH. Además de las proteínas víricas, se puede seleccionar como diana la proteína bacteriana. Un desafío médico actual es el tratamiento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos que a menudo surgen en entornos sanitarios. Estos incluyen VRE (enterococos resistentes a vancomicina), MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), KPC (bacterias gramnegativas productoras de carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*, también CRKP), y otras. Los antígenos de superficie celular de *Klebsiellai* incluyen el antígeno O (9 variantes) y el antígeno K (aprox. 80 variantes). El espectro del antígeno O podría cubrirse fácilmente con una pequeña biblioteca de DuoCAR, como lo podría ser un número de los antígenos K. Para su uso, se crearían constructos de CAR que presentan anticuerpos que se unen a diferentes serotipos K u O, y estos vectores de CAR se usarían para transducir una población de células efectoras de tipo Th1, se aislarían y activarían como para aplicaciones oncológicas. En enfermedades fúngicas, el trabajo de L. Cooper et al. (Kumasesan, P.R., 2014, PNAS USA, 111:10660) demostró que una proteína de unión fúngica expresada normalmente en células humanas, dectina-1, se puede reconfigurar como un CAR y usarse para controlar el crecimiento fúngico *in vitro*. La enfermedad humana aspergilosis se produce en individuos gravemente inmunosuprimidos, y está causada por el hongo *A. fumigatus*. Múltiples grupos han producido anticuerpos monoclonales específicos para los componentes antigenicos de la superficie celular de *Aspergillus*, abriendo así la puerta para inmunoterapia adoptiva con los DuoCAR que se dirigen contra tres o más antígenos de *Aspergillus* en la superficie fúngica. Por tanto, en todas estas aplicaciones de enfermedades infecciosas, la capacidad de crear ligantes de tipo inmunoglobulina contra antígenos microbianos permite que se seleccione como diana una pluralidad de antígenos por poblaciones de linfocitos efectores que expresan los CAR.

Lo que sigue es una descripción detallada de los DuoCAR que pueden usarse en la población o poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente descritas aquí, incluyendo una descripción de su dominio extracelular, el dominio transmembrana y el dominio intracelular, junto con una descripción adicional de los DuoCAR, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, conjugados, nucleótidos, expresión, vectores, y células hospedantes, composiciones para uso en métodos de tratamiento, composiciones, y kits que emplean los DuoCAR descritos. Aunque las composiciones y métodos de la presente invención se han ilustrado con referencia a la generación y utilización de los DuoCAR, se contempla aquí que las composiciones y métodos pretenden incluir específicamente la generación y utilización de los TrioCAR y QuattroCAR.

A. Receptores de antígeno quiméricos (como los presentes en los DuoCAR)

5 Los DuoCAR descritos aquí comprenden al menos dos vectores, codificando cada vector un CAR funcional, por lo que la combinación de vectores da como resultado la expresión de dos o más dominios de unión no idénticos, en los que cada dominio o dominios de unión codificados por los vectores están covalentemente unidos a un dominio transmembrana y a uno o más motivos de señalización intracelular no idénticos, siendo al menos un dominio extracelular capaz de unirse a un antígeno, al menos un dominio transmembrana y al menos un dominio intracelular.

10 Un CAR es una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene los dominios de unión al antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, fragmento variable monocatenario (scFv)) unidos a dominios de señalización de células T a través del dominio transmembrana. Las características de los DuoCAR incluyen su capacidad de redirigir la especificidad y reactividad de células T hacia una diana seleccionada de una manera no restringida al MHC, y explotar las propiedades de unión al antígeno de anticuerpos monoclonales. El reconocimiento del antígeno no restringido al

15 MHC otorga a las células T que expresan los DuoCAR la capacidad de reconocer el antígeno independientemente del procesamiento del mismo, evitando así un mecanismo importante de escape del tumor. Además, cuando se expresan en células T, los DuoCAR ventajosamente no se dimerizan con las cadenas alfa y beta del receptor de células T endógeno (TCR).

20 Como se describe aquí, los dominios de señalización de células T intracelulares de los DuoCAR pueden incluir, por ejemplo, un dominio de señalización del receptor de células T, un dominio de señalización coestimulador de células T, o ambos. El dominio de señalización del receptor de células T se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de un receptor de células T, tal como, por ejemplo, y sin limitación, la porción intracelular de la proteína CD3 zeta.

25 El dominio de señalización coestimulador se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora, que es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de los linfocitos contra el antígeno. En algunos casos, los dominios de activación pueden atenuarse mediante la mutación de sitios específicos de fosforilación, es decir, los motivos ITAM en la cadena CD3 zeta, modulando cuidadosamente de este modo el grado 30 de transducción de señales mediado por ese dominio.

30 1. Dominio extracelular

35 En un ejemplo, el CAR usado en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente como se describe aquí, comprende un elemento de unión específico de la diana denominado de otro modo un dominio o resto de unión a antígeno. La elección del dominio depende del tipo y número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede escogerse para reconocer un ligando que actúa como marcador de superficie celular en células diana asociadas con un estado patológico particular. 40 Por tanto, los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión al antígeno en el CAR incluyen aquellos asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias y células cancerosas.

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

55 En un aspecto, el antígeno tumoral comprende uno o más epítopos antigenéticos de cáncer asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunológico. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos de tejido tales como MART-1, tirosinasa y GP 100 en melanoma, y fosfatasa ácida prostática (PAP) y antígeno específico de la próstata

(PSA) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, tal como el oncogén HER-2/Neu/ErbB-2. Otro grupo más de antígenos diana son los antígenos oncofetales tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el linfoma de células B, la inmunoglobulina idiotipo específica del tumor constituye un antígeno de inmunoglobulina verdaderamente específico del tumor que es exclusivo de cada tumor individual. Los antígenos de diferenciación de células B, tales como CD19, CD20, CD22, y CD37, son otros candidatos para antígenos diana en el linfoma de células B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, CD22, idiotipo) se han usado como dianas para inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

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

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

En un ejemplo preferido, la porción del dominio de unión a antígeno del CAR se dirige contra un antígeno que incluye, pero no se limita a, CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33, c-Met, PSMA, glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR. En aún otro ejemplo, se proporciona aquí un DuoCAR que comprende un dominio de unión a Tag o anti-Tag.

Dependiendo del antígeno deseado contra el que se dirigirá, el CAR se puede diseñar adicionalmente para incluir el dominio de unión al antígeno apropiado que sea específico para la diana antigénica deseada. Por ejemplo, si CD19 es el antígeno deseado contra el que se dirige, se puede usar un anticuerpo, o su subfragmento scFv específico para CD19, como el dominio de unión al antígeno incorporado en el CAR.

En un ejemplo ilustrativo, la porción del dominio de unión a antígeno del CAR se dirige contra CD19. Preferentemente, el dominio de unión a antígeno en el CAR es scFv anti-CD19, en el que la secuencia de ácido nucleico del scFv anti-CD19 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27. En un ejemplo, el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. En otro ejemplo, la porción de scFv anti-CD19 del CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 28. En un segundo ejemplo ilustrativo, la porción del dominio de unión a antígeno del CAR se dirige contra CD20. Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno en el CAR es scFv anti-CD20, en el que la secuencia de ácido nucleico del anti-CD20 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1. En otro ejemplo, la porción de scFv anti-CD20 del CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. En un tercer ejemplo ilustrativo, la porción del dominio de unión a antígeno del CAR se dirige contra CD22. Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno en el CAR es scFv anti-CD22, en el que la secuencia de ácido nucleico del anti-CD22 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7. En otro ejemplo, la porción de scFv anti-CD22 del CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8.

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

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un CAR capaz de unirse a un antígeno derivado de una cepa bacteriana de *Staphylococci*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, o *Salmonella*. En particular, se

proporciona un CAR capaz de unirse a un antígeno derivado de una bacteria infecciosa, por ejemplo Helicobacter pyloris, Legionella pneumophila, una cepa bacteriana de Mycobacteria sps. (por ejemplo, M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. kansaii, o M. gordonea), Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Streptococcus del Grupo A, Streptococcus del Grupo B (Streptococcus agalactiae), Streptococcus pneumoniae, o Clostridium tetani, o una combinación de los mismos.

2. Dominio transmembrana

En los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente tal como se describen aquí, el CAR comprende uno o más dominios transmembrana fusionados al dominio extracelular del CAR.

10 En un ejemplo, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en la que el dominio enlazador codificado deriva del dominio extracelular de CD8, y está unido al dominio transmembrana.

En un ejemplo, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en la que el dominio enlazador codificado deriva del dominio extracelular del dominio transmembrana, y está unido al dominio transmembrana.

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

20 El dominio transmembrana puede derivar de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína transmembrana o unida a membrana. Las regiones transmembrana de uso particular en la presente invención pueden derivar de (es decir, comprenden al menos la o las regiones transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, CD271, TNFRSF19, Fc épsilon R, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá restos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. Preferiblemente, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, 25 un enlazador oligo- o polipeptídico corto, preferiblemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina o un motivo de triple alanina proporciona un enlazador particularmente adecuado.

30 En un ejemplo, el dominio transmembrana en el CAR de la invención es el dominio transmembrana de CD8. En un ejemplo, el dominio transmembrana de CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11. En un ejemplo, el dominio transmembrana de CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otro ejemplo, el dominio transmembrana de CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

35 En algunos casos, el dominio transmembrana del CAR comprende el dominio bisagra CD8.alfa. En un ejemplo, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 13. En un ejemplo, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En otro ejemplo, el dominio bisagra de CD8 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

40 Sin pretender limitarse a ningún mecanismo de acción particular, se cree que las posibles razones para la función terapéutica mejorada asociada con los DuoCAR ejemplares usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente como se describen aquí de la invención incluyen, por ejemplo, y no a modo de limitación, a) movimiento lateral mejorado dentro de la membrana plasmática, que permite una transducción de señales más eficaz, b) ubicación superior dentro de microdominios de la membrana plasmática, tales como balsas lipídicas, y mayor capacidad para interactuar con cascadas de señalización transmembrana asociadas con la activación de células T, c) ubicación superior dentro de la membrana plasmática por movimiento preferencial lejos de interacciones amortiguadoras o moduladoras a la baja, tales como una menor proximidad o interacción con fosfatases tales como CD45, y d) ensamblaje superior en complejos de señalización del receptor de células T (es decir, la sinapsis inmunitaria), o cualquier combinación de los mismos.

45 En un ejemplo de la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente como se describe aquí, los dominios transmembrana ejemplares no limitantes para uso en los DuoCAR descritos aquí incluyen los dominios transmembrana TNFRSF16 y TNFRSF19 que se pueden usar para derivar los dominios transmembrana TNFRSF y/o dominios enlazadores o espaciadores como se describe en la solicitud de patente provisional en trámite del solicitante núm. 62/239.509, titulada RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICOS Y MÉTODOS DE USO, según se presentó el 9 de octubre, 2015, y asignada a Lentigen Technology, Inc., número de asunto LEN_015PRO, incluyendo, en particular, aquellos otros miembros de TNFRSF enumerados dentro de la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral como se enumera en la Tabla I en la misma.

3. Dominio espaciador

En los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente como se describe aquí, se puede disponer un dominio espaciador entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana de TNFRSF, o entre el dominio intracelular y el dominio transmembrana de TNFRSF. El dominio espaciador significa cualquier oligopéptido o polipéptido que sirve para unir el dominio transmembrana de TNFRSF con el dominio extracelular, y/o el dominio transmembrana de TNFRSF con el dominio intracelular. El dominio espaciador comprende hasta 300 aminoácidos, preferiblemente 10 a 100 aminoácidos, y lo más preferible 25 a 50 aminoácidos.

En varios ejemplos, el enlazador puede incluir un elemento espaciador que, cuando está presente, aumenta el tamaño del enlazador de manera que aumenta la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Los espaciadores ejemplares son conocidos por el experto en la técnica, e incluyen los enumerados en las patentes U.S. núms. 7.964.5667, 498.298, 6.884.869, 6.323.315, 6.239.104, 6.034.065, 5.780.588, 5.665.860, 5.663.149, 5.635.483, 5.599.902, 5.554.725, 5.530.097, 5.521.284, 5.504.191, 5.410.024, 5.138.036, 5.076.973, 4.986.988, 4.978.744, 4.879.278, 4.816.444, y 4.486.414, así como las publicaciones de patente U.S. Pub. núms. 20110212088 y 20110070248.

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

20 Como dominio espaciador, se puede usar la totalidad o una parte de los aminoácidos números 137 a 206 (SEQ ID NO: 15) que es una región bisagra de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP.sub.-001759.3), aminoácidos números 135 a 195 de CD8.beta. (GenBank: AAA35664.1), aminoácidos números 315 a 396 de CD4 (NCBI RefSeq: NP.sub.-000607.1), o los aminoácidos números 137 a 152 de CD28 (NCBI RefSeq: NP.sub.--006130.1). Además, como dominio espaciador, puede usarse una parte de una región constante de una cadena H o cadena L de anticuerpo (región CH1 o región CL, por ejemplo un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16). Además, el dominio espaciador puede ser una secuencia sintetizada artificialmente.

25 Además, en el CAR, se puede unir una secuencia de péptido señal al extremo N-terminal. La secuencia del péptido señal existe en el extremo N de muchas proteínas secretoras y proteínas de membrana, y tiene una longitud de 15 a 30 aminoácidos. Dado que muchas de las moléculas proteicas mencionadas anteriormente como dominio intracelular tienen secuencias de péptidos señal, los péptidos señal pueden usarse como péptido señal para el CAR. En un ejemplo, el péptido señal comprende la secuencia nucleotídica de la secuencia líder (péptido señal) mostrada en SEQ ID NO: 5. En un ejemplo, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6.

4. Dominio intracelular

30 El dominio citoplasmático o de otro modo el dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmune en la que se ha colocado el CAR. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o una actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas. Por tanto, la expresión "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque normalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario usar la cadena completa. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de la función efectora. Se pretende así que la expresión dominio de señalización intracelular incluya cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

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

50 Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa de la célula T, y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de las células T está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmáticas: aquellas que inician la activación primaria dependiente del antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y aquellas que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias).

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

Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que son de uso particular en los CAR descritos aquí incluyen aquellos derivados de TCR zeta (CD3 Zeta), FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, y CD66d. Ejemplos específicos, no limitativos, del ITAM incluyen péptidos que tienen secuencias de aminoácidos números 51 a 164 de CD3.zeta. (NCBI RefSeq: NP.sub.-932170.1), aminoácidos números 45 a 86 de Fc.épsilon.RI.gamma. (NCBI RefSeq: NP.sub.--004097.1), aminoácidos números 201 a 244 de Fc.épsilon.RI.beta. (NCBI RefSeq: NP.sub.--000130.1), aminoácidos números 139 a 182 de CD3.gamma. (NCBI RefSeq: NP.sub.-000064.1), aminoácidos números 128 a 171 de CD3 delta. (NCBI RefSeq: NP.sub.-000723.1), aminoácidos con números 153 a 207 de CD3.épsilon. (NCBI RefSeq: NP.sub.-000724.1), aminoácidos números 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP.sub.--055022.2), aminoácidos números 707 a 847 de 0022 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001762.2), aminoácidos números 166 a 226 de CD79a (NCBI RefSeq: NP.sub.--001774.1), aminoácidos números 182 a 229 de CD79b (NCBI RefSeq: NP. sub. --000617. NP.sub.-1), y aminoácidos números 177 a 252 de CD66d (NCBI RefSeq: NP.sub.--001806.2), y sus variantes que tienen la misma función que estos péptidos. El número de aminoácidos basado en la información de la secuencia de aminoácidos de NCBI RefSeq ID o GenBank descrito aquí se numera en base a la longitud total del precursor (que comprende una secuencia de péptido señal, etc.) de cada proteína. En un ejemplo, la molécula de señalización citoplasmática en el CAR comprende una secuencia de señalización citoplasmática derivada de CD3 zeta. En otro ejemplo, uno, dos o tres de los motivos ITAM en CD3 zeta se atenúan mediante mutación o sustitución del resto de tirosina por otro aminoácido.

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

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

En un ejemplo, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otro ejemplo, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En aún otro ejemplo, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y 4-1BB.

En un ejemplo, el dominio intracelular en el CAR está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 17, y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 19.

En un ejemplo, el dominio intracelular en el CAR está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

En un ejemplo, el dominio intracelular en el CAR está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en el que el dominio de señalización de 4-1BB comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 18, y el dominio de señalización de CD3-zeta comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20.

5. Descripción adicional de los DuoCAR

También se incluyen expresamente dentro del alcance de la invención porciones funcionales de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente como se describen

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

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

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

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

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

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

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

Los DuoCAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de la invención) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos de origen natural. Tales aminoácidos sintéticos son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexanocarboxílico, norleucina, ácido -amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β-fenilserina β-hidroxifenilalanina, fenilglicina, α-naftilanina, ciclohexilanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, omitina, ácido -aminociclopantanocarboxílico, ácido a-aminociclohexanocarboxílico, ácido a-aminocicloheptanocarboxílico, ácido a-(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido γ-diaminobutírico, ácido β-diaminopropiónico, homofenilalanina, y a-terc-butilglicina.

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

- 5 Los DuoCAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos) se pueden obtener mediante métodos conocidos en la técnica. Los DuoCAR se pueden preparar mediante cualquier método adecuado para producir polipéptidos o proteínas. Los métodos adecuados de síntesis *de novo* de polipéptidos y proteínas se describen en referencias, tales como Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2001; y la patente U.S. 5.449.752. Los procedimientos 10 para generar receptores antigenicos químicos, células T que incluyen tales receptores, y su uso (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer) son conocidos en la técnica, y se describen adicionalmente aquí (véanse, por ejemplo, Brentjens et al., 2010, Molecular Therapy, 18:4, 666-668; Morgan et al., 2010, Molecular Therapy, publicado en línea el 23 de febrero, 2010, páginas 1-9; Till et al., 2008, Blood, 112:2261 -2271; Park et al., Trends Biotechnol., 29:550-557, 2011; Grupp et al., N Engl J Med., 368:1509-1518, 2013; Han et al., J. Hematol Oncol., 6:47, 2013; Tumaini et 15 al., Cytotherapy, 15, 1406-1417, 2013; Haso et al., (2013) Blood, 121, 1165-1174; Publicaciones PCT WO2012/079000, WO2013/126726; y la Pub. U.S. 2012/0213783). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de unión a antígeno químico descrito puede incluirse en un vector de expresión (tal como un vector lentiviral) usado para transducir una célula hospedante, tal como una célula T, para producir el CAR descrito. 20 En algunos ejemplos, los métodos para usar el receptor antigenico químico incluyen aislar las células T de un sujeto, transducir las células T con un vector de expresión (tal como un vector lentiviral) que codifica el receptor antigenico químico, y administrar las células T que expresan el CAR al sujeto para un tratamiento, por ejemplo para el tratamiento de un tumor en el sujeto.

B. Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno

- 25 Un ejemplo proporciona además un CAR usado en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente descritas aquí, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o dominio de unión a antígeno o parte del mismo, que se une específicamente a uno o más de los antígenos descritos aquí. Como se usa aquí, una "célula T que expresa un CAR" o una "célula T con CAR" significa una célula T que expresa un CAR y tiene una especificidad para el antígeno determinada, por ejemplo, mediante el dominio de direccionamiento del CAR derivado de anticuerpos.

- 30 Como se usa aquí, un "dominio de unión a antígeno" puede incluir un anticuerpo y fragmentos de unión a antígeno del mismo. El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio, y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, siempre que exhiban la actividad de unión al antígeno deseada. Los ejemplos no limitativos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas y variantes y fragmentos de las mismas conocidos en la técnica que conservan afinidad de unión por el antígeno.

- 40 Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, y se dirigen contra un único epítopo antigenico. El modificador "monoclonal" indica que el carácter 45 del anticuerpo se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. En algunos ejemplos, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se ha transfundido ácido nucleico que codifica las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo de un único anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo), o una progenie del mismo. En algunos ejemplos, se aíslan 50 anticuerpos monoclonales de un sujeto. Los anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas que sustancialmente no tienen ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de las inmunoglobulinas. Se conocen métodos ejemplares de producción de anticuerpos monoclonales; por ejemplo, véase Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (2013).

- 55 Normalmente, una inmunoglobulina tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Los genes de inmunoglobulina incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes del dominio variable de la inmunoglobulina. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

- 60 Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante (o dominio constante) y una región variable (o dominio variable; véase, por ejemplo, Kindt et al. Kuby Immunology, 6^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) En varios ejemplos, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se combinan para unirse específicamente al antígeno. En ejemplos adicionales, sólo se requiere la región variable de la cadena pesada. Por ejemplo, los anticuerpos de camélido de origen natural que consisten en una cadena pesada sólo son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera (véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., Nature, 363:446-448, 1993; Sheriff et al.,

Nat. Struct. Biol., 3:733-736, 1996). Las referencias a "VH" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de anticuerpo, incluida la de un fragmento de unión a antígeno, tal como Fv, ScFv, dsFv o Fab. Las referencias a "VL" o "VL" se refieren al dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo, incluido el de un Fv, ScFv, dsFv o Fab.

- 5 Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una región "estructural" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" (véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región estructural de un anticuerpo, es decir, las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en un espacio tridimensional.

Las CDR son las principales responsables de la unión a un epítopo de un antígeno. Los límites de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse fácilmente usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat et al. ("Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991; esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani et al., (JMB 273:927-948, 1997; esquema de numeración de "Chothia"), y Lefranc et al. ("IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev. Comp. Immunol., 27:55-77, 2003; esquema de numeración de "IMGT"). Las CDR de cada cadena normalmente se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 (desde el extremo N al extremo C), y también se identifican normalmente por la cadena en la que se encuentra la CDR particular. Así, una CDR3 de VH es la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de VL es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Las CDR de cadena ligera a veces se denominan LCDR1, LCDR2, y LCDR3. Las CDR de cadena pesada a veces se denominan LCDR1, LCDR2, y LCDR3.

- 25 Un "fragmento de unión a antígeno" es una porción de un anticuerpo de longitud completa que conserva la capacidad de reconocer específicamente el antígeno afín, así como diversas combinaciones de tales porciones. Los ejemplos no limitativos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, ScFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos de unión a antígeno producidos por la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Kontermann and Dubel (Ed), Antibody Engineering, Vols. 1-2, 2^a ed., Springer Press, 2010).

30 Un anticuerpo monocatenario (scFv) es una molécula genomanipulada que contiene los dominios VH y VL de uno o más anticuerpos unidos por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente fusionada (véase, por ejemplo, Bird et al., Science, 242:423-426, 1988; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85:5879-5883, 1988; Ahmad et al., Clin. Dev. Immunol., 2012, doi:10.1155/2012/980250; Marbry, IDrugs, 13:543-549, 2010). La orientación intramolecular del dominio VH y del dominio VL en un scFv normalmente no es decisiva para los scFv. Por lo tanto, se pueden usar scFv con ambas disposiciones posibles (dominio VH-dominio enlazador-dominio VL; dominio VL-dominio enlazador-dominio VH).

- 35 40 En un dsFv, las cadenas variables de las cadenas pesada y ligera se han mutado para introducir un enlace de disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. También se incluyen diacuerpos, que son anticuerpos bivalentes, biespecíficos, en que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de ese modo a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90:6444-6448, 1993; Poljak et al., Structure, 2:1121-1123, 1994).

45 Los anticuerpos también incluyen formas genéticamente modificadas tales como anticuerpos quiméricos (tales como anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3^a ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

- 50 55 Pueden construirse anticuerpos que no son de origen natural usando síntesis peptídica en fase sólida, pueden producirse de forma recombinante, o pueden obtenerse, por ejemplo, por cribado de colecciones combinatorias que consisten en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables como se describe por Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989). Estos y otros métodos de preparación, por ejemplo, de anticuerpos quiméricos, humanizados, con CDR injertadas, monocatenarios, y bifuncionales, son bien conocidos por los expertos en la técnica (Winter y Harris, Immunol. Today 14:243-246 (1993); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989); Harlow y Lane, más arriba, 1988; Hilyard et al., Protein Engineering: A practical approach (IRL Press 1992); Borrabeck, Antibody Engineering, 2^a ed. (Oxford University Press 1995)).

Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50% o más, y a la inversa, el

anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50% o más. Se conocen ensayos de competición de anticuerpos, y se proporciona aquí un ensayo de competición ejemplar.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno "humanizado" incluye una región estructural humana y una o más CDR de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no humano (tal como de ratón, de rata, o sintético). El anticuerpo

5 no humano o fragmento de unión a antígeno que proporciona las CDR se denomina "donante", y el anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno que proporciona la estructura se denomina "aceptor". En un ejemplo, todas las CDR provienen de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que estén presentes regiones constantes, pero si lo están, pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, tales como al menos alrededor de 85-90%, tal como alrededor de 95% o más idénticas. Por 10 lo tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de anticuerpos humanos naturales.

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

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

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

30 Los métodos de análisis de anticuerpos para determinar su capacidad para unirse a cualquier parte funcional del CAR son conocidos en la técnica, e incluyen cualquier ensayo de unión de anticuerpo-antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, inmunotransferencia Western, inmunoprecipitación, y ensayos de inhibición competitiva (véanse, por ejemplo, Janeway et al., más abajo, la publicación de solicitud de patente U.S. núm. 2002/0197266 A1, y la patente U.S. núm. 7.338.929).

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

C. Conjugados

40 Los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente descritos aquí, una célula T que expresa un CAR, o anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, específicos para uno o más de los antígenos descritos aquí, puede conjugarse con un agente, tal como una molécula efectora o un marcador detectable, usando cualquier número de medios conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden usar medios de unión tanto covalentes como no covalentes. Los conjugados incluyen, pero no se limitan a, moléculas en las que existe un enlace covalente de una molécula efectora o un marcador detectable a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a uno o más de los antígenos descritos aquí. 45 Un experto en la técnica apreciará que se pueden usar diversas moléculas efectoras y marcadores detectables, incluyendo (pero sin limitarse a) agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, toxinas, agentes radiactivos tales como ¹²⁵I, ³²P, ¹⁴C, ³H y ³⁵S y otras etiquetas, restos diana y ligandos, etc.

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

50 El procedimiento para unir una molécula efectora o marcador detectable a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno varía según la estructura química del efecto. Los polipéptidos suelen contener una variedad de grupos funcionales; tales como grupos ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para reaccionar con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para dar como resultado la unión del molécula efectora o marcador detectable. Alternativamente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se derivatiza para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas enlazadoras conocidas, tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL. El enlazador puede ser cualquier molécula usada para unir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a la molécula efectora o marcador detectable. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo o

fragmento de unión a antígeno como con la molécula efectora o marcador detectable. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, peor no se limitan a, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos, o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y la molécula efectora o marcador detectable son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (tal como a través de un enlace de disulfuro a cisteína) o a los grupos amino y carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En varios ejemplos, el enlazador puede incluir un elemento espaciador que, cuando está presente, aumenta el tamaño del enlazador de manera que aumenta la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Los espaciadores ejemplares son conocidos por el experto en la técnica, e incluyen los enumerados en las patentes U.S. núms. 7.964.5667, 498.298, 6.884.869, 6.323.315, 6.239.104, 6.034.065, 5.780.588, 5.665.860, 5.663.149, 5.635.483, 5.599.902, 5.554.725, 5.530.097, 5.521.284, 5.504.191, 5.410.024, 5.138.036, 5.076.973, 4.986.988, 4.978.744, 4.879.278, 4.816.444, y 4.486.414, así como las publicaciones de patente U.S. Pub. núms. 20110212088 y 20110070248.

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

En otros ejemplos, el enlazador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Normalmente, el enlazador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lóbil a ácidos que sea hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazone, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal). (Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. núms. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661.) Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tal como las de la sangre, pero son inestables por debajo de 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertos ejemplos, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de un enlace de acilhidrazone (véase, por ejemplo, la patente U.S. núm. 5.622.929).

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

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

En aún otros ejemplos, el enlazador no es escindible, y la molécula efectora o marcador detectable se libera por degradación del anticuerpo. (Véase la publicación U.S. 2005/0238649).

En varios ejemplos, el enlazador es resistente a la escisión en un entorno extracelular. Por ejemplo, no más de alrededor de 20 %, no más de alrededor de 15%, no más de alrededor de 10%, no más de alrededor de 5%, no más de alrededor de 3%, o no más de alrededor de 1% de los enlazadores, en una muestra de conjugado, se escinden cuando el conjugado está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Se puede determinar si un enlazador es resistente o no a la escisión en un entorno extracelular, por ejemplo, incubando el conjugado que contiene el enlazador de interés con plasma durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16, o 24 horas), y cuantificando después la cantidad de molécula efectora libre o marcador detectable presente en el plasma. Una variedad de enlazadores ejemplares que pueden usarse en conjugados se describen en el documento WO 2004-

010957, la publicación U.S. núm. 2006/0074008, la publicación U.S. núm. 20050238649, y la publicación U.S. núm. 2006/0024317.

En varios ejemplos, se proporcionan conjugados de un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Los compuestos de maitansina adecuados para uso como restos de toxina maitansinoide son bien conocidos en la técnica, y pueden aislarse de fuentes naturales según métodos conocidos, producirse usando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973), o el maitansinol y los análogos de maitansinol se pueden preparar sintéticamente según métodos conocidos. Los maitansinoides son inhibidores mitotómicos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente U.S. núm. 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente U.S. núm. 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en la patente U.S. núms. 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533. Los conjugados que contienen maitansinoides, los métodos para prepararlos, y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. núms. 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163 y la patente europea EP 0 425 235 B1.

Se pueden emplear toxinas adicionales con un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo. Las toxinas ejemplares incluyen exotoxina de *Pseudomonas* (PE), ricina, abrina, toxina diftérica y subunidades de las mismas, ribotoxina, ribonucleasa, saporina, y caliqueamicina, así como toxinas botulínicas A a F. Estas toxinas son bien conocidas en la técnica, y muchas están fácilmente disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Las toxinas contempladas también incluyen variantes de las toxinas (véanse, por ejemplo, véanse, las patente U.S. núms. 5.079.163 y 4.689.401).

La saporina es una toxina derivada de *Saponaria officinalis* que altera la síntesis de proteínas inactivando la porción 60S del complejo ribosomal (Stirpe et al., Bio/Technology, 10:405-412, 1992). Sin embargo, la toxina no tiene ningún mecanismo para ingresar específicamente a las células, y por lo tanto requiere conjugación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconozca una proteína de la superficie celular que se internaliza para que las células la absorban de manera eficiente.

La toxina diftérica se aísla de *Corynebacterium diphtheriae*. Normalmente, la toxina diftérica para uso en inmunotoxinas está mutada para reducir o eliminar la toxicidad no específica. Desde la década de 1970 se conoce un mutante conocido como CRM107, que tiene actividad enzimática completa pero una toxicidad no específica notablemente reducida (Laird y Groman, J. Virol. 19:220, 1976), y se ha usado en ensayos clínicos en seres humanos. Véanse, la patente U.S. núm. 5.792.458 y la patente U.S. núm. 5.208.021.

La ricina es la lectina RCA60 de *Ricinus communis* (ricino). Para ejemplos de ricina, véanse la patente U.S. núm. 5.079.163 y la patente U.S. núm. 4.689.401. La aglutinina de *Ricinus communis* (RCA) se produce en dos formas denominadas RCA₆₀ y RCA₁₂₀ según sus pesos moleculares de aproximadamente 65 y 120 kDa, respectivamente (Nicholson y Blaustein, J. Biochim. Biophys. Acta 266:543, 1972). La cadena A es responsable de inactivar la síntesis de proteínas y matar células. La cadena B une la ricina a los restos de galactosa de la superficie celular y facilita el transporte de la cadena A en el citosol (Olsnes et al., Nature 249:627-631, 1974 and patente U.S. núm. 3.060.165).

Las ribonucleasas también se han conjugado con moléculas seleccionadoras de dianas para uso como inmunotoxinas (véase Suzuki et al., Nat. Biotech. 17:265-70, 1999). Se analizan ribotoxinas ejemplares, tales como α-sarcina y restrictocina, en, por ejemplo, Rathore et al., Gene 190:31-5, 1997; y Goyal y Batra, Biochem. 345 Pt 2:247-54, 2000. Las caliqueamicinas se aislaron por primera vez de *Micromonospora echinospora*, y son miembros de la familia de antibióticos antitumorales de enediína que provocan roturas bicanterarias en el ADN que dan lugar a apoptosis (véase, por ejemplo, Lee et al., J. Antibiot. 42:1070-87, 1989). El fármaco es el resto tóxico de una inmunotoxina en ensayos clínicos (véase, por ejemplo, Gillespie et al., Ann. Oncol. 11:735-41, 2000).

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

El CAR usado en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, una célula T que expresa un CAR, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, específicos para uno o más de los antígenos descritos aquí, también pueden conjugarse con un marcador detectable; por ejemplo, un marcador detectable que puede detectarse mediante ELISA, espectrofotometría, citometría de flujo, microscopía o técnicas de diagnóstico por imágenes (tales como tomografía computarizada (TC), tomografía axial computarizada (CAT), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear NMRI), tomografía por resonancia magnética (MTR), ecografía, examen de fibra óptica, y examen

laparoscópico). Ejemplos específicos, no limitativos, de marcadores detectables incluyen fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enlaces enzimáticos, isótopos radiactivos y metales o compuestos pesados (por ejemplo, nanocristales de óxido de hierro superparamagnéticos para detección mediante MRI). Por ejemplo, marcadores detectables útiles incluyen compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos. También son útiles los marcadores bioluminiscentes, tales como la luciferasa, la proteína fluorescente verde (GFP), y la proteína fluorescente amarilla (YFP). Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, también se pueden conjugar con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa. Cuando un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se conjuga con una enzima detectable, se puede detectar añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que se puede discernir. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable visualmente. Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, también puede conjugarse con biotina y detectarse mediante medida indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Cabe señalar que la propia avidina se puede conjugar con una enzima o un marcador fluorescente.

Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, puede conjugarse con un agente paramagnético, tal como gadolinio. Los agentes paramagnéticos tales como el óxido de hierro superparamagnético también son útiles como marcadores. Los anticuerpos también se pueden conjugar con lantánidos (tales como europio y dispresio), y manganeso. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede marcarse con epitopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (tales como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos).

Un CAR, una célula T que expresa un CAR, un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, también se puede conjugar con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede usarse tanto con fines diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador puede usarse para detectar uno o más de los antígenos descritos aquí, y células que expresan antígenos, mediante rayos X, espectros de emisión, u otras técnicas de diagnóstico. Además, el radiomarcador puede usarse terapéuticamente como una toxina para el tratamiento de tumores en un sujeto, por ejemplo para el tratamiento de un neuroblastoma. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

Los expertos en la técnica conocen bien los medios para detectar tales marcadores detectables. Así, por ejemplo, los radiomarcadores se pueden detectar usando películas fotográficas o contadores de centelleo, y los marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos normalmente se detectan proporcionando a la enzima un sustrato, y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

D. Nucleótidos, expresión, vectores, y células hospedantes

Una realización de la invención proporciona además un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica cualquiera de los DuoCAR, un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, descritos aquí (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos). Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender una secuencia nucleotídica que codifica cualquiera de las secuencias líder, dominios de unión a antígeno, dominios transmembrana, y/o dominios de señalización de células T intracelulares descritos aquí.

En una realización, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno químérico (DuoCAR) que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, al menos un dominio transmembrana, y al menos un dominio de señalización intracelular.

En una realización del CAR usado en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado comprende al menos un fragmento variable monocatenario de un anticuerpo que se une al antígeno.

En otro ejemplo del CAR usado en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado comprende al menos una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que se une al antígeno.

En aún otro ejemplo del CAR usado en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular del CAR codificado comprende al menos un antígeno de unión a antígeno basado en lipocalina (anticalinas) que se une al antígeno.

En un ejemplo del CAR usado en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado está conectado al dominio transmembrana mediante un dominio enlazador.

- 5 En otro ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado está precedido por una secuencia que codifica un péptido líder o señal.
- 10 En aún otro ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado se dirige contra un antígeno que incluye, pero no se limita a, CD19, CD20, CD22, ROR1, mesotelina, CD33/IL3Ra, CD38, CD123 (IL3RA), CD138, BCMA (CD269), GPC2, GPC3, FGFR4, c-Met, PSMA, Glicolípido F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, o cualquier combinación de los mismos.
- 15 En ciertos ejemplos de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular codificado comprende un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD19, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD20, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD22, un dominio de unión a antígeno scFV anti-ROR1, un dominio de unión a antígeno scFV anti-TSLPR, un dominio de unión a antígeno scFV anti-mesotelina, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD33/IL3Ra, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD38, un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD123 (IL3RA), un dominio de unión a antígeno scFV anti-CD138, un dominio de unión a antígeno scFV anti-BCMA (CD269), un dominio de unión a antígeno scFV anti-GPC2, un dominio de unión a antígeno scFV anti-GPC3, un dominio de unión a antígeno scFV anti-FGFR4, un dominio de unión a antígeno scFV anti-c-Met, un dominio de unión a antígeno scFV anti-PSMA, un dominio de unión a antígeno scFV anti-glicolípido F77, un dominio de unión a antígeno scFV anti-EGFRvIII, un dominio de unión a antígeno scFV anti-GD-2, un dominio de unión a antígeno scFV anti-NY-ESO-1 TCR, un dominio de unión a antígeno scFV anti-MAGE A3 TCR, o una secuencia de aminoácidos con el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de la misma, o cualquier combinación de los mismos.
- 20 En un aspecto de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, los DuoCAR proporcionados aquí comprenden además un dominio enlazador.
- 25 En un ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de unión a antígeno extracelular, el dominio de señalización intracelular, o ambos, están conectados al dominio transmembrana mediante un dominio enlazador.
- 30 En un ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio enlazador codificado deriva del dominio extracelular de CD8, y está unido al dominio transmembrana.
- 35 En aún otro ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana comprende una secuencia nucleotídica con 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de la misma.
- 40 En un ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una pero no más de 10 modificaciones, o una secuencia con el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de la misma.
- 45 En otro ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el CAR codificado comprende además un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154, o una combinación de las mismas.
- 50 En aún otro ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de señalización intracelular codificado comprende además un dominio intracelular de CD3 zeta.
- 55 En un ejemplo del CAR descrito aquí, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el dominio de señalización intracelular codificado está dispuesto en un lado C-terminal con respecto al dominio intracelular de CD3 zeta.

En otro ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el al menos un dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio coestimulador, un dominio de señalización primario, o una combinación de los mismos.

5 En ejemplos adicionales de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR en la que el al menos un dominio coestimulador codificado comprende un dominio de señalización funcional de OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12, y 4-1BB (CD137), o una combinación de los mismos.

10 En un ejemplo de los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el CAR que contiene además una secuencia líder o secuencia de péptido señal.

15 En algunos ejemplos, la secuencia nucleotídica puede modificarse con codones. Sin estar limitados a una teoría particular, se cree que la optimización de codones de la secuencia nucleotídica aumenta la eficiencia de traducción de los transcritos de ARNm. La optimización de codones de la secuencia nucleotídica puede implicar la sustitución de un codón nativo por otro codón que codifica el mismo aminoácido, pero puede traducirse mediante ARNt que está más fácilmente disponible dentro de una célula, aumentando así la eficiencia de la traducción. La optimización de la secuencia nucleotídica también puede reducir las estructuras secundarias de ARNm que interferirían con la traducción, aumentando así la eficiencia de la traducción.

20 En un ejemplo de la invención, el ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica de codones modificados que codifica el dominio de unión a antígeno del CAR inventivo. En otro ejemplo de la invención, el ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica de codones modificados que codifica cualquiera de los DuoCAR descritos aquí (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos).

25 "Ácido nucleico", como se usa aquí, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace internucleótido natural, no natural o alterado, tal como un enlace de fosforoamidato o un enlace de fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En algunos ejemplos, el ácido nucleico no comprende inserciones, eliminaciones, inversiones, y/o sustituciones. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, como se analiza aquí, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, eliminaciones, inversiones, y/o sustituciones.

30 Un ácido nucleico recombinante puede ser aquel que tiene una secuencia que no se produce naturalmente, o que tiene una secuencia que se produce mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otro modo estarían separados. Esta combinación artificial a menudo se logra mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo mediante técnicas de ingeniería genética, tales como las descritas en Sambrook et al., más arriba. Los ácidos nucleicos se pueden construir basándose en síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., más arriba, y Ausubel et al., más arriba. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de diversas formas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato, y nucleótidos sustituidos con acridina). Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina sustituida en N6, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención puede adquirirse de compañías, tal como Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA).

35 El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia nucleotídica aislada o purificada que codifique cualquiera de los DuoCAR o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos. Alternativamente, la secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia nucleotídica que está degenerada en cualquiera de las secuencias, o una combinación de secuencias degeneradas.

40 Un ejemplo también proporciona un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia nucleotídica que es complementaria a la secuencia nucleotídica de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí, o una secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia nucleotídica de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí.

La secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas puede hibridarse en condiciones muy rigurosas. Por "condiciones de alta rigurosidad" se entiende que la secuencia nucleotídica se hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia nucleotídica de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen 5 condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o aquel que contiene sólo unos pocos desajustes dispersos de una secuencia aleatoria que casualmente tenía unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que coincidían con la secuencia nucleotídica. Estas pequeñas regiones de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y una hibridación de alta rigurosidad las hace fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente alta 10 incluirían, por ejemplo, condiciones de baja sal y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por alrededor de NaCl 0,02-0,1 M o su equivalente, a temperaturas de alrededor de 50-70°C. Estas condiciones de alta rigurosidad toleran poco o ningún desajuste entre la secuencia nucleotídica y la hebra molde o diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los DuocAR inventivos. Generalmente se aprecia que las 15 condiciones pueden hacerse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

15 También se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos alrededor de 70% o más, por ejemplo alrededor de 80%, alrededor de 90%, alrededor de 91%, alrededor de 92%, alrededor de 93%, alrededor de 94%, alrededor de 95%, alrededor de 96%, alrededor de 97%, alrededor de 98%, o alrededor de 99% idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí.

20 En un ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector de expresión recombinante. A este respecto, un ejemplo proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos. Para los fines aquí, la expresión "vector de expresión recombinante" significa un constructo oligonucleotídico o 25 polinucleotídico genéticamente modificado que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido, o péptido por una célula hospedante, cuando el constructo comprende una secuencia nucleotídica que codifica el ARNm, proteína, polipéptido, o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para que el ARNm, 30 proteína, polipéptido, o péptido se exprese dentro de la célula. Los vectores no se producen de forma natural en su conjunto.

35 Sin embargo, partes de los vectores pueden existir de forma natural. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluidos, pero no limitados a, ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, sintetizados u obtenidos en parte a partir de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces 40 internucleotídicos naturales o no naturales, o ambos tipos de enlaces. Preferiblemente, los nucleótidos o enlaces internucleotídicos no naturales o alterados no obstaculizan la transcripción o replicación del vector.

45 En un ejemplo, el vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier célula hospedante adecuada. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para propagación y expansión o la para expresión, o ambas, tales como plásmidos y virus. El vector se puede seleccionar del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA).

50 También se pueden usar vectores bacteriófagos, tales como λT1, λT1 1, λZapII (Stratagene), EMBL4, y λNMI 149. Ejemplos de vectores de expresión vegetales incluyen pBIO1, pBI101.2, pBHO1.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Ejemplos de vectores de expresión animales incluyen pEUK-Cl, pMAM, y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector viral, por ejemplo un vector retroviral o un vector lentiviral. Un vector lentiviral es un vector derivado de al menos una parte de un genoma lentiviral, incluyendo especialmente un vector lentiviral de autoinactivación como se proporciona en Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores 55 lentivirales que se pueden usar en la clínica incluyen, por ejemplo, y sin carácter limitativo, tecnología de administración de genes LENTIVECTOR.RTM. de Oxford BioMedica plc, el sistema vectorial LENTIMAX.TM. de Lentigen. También están disponibles tipos no clínicos de vectores lentivirales, y serían conocidos por un experto en la técnica.

En la técnica se conocen en general varias técnicas de transfección (véase, por ejemplo, Graham et al., Virology, 52: 456-467 (1973); Sambrook et al., más arriba; Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986); y Chu et al., Gene, 13: 97 (1981)).

55 Los métodos de transfección incluyen coprecipitación con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, Graham et al., más arriba), microinyección directa en células cultivadas (véase, por ejemplo, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980)), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa et al., BioTechniques, 6: 742-751 (1988)), transferencia génica mediada por liposomas (véase, por ejemplo, Mannino et al., BioTechniques, 6: 682-690 (1988)), transducción mediada por lípidos (véase, por ejemplo, Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7413-7417 (1987)), y suministro de ácidos nucleicos usando microproyectiles de alta velocidad (véase, por ejemplo, Klein et al., Nature, 327: 70-73 (1987)).

En un ejemplo, los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante estándar, descritas, por ejemplo, en Sambrook et al., más arriba, y Ausubel et al., más arriba. Se pueden preparar constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, para contener un sistema de replicación funcional

en una célula hospedante procariótica o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivar, por ejemplo, de ColE1, plásmido 2 μ , λ , SV40, virus del papiloma bovino.

El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos del tipo de célula hospedante (por ejemplo, bacteria, hongo, planta, o animal) en la que se va a introducir el vector, según sea apropiado, y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN. El vector de expresión recombinante puede comprender sitios de restricción para facilitar la clonación.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de células hospedantes transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un hospedante auxotrófico para proporcionar prototrofia. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina, y genes de resistencia a ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o normativo unido operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica el CAR (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), o a la secuencia nucleotídica que es complementaria o que se hibrida con la secuencia nucleotídica que codifica el CAR. La selección de promotores, por ejemplo fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido, y específicos del desarrollo, está dentro de la habilidad habitual del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia nucleotídica con un promotor también está dentro de la habilidad del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV, o un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas.

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

Además, se puede hacer que los vectores de expresión recombinantes incluyan un gen suicida. Como se usa aquí, la expresión "gen suicida" se refiere a un gen que hace que muera la célula que expresa el gen suicida. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo un fármaco, a la célula en la que se expresa el gen, y hace que la célula muera cuando la célula entra en contacto con el agente o se expone a él. Los genes suicidas son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen de la timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), citosina desaminasa, nucleósido purínico fosforilasa, y nitrorreductasa.

Un ejemplo proporciona además una célula hospedante que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos aquí. Como se usa aquí, la expresión "célula hospedante" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula hospedante puede ser una célula eucariota, por ejemplo una planta, un animal, un hongo, o un alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo una bacteria o un protozoo. La célula hospedante puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo un ser humano. La célula hospedante puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células hospedantes adecuadas se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, células DH5aE coli, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293. Para los fines de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula hospedante puede ser una célula procariótica, por ejemplo una célula DH5a. Con el fin de producir un CAR recombinante, la célula hospedante puede ser una célula de mamífero. La célula hospedante puede ser una célula humana. Si bien la célula hospedante puede ser de cualquier tipo celular, puede originarse a partir de cualquier tipo de tejido, y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, la célula hospedante puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). La célula hospedante puede ser una célula T.

Para los fines aquí, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivadas, por ejemplo Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, incluidas, pero sin limitarse a, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, timo, u otros tejidos o fluidos. Las células T también pueden enriquecerse o purificarse. La célula T puede ser una célula T humana. La célula T puede ser una célula T aislada de un ser humano. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T, y puede ser de cualquier etapa de desarrollo, incluyendo, pero sin limitarse a, células T doble positivas CD4+/CD8+, células T cooperadoras CD4+, por ejemplo células Th1 y Th2, células T CD8+ (por ejemplo, células T citotóxicas), células infiltrantes de tumores, células T de memoria, células T naïf. La célula T puede ser una célula T CD8+ o una célula T CD4+.

En un ejemplo, los DuoCAR como se describen aquí se pueden usar en células no T adecuadas. Estas células son aquellas con una función efectora inmune, tales como, por ejemplo, las células NK, y las células tipo T generadas a partir de células madre pluripotentes.

También se proporciona mediante un ejemplo una población de células que comprende al menos una célula hospedante descrita aquí. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula hospedante que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo una célula hospedante (por ejemplo, una célula T), que no comprende ninguno de los vectores

- 5 de expresión recombinantes, o una célula distinta de una célula T, por ejemplo una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células hospedantes (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, 10 en la que todas las células de la población son clones de una única célula hospedante que comprende un vector de expresión recombinante, de modo que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En un ejemplo de la invención, la población de células es una población clonal que comprende células hospedantes que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe aquí.

15 Se pueden aislar y/o purificar los DuoCAR (incluidas porciones funcionales y variantes de los mismos), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedantes (incluidas poblaciones de las mismas), y anticuerpos (incluidas porciones de unión a antígeno de los mismos). Por ejemplo, una preparación de células hospedantes purificadas (o aisladas) es aquella en la que la célula hospedante es más pura que las células en su entorno natural dentro del cuerpo. Dichas células hospedantes pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas de purificación estándar. En algunos ejemplos, una preparación de una célula hospedante se purifica de manera que la célula hospedante represente al menos alrededor de 50 %, por ejemplo al menos alrededor de 70 %, del contenido celular total de la preparación. Por ejemplo, la pureza puede ser al menos alrededor de 50%, puede ser mayor que alrededor de 60%, alrededor de 70% o alrededor de 80%, o puede ser alrededor de 100%.

E. Composiciones para uso en métodos de tratamiento

25 Se contempla que los DuoCAR usados en la o las poblaciones de células de linfocitos antitumorales autólogas específicas del paciente se pueden usar en métodos para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero. A este respecto, una realización proporciona una composición farmacéutica para uso en el método para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero los DuoCAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedantes, la población de células, la anticuerpos y/o sus porciones de unión a antígeno, y/o las composiciones farmacéuticas, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el 30 mamífero. Se han descrito más arriba métodos adicionales de uso de los DuoCAR mencionados anteriormente.

Un ejemplo comprende además agotar los linfocitos del mamífero antes de administrar los DuoCAR descritos aquí. Los ejemplos de linfodepleción incluyen, pero pueden no limitarse a, quimioterapia linfodelectora no mieloablativa, quimioterapia linfodelectora mieloablativa, irradiación corporal total, etc.

35 Para los fines de los métodos, en los que se administran células hospedantes o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas del mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas del mamífero. Como se usa aquí, alogénico significa cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se le introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser suficientemente diferente genéticamente para interactuar antigénicamente. Como se usa 40 aquí, "autólogo" significa cualquier material derivado del mismo individuo al que posteriormente se le reintroducirá en el individuo.

45 El mamífero al que se hace referencia aquí puede ser cualquier mamífero. Como se usa aquí, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluidos, pero sin limitarse a, mamíferos del orden Rodentia, tales como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden Logomorpha, tales como conejos. Los mamíferos pueden ser del orden Carnivora, incluidos félidos (gatos) y cánidos (perros). Los mamíferos pueden ser del orden Artiodactyla, incluidos los bóvidos (vacas) y los cerdos (cerdos), o del orden Perssodactyla, incluidos los équidos (caballos). Los mamíferos pueden ser del orden Primates, Ceboides o Simoides (monos), o del orden Antropoides (humanos y simios). Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

50 Con respecto a los métodos, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluido cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de vejiga), cáncer de huesos, cáncer de cerebro (por ejemplo, meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal o anorrecto, cáncer del ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de la nariz, cavidad nasal, u oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, fibrosarcoma, 55 tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico y adenocarcinoma de pulmón), linfoma, mesotelioma, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer nasofaringeo, linfoma no de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica B (CLL), leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, peritoneo, epiplón y de mesenterio, cáncer 60

de faringe, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, sarcoma sinovial, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer de tiroides, y cáncer de uréter.

5 Los términos "tratar" y "prevenir", así como las palabras que derivan de ellos, como se usan aquí, no implican necesariamente un tratamiento o prevención al 100% o completo. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención que un experto en la técnica reconoce que tiene un beneficio o efecto terapéutico potencial. A este respecto, los métodos pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero.

10 Además, el tratamiento o prevención proporcionado por el método puede incluir el tratamiento o prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, por ejemplo cáncer, que se está tratando o previniendo. Además, para los fines aquí, "prevención" puede abarcar retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o afección de la misma.

15 Otro ejemplo proporciona un método para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con los DuoCAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedantes, la población de células, los anticuerpos, y/o las porciones de unión a antígeno de los mismos, o las composiciones farmacéuticas, formando así un complejo, (b) y detectar el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.

20 La muestra puede obtenerse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo biopsia o necropsia. Una biopsia es la extracción de tejido y/o células de un individuo. Dicha eliminación puede consistir en recolectar tejido y/o células del individuo para realizar experimentación con el tejido y/o células retirados. Esta experimentación puede incluir experimentos para determinar si el individuo tiene y/o sufre una determinada afección o estado mórbido. La afección o enfermedad puede ser, por ejemplo, cáncer.

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

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

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

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

40 Otro ejemplo proporciona el uso de los DuoCAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedantes, poblaciones de células, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y/o composiciones farmacéuticas de la invención, para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo, por ejemplo cáncer, en un mamífero. El cáncer puede ser cualquiera de los cánceres descritos aquí.

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

terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En otros ejemplos, el conjugado se aplica como un colirio por vía tópica en la córnea, o por vía intravítreo en el ojo.

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

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

En ejemplos particulares, al sujeto se le administra una composición terapéutica que incluye uno o más de los conjugados, anticuerpos, composiciones, los DuoCAR, células CAR T o agentes adicionales, en un programa de dosificación diaria múltiple, tal como al menos dos días consecutivos, 10 días consecutivos, etc., por ejemplo durante un período de semanas, meses, o años. En un ejemplo, al sujeto se le administran los conjugados, anticuerpos, composiciones o agentes adicionales durante un período de al menos 30 días, tal como al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 24 meses, o al menos 36 meses.

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

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

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

En ciertos ejemplos de la presente invención, las células activadas y expandidas usando los métodos descritos aquí, u otros métodos conocidos en la técnica en los que las células T se expanden a niveles terapéuticos, se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero sin limitarse a, tratamiento con agentes tales como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, citarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizumab para pacientes con EM, o

tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis, u otros tratamientos para pacientes con PML. En ejemplos adicionales, las células T de la invención se pueden usar en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato, y FK506, anticuerpos, u otros agentes inmunoablativos tales como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas, e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina (ciclosporina y FK506), o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun 5:763-773, 1993). En un ejemplo adicional, las composiciones celulares de la presente invención se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T usando agentes quimioterapéuticos tales como fludarabina, terapia de radiación de haz externo (XRT), ciclofosfamida, o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otro ejemplo, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de terapia ablativa de células B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo Rituxan. Por ejemplo, en un ejemplo, los sujetos pueden someterse a tratamiento convencional con quimioterapia de alta dosis, seguido de trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertos ejemplos, tras el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la presente invención. En un ejemplo adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosis de los tratamientos anteriores que se administrarán a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se está tratando y el receptor del tratamiento. El escalado de las dosis para administración humana se puede realizar según las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis de CAMPATH, por ejemplo, estará generalmente en el intervalo de 1 a alrededor de 100 mg para un paciente adulto, normalmente administrados diariamente durante un periodo de entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos pueden usarse dosis mayores de hasta 40 mg por día.

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

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

F. Composiciones biofarmacéuticas

Se proporcionan aquí composiciones biofarmacéuticas o biológicas (en lo sucesivo, "composiciones") para uso en terapia génica, inmunoterapia, inmunoterapia adoptiva, y/o terapia celular, que incluyen uno o más de los DuoCAR descritos, o células T que expresan un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, DuoCAR, o células T que expresan un CAR que se unen específicamente a uno o más antígenos descritos aquí, en un vehículo (tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable). Las composiciones se pueden preparar en formas de dosificación unitaria para administración a un sujeto. La cantidad y el momento de la administración quedan a criterio del médico tratante para lograr el resultado deseado. Las composiciones pueden formularse para administración sistémica (tal como intravenosa) o local (tal como intratumoral). En un ejemplo, un DuoCAR descrito, o células T que expresan un CAR, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado, se formula para administración parenteral, tal como administración intravenosa. Las composiciones que incluyen un CAR, o célula T que expresa un CAR, un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe aquí son de uso, por ejemplo, para el tratamiento y detección de un tumor, por ejemplo, y no a modo de limitación, un neuroblastoma. En algunos ejemplos, las composiciones son útiles para el tratamiento o detección de un carcinoma. Las composiciones que incluyen un CAR, o célula T que expresa un CAR, un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe aquí también son útiles, por ejemplo, para la detección de angiogénesis patológica.

Las composiciones para administración pueden incluir una disolución del CAR, o célula T que expresa un CAR, conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno disueltos en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Se pueden usar diversos vehículos acuosos, por ejemplo disolución salina amortiguada. Estas disoluciones son estériles, y generalmente están libres de materias indeseables. Estas composiciones pueden

- esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes reguladores y amortiguadores del pH, agentes reguladores de la toxicidad, agentes adyuvantes, por ejemplo acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio. La concentración de un CAR, o célula T que expresa un CAR, anticuerpo o fragmento o conjugado de unión a antígeno en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal, según el modo particular de administración seleccionada y las necesidades del sujeto. Los métodos reales para preparar dichas formas de dosificación para uso en terapia génica, inmunoterapia y/o terapia celular son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en la técnica.
- Una composición típica para administración intravenosa incluye alrededor de 0,01 a alrededor de 30 mg/kg de anticuerpo o fragmento o conjugado de unión a antígeno por sujeto por día (o la dosis correspondiente de un CAR, o célula T que expresa un CAR, conjugado que incluye el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno). Los métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica, y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 19^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995).
- Un CAR, o célula T que expresa un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, o conjugados, se pueden proporcionar en forma liofilizada y rehidratar con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en disoluciones estériles de concentración conocida. Los DuoCAR, o células T que expresan un CAR, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado, se añaden entonces a una bolsa de infusión que contiene cloruro de sodio al 0,9 %, USP, y en algunos casos se administra en una dosis de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal. Se dispone de una experiencia considerable en la técnica en la administración de fármacos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos y de conjugados; por ejemplo, los medicamentos de anticuerpos se han comercializado en los EE. UU. desde la aprobación de RITUXAN® en 1997. Un CAR, o célula T que expresa un CAR, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, y conjugados de los mismos, se pueden administrar mediante infusión lenta, en lugar de una inyección intravenosa o un bolo. En un ejemplo, se administra una dosis de carga más alta, administrándose dosis de mantenimiento posteriores a un nivel más bajo. Por ejemplo, se puede infundir una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (o la dosis correspondiente de un conjugado que incluya el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) durante un período de unos 90 minutos, seguido de dosis de mantenimiento semanales durante 4-8 semanas de 2 mg/kg infundidas durante un período de 30 minutos si la dosis anterior fue bien tolerada.
- Las formulaciones parenterales de liberación controlada se pueden preparar como implantes, inyecciones oleosas, o como sistemas de partículas. Para una visión general de los sistemas de administración de proteínas, véase Banga, A.J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas, y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, tal como una citotoxina o un fármaco, como núcleo central. En las microesferas, la sustancia terapéutica se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas de menos de alrededor de 1 µm se denominan generalmente nanopartículas, nanoesferas, y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm, por lo que sólo se administran nanopartículas por vía intravenosa. Las micropartículas suelen tener alrededor de 100 µm de diámetro, y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véanse, por ejemplo, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, págs. 219-342 (1994); y Tice y Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, págs. 315-339, (1992).
- Se pueden usar polímeros para la liberación controlada por iones de las composiciones de los DuoCAR, o células T que expresan un CAR, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugados, descritas aquí. En la técnica se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para uso en la administración controlada de fármacos (Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-542, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloques, polaxámero 407, existe como un líquido viscoso pero móvil a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y la administración sostenida de interleucina-2 recombinante y ureasa (Johnston et al., Pharm. Res. 9:425-434, 1992; y Pec et al., J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58-65, 1990). Alternativamente, se ha usado hidroxiapatita como un microvehículo para la liberación controlada de proteínas (IJntema et al., Int. J. Pharm. 112:215-224, 1994). En aún otro aspecto, se usan liposomas para la liberación controlada así como el direccionamiento de fármacos del fármaco encapsulado con lípidos (Betageri et al., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de proteínas terapéuticas (véanse patente U.S. núm. 5.055.303; patente U.S. núm. 5.188.837; patente U.S. núm. 4.235.871; patente U.S. núm. 4.501.728; patente U.S. núm. 4.837.028; patente U.S. núm. 4.957.735; patente U.S. núm. 5.019.369; patente U.S. núm. 5.055.303; patente U.S. núm. 5.514.670; patente U.S. núm. 5.413.797; patente U.S. núm. 5.268.164; patente U.S. núm. 5.004.697; patente U.S. núm. 4.902.505; patente U.S. núm. 5.506.206; patente U.S. núm. 5.271.961; patente U.S. núm. 5.254.342 y patente U.S. núm. 5.534.496).

G. Kits

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

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

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

EJEMPLOS

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos de los DuoCAR representados dentro de las Figuras adjuntas, más abajo, y la descripción en las páginas 17 - 27, inclusive, más arriba, ejemplos los cuales no deben interpretarse de ninguna manera como una imposición de limitaciones al alcance de la misma.

Se proporcionan dos ejemplos mediante los cuales la expresión de tres dominios de unión funcionales en la superficie de una población de células T humanas transducidas con LV demuestra la viabilidad de la tecnología DuoSet (Ejemplo 1); y la actividad funcional de esta población contra tres抗igenos de leucemia diferentes demuestra su eficacia (Ejemplo 2).

Los ejemplos de los CAR de especificidad sencilla en los que se basa esta tecnología y que pueden incluirse como un componente de DuoSet en un DuoCAR incluyen el vector de direccionamiento contra CD20 sencillo LTG1495, la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4. Un segundo ejemplo es el CAR LTG2200 de especificidad sencilla, específico para CD22, la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10. Un aspecto molecular importante en la creación de los DuoCAR es la inclusión de secuencias compatibles no redundantes, y la evaluación de esas secuencias en células T transducidas de manera que no se produzca recombinación adversa o asociación intracelular. Esto puede ocurrir tanto en la línea celular productora del vector, como en la población de células diana. Por esta razón, incluimos estructuras de CAR variantes que se sabe que son compatibles en el entorno de DuoCAR. Estas incluyen el CAR LTG1494 específico de CD19 descrito en la secuencia nucleotídica SEQ ID: 29 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID: 30, respectivamente. Esta secuencia incluye el enlazador bien descrito que une las cadenas pesada y ligera del scFv, denominado enlazador Whitlow (secuencia de aminoácidos GSTSGSGKPGSGEGSTKG véase Whitlow M., et al., 1993, Protein Eng. 6:989-995). En algunos casos, el enlazador Whitlow se sustituyó por un enlazador (GGGGS)_n, por ejemplo en un formato CAR CD19, como en LTG1538, secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 31 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 32, respectivamente. En otro ejemplo, se crearon CAR que tienen dominios transmembrana alternativos. El CAR anti-CD19 LTG1562, secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 21 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22, respectivamente, utiliza el dominio transmembrana de CD4 (en contraposición a CD8). De manera similar, el CAR anti-CD19 LTG1563 tiene una transmembrana alternativa derivada de TNFRSF19, secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 49 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 50, respectivamente. Los DuoCAR también pueden dirigirse contra tumores sólidos, por ejemplo los que expresan el抗igeno tumoral de mesotelina. Por ejemplo, se han creado ligantes de scFv para mesotelina, como se describe en la solicitud de patente provisional del solicitante, en tramitación junto con la presente, núm. 62/444,201, titulada Composiciones y Métodos para Tratar Cáncer con Inmunoterapia Anti-Mesotelina, presentada el 9 de enero, 2017, y asignada a Lentigen Technology, Inc. número de caso LEN_017, secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 37 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 38, respectivamente, que se pueden incorporar en CAR funcionales, secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 39 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 40, respectivamente, y que de este modo se pueden incorporar en una terapia de DuoCAR. Además de las secuencias de scFv, los ligantes de抗igeno monocatenarios (en contraposición a scFv) se pueden incorporar en una aplicación

de DuoCAR. Por ejemplo, el ligante sólo de cadena pesada específico de CD33, como se describe en la solicitud de patente provisional del solicitante, en tramitación junto con la presente, núm. 62/476.438, titulada Composiciones y Métodos para Tratar Cáncer con Inmunoterapia Anti-CD33, presentada el 24 de marzo, 2017, y asignada a Lentigen Technology, Inc. número de caso LEN_018, secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 41 y secuencia de aminoácidos SEQ

5 ID NO: 42, respectivamente, se puede incorporar en un CAR funcional, LTG1906, secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 43 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44, respectivamente, que se dirige contra tumores malignos que expresan CD33. Un ejemplo de una aplicación terapéutica de DuoCAR sería el tratamiento de leucemia que expresa los antígenos CD19, CD20 y TSLPR. En este caso, LTG1496 o LTG 1497 (SEQ ID NOs: 35, 26, respectivamente) podrían combinarse con un CAR específico de TSLPR (LTG1789), SEQ ID NO: 47 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 48, respectivamente, que se había creado a partir de dominios de scFv específicos de TSLPR, secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 45 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 46.

10 Los ejemplos de los CAR en tandem (que contienen 2 dominios de scFv, como se describe en la secuencia nucleotídica SEQ ID: 23 y la secuencia de aminoácidos SEQ ID: 24) en la que se basa esta tecnología incluyen CD20_CD19 CAR LTG1497, secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 25 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26. En algunos casos, invertir el orden de los dos ligantes puede proporcionar una mejor expresión de DuoCAR en células diana. Por tanto, LTG1497, en el que el scFV CD19 es más proximal, como se muestra en la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 25 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26; LTG1496, en el que el scFV CD19 es más distal a la membrana, como se muestra en la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 33 y secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 34, pueden usarse ambos como uno de los miembros de un DuoSet que comprende un DuoCAR.

15 20 Métodos utilizados en los Ejemplos 1 y 2:

Líneas celulares (PBMC y dianas)

Todas las líneas celulares y reactivos se adquirieron de la American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), a menos que se indique lo contrario. La línea celular de linfoma de Burkitt Raji, las líneas celulares de leucemia linfocítica aguda REH, así como la línea celular de leucemia mielógena crónica K562, se cultivaron en medio RPMI-25 1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS, Hyclone, Logan, UT) y L-Glutamax 2 mM (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY). La línea celular de riñón embrionario humano 293T se propagó en medio de Eagle modificado con Dulbecco suplementado con FBS al 10 % inactivado por calor.

30 Se generaron clones unicelulares de líneas celulares que expresan luciferasa mediante la transducción estable de líneas tumorales de tipo salvaje con un vector lentiviral que codifica la luciferasa de luciérnaga (Lentigen Technology, Inc., Gaithersburg, MD), seguido de la clonación y selección de clones positivos para luciferasa. La línea Raji-luc adaptada a ratón se generó injertando en ratones NSG un clon Raji que expresa de manera estable luciferasa de luciérnaga (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, The Jackson Laboratory Sacramento, CA), aislando las células tumorales Raji-luc injertadas de bazos de ratón mediante selección positiva (microBeads CD19, humana, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) o negativa (kit de agotamiento de células de ratón, Miltenyi Biotec), 35 expandiéndolas en cultivo, y reclonándolas para facilitar la selección de clones con alta expresión de luciferasa de luciérnaga. Se recogió sangre entera de voluntarios sanos en el Oklahoma Blood Institute (OBI, Oklahoma City, OK) con el autorización firmada de los donantes. Las capas leucocitarias procesadas se adquirieron de OBI. Las células T humanas CD4 positivas y CD8 positivas se purificaron de las capas leucocitarias mediante selección positiva usando una mezcla 1:1 de MicroPerlas CD4- y CD8- (Miltenyi Biotec) según el protocolo del fabricante.

40 45 Creación de receptor de antígeno químérico (CAR) - vectores de expresión que comprenden DuoSets

Las secuencias de dominios de unión a antígeno de CAR, scFv, derivaron del hibridoma de ratón FMC-63 para CD19 (FMC-63: AA 1-267, GenBank ID: HM852952.1) y Leu-16 para CD20 [1], secuencia completa de VL y VH. La unión de scFv de CD22 se creó a partir de secuencias disponibles públicamente. Se generaron CAR19_20 o CAR20_19 en tandem uniendo scFv de cada anticuerpo en marco a dominios bisagra de CD8 y transmembrana (AA 123-191, secuencia de Ref ID NP_001759.3), dominio de transactivación 4-1BB (CD137, AA 214-255, secuencia de UniProt ID Q07011) y dominio de señalización de CD3 zeta (CD247, AA 52-163, Ref secuencia ID: NP_000725.1.). Las regiones scFv de 19A y 20A se unieron en secuencia mediante un enlazador intercatenario flexible (GGGGGS)s, seguido de dominios de CD8, 4-1BB y CD3 zeta. La secuencia líder de la subunidad alfa del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano se incluyó en todos los constructos, como se describe en [2]. Las secuencias de los constructos de CAR se optimizaron con codones (DNA2.0, Newark, CA) y se clonaron en una cadena principal de plásmido lentiviral de tercera generación (Lentigen Technology Inc., Gaithersburg, MD) bajo la regulación de un promotor de EF-1 α humano. Se generaron sobrenadantes que contenían vector lentiviral (LV) mediante transfección transitoria de células HEK 293T, como se describió anteriormente [3]. Los sobrenadantes lentivirales peltizados cosechados se almacenaron a -80°C.

50 55 Transducción de células T primarias:

Las células T primarias humanas CD4+ y CD8+ seleccionadas procedentes de donantes normales se cultivaron en medio TexMACS (sin suero) suplementado con 40 UI/ml de IL-2 a una densidad de 0,3 a 2 x 10⁶ células/ml, se activaron con reactivo CD3/CD28 MACS® GMP T Cell TransAct (Miltenyi Biotec), y se transdijeron el día 3 con

vectores lentivirales que codifican constructos de CAR, en presencia de 10 ug/ml de sulfato de protamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante la noche, y el medio se intercambió el día 4. En el día 5, los cultivos se transfirieron a medio TexMACS suplementado con 200 UI/ml de IL-2, y se propagaron hasta la recolección en el día 10-13.

Ensayos efectores inmunitarios:

- 5 Para determinar la citotoxicidad mediada por células (ensayo de CTL), se combinaron 5.000 células diana transducidas de manera estable con luciferasa de luciérnaga con células CAR T en diversas relaciones efector-diana, y se incubaron durante la noche. Se añadió reactivo SteadyGlo (Promega, Madison WI) a cada pocillo, y se analizó la luminiscencia resultante en un lector de placas EnVision (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut), y se registró como recuentos por segundo (CPS de la muestra). Se usaron pocillos con diana solamente (CPS máx.) y pocillos con diana solamente más Tween-20 al 1% (CPS mín.), para determinar el intervalo del ensayo. El porcentaje de lisis específica se calculó como: (1-(CPS de la muestra-CPS mín.)/(CPS máx.-CPS mín.)).
- 10

Análisis citométrico de flujo:

- 15 Todos los reactivos de tinción celular para citometría de flujo eran de Miltenyi Biotec, a menos que se indique lo contrario. Se recogieron del cultivo un millón de células transducidas con CAR T, se lavaron dos veces en amortiguador de tinción frío (disolución de AutoMACS con seroalbúmina bovina al 0,5 %), y se peletizaron a 350 xg durante 5 minutos a 4°C. La expresión superficial de CAR en células T transducidas se detectó inicialmente mediante tinción con conjugado de proteína L-biotina (lote 1 mg/ml, dilución 1:1000, GenScript, Piscataway, NJ) durante 30 minutos a 4°C, seguido de dos lavados y tinción con conjugado de estreptavidina-PE durante 30 minutos a 4°C (lote: 1,0 ml, dilución 1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Como controles negativos, se usaron células no transducidas y células transducidas teñidas con estreptavidina-PE solamente. Se empleó anticuerpo anti-CD4 para determinar la relación de CD4 a CD8 de la población positiva para CAR T, y se añadió durante la segunda etapa de incubación. Las células muertas se excluyeron mediante tinción con 7AAD (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se lavaron dos veces, y se resuspendieron en 200 ul de amortiguador de tinción antes del análisis cuantitativo mediante citometría de flujo. La tinción específica con CAR T DuoSet se llevó a cabo en células T humanas activadas con nanomatriz CD3-CD28 (TransAct, Miltenyi Biotec) transducidas con vectores de DuoSet en presencia de IL-2, y se analizó para determinar la expresión de dominios de scFv anti-CD19, CD20 o CD22 mediante citometría de flujo usando CD19, CD20 o CD22 recombinantes para la tinción, como para los anticuerpos.
- 20
- 25

- 30 La actividad de scFv anti-CD19 se detectó con CD19-Fc (R&D Biosystems), usado a 1 ug/muestra, y se tiñó con anti-Fc-gamma humano de cabra conjugado con R-PE (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), a 0,75 ug/muestra. La actividad de scFv anti-CD20 se detectó con CD20-biotina (Miltenyi Biotech), 0,1 ug/muestra, detectada con estreptavidinapAPC (Miltenyi Biotec) a 0,2 ug/muestra. La actividad de scFc anti-CD22 se detectó con CD22-His (Thermo Fisher) a 0,1 ug/muestra, y se detectó con anti-His FITC (Miltenyi Biotec). El análisis de citometría de flujo se realizó en un MACSQuant®10 Analyzer (Miltenyi Biotec). La caracterización de líneas tumorales diana y subclones positivos para luciferasa se realizó usando anticuerpos CD19-FITC, CD20 VioBlue, y CD22-APC. Las células muertas se excluyeron del análisis mediante tinción con 7AAD (BD Biosciences, San Jose, CA).
- 35

EJEMPLO 1

Expresión de un DuoCAR (DuoSet 2+1) en células T humanas primarias

- Como prueba de principio, se creó un DuoSet compuesto por dos vectores de CAR-T. Un miembro del conjunto expresó un dominio de unión a CD20_CD19 en tandem unido a dominios transmembrana de CD8 y de señalización de CD28 y CD3-zeta (LTG2228), SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 52. El segundo miembro del DuoSet fue un constructo de CAR con un único ligante de CD22 unido a dominios transmembrana de CD8 y de señalización de 4-1BB y CD3-zeta (LTG2200), SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. En la Figura 7, las columnas emparejadas muestran tinción dual para los scFv de CD20 y CD19, columna izquierda, y los scFv de CD22 y CD19, columna derecha. La fila 1 muestra células T que no se transdijeron (UTD), y por lo tanto no muestran unión. La fila 2 muestra células T transducidas con LV que codifica un vector CAR CD20_CD19 con dominios transmembrana de CD8 y de señalización intracelular de CD28 y CD3-zeta (20-19-28z). Aunque se observa tinción dual para la unión de CD20 y CD19 (panel izquierdo), sólo se observa la unión de CD19 en el panel derecho. La fila 3 muestra células T transducidas con un vector CAR CD22 con dominios transmembrana CD8 y de señalización intracelular de 4-1BB y CD3-zeta (22-BBz). No se observa tinción dual con CD19 o CD20 (panel izquierdo), y sólo se observa una única población de células capaces de unirse a CD22 (panel derecho). En la Fila 4, las células T se transducen con un DuoSet que comprende ambos vectores en la fila 2 y la fila 3. Sólo el DuoSet expresa los tres dominios de unión codificados por CAR (el 42 % de las células expresan CD20_19 (panel izquierdo), y el 38 % expresa los dominios de unión a CD22 y CD19 (panel derecho). Como scFv de CD22 y CD19 están en cada una de las dos proteínas transmembrana separadas que comprenden el DuoSet, el 38 % representa la población verdadera que expresa DuoSet en este ejemplo.
- 55

EJEMPLO 2

Actividad antileucémica de una preparación de células T humanas que expresa un DuoCAR

Actividad antileucémica de una preparación de células T humanas que expresa un DuoCAR que se dirige contra tres antígenos de leucemia simultáneamente (véase la Figura 7 para las características de expresión del DuoCAR). Se usó un DuoSet compuesto por un CAR en tandem CD20_19 y un CAR sencillo específico de CD22 (preparado como en el Ejemplo 1) como población de células T efectoras en un ensayo de células T citotóxicas usando como dianas líneas celulares de leucemia y líneas celulares modelo. Las células T humanas transducidas con componentes de CAR sencillo (20_19-28z o 22-BBz) o DuoSets (20_19-28z + 22-BBz) se usaron en el ensayo de células T citotóxicas a cuatro relaciones diferentes de efecto a diana (20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1, como se indica) (véase la Figura 8). Las líneas celulares de leucemia usadas como dianas de CAR-T fueron: Raji (expresa los tres antígenos diana), REH (expresa los tres antígenos diana), K562 (control, sin dianas expresadas), K562-CD19 (expresa CD19), K562-CD20 (expresa CD20), y K562-CD22 (expresa CD22). Sólo las células transducidas con DuoCAR (20-19-28z + 22-BBz) presentaron alta actividad citolítica contra ambas líneas celulares de leucemia (Raji y REH), y las tres líneas celulares diana K562 de expresión sencilla (K562-CD19, K562-CD20, K562-CD22). Esto demuestra que la tecnología de DuoCAR puede dirigirse exclusivamente contra tres antígenos de leucemia simultáneamente, en la misma población de células T efectoras, y por lo tanto demuestra una actividad antineoplásica superior al poder dirigirse contra más de uno o dos antígenos diana a la vez, disminuyendo así la posibilidad de que la neoplasia maligna genere mutantes de escape (clones celulares que han perdido o submodulado uno o dos antígenos y esta ablación inmunitaria escapada. El resultado final serán mayores tasas de curación para los pacientes, debido al escape y crecimiento de variantes de pérdida de antígeno, que al final es una recaída.

EJEMPLO 3

20 Métodos de producción de DuoCAR

La tecnología DuoCAR descrita en esta solicitud genera una población de linfocitos terapéuticos, en este ejemplo células T humanas, que expresan más de dos especificidades antigenicas a partir de más de una proteína transmembrana codificada por un vector génico. En este ejemplo, esto se consigue por dos medios diferentes. La Figura 9 contiene tres filas de datos, marcadas como "no transducidas", "cotransducción" y "cotransfección". La Figura 9 contiene dos columnas de datos, generadas como en la Figura 7, en la que la primera columna se analiza por citometría de flujo para la expresión de la unión específica a CD20 y CD19, y la segunda columna se analiza por citometría de flujo para la expresión de la actividad de unión a CD22 y CD19. En la primera fila de datos, se muestran células T humanas no transducidas. No se muestra actividad de unión para los indicadores de proteína recombinante CD19, CD20 o CD22 de actividad de unión derivada de CAR, lo que demuestra que no hay expresión de DuoCAR. En la segunda fila, se usó "cotransducción" para generar los DuoCAR. En este conjunto de datos, se usaron dos LV para transducir simultáneamente células T activadas. Como en la figura 7, un CAR en el DuoSet que comprende el DuoCAR fue un ligante en tandem de CD20 y CD19 unido a motivos de señalización de CD28 y de señalización de CD3-zeta; y el otro CAR fue un ligante de CD22, unido a motivos de señalización de 4-1BB y CD3-zeta. El segundo cuadrante (Q2) en la columna uno muestra un patrón muy específico de tinción unitaria para la actividad de scFv anti-CD20 y CD19. Esto se debe a que ambos ligantes están en la misma glicoproteína de superficie, y por lo tanto se coexpresan con igual intensidad, generando el patrón lineal muy específico observado. En la segunda columna de los datos de cotransducción, se observa un patrón más tradicional cuando las dos glicoproteínas no se expresan en un patrón uniforme en cada célula. Así, se observa un patrón de 4 poblaciones distintas. En el cuadrante inferior izquierdo, se observan células que no expresan ningún ligante. En la parte superior izquierda, se observan células que expresan solamente el CAR CD22. En el cuadrante inferior derecho, se observan células que expresan solamente el CAR en tandem CD20_CD19. Finalmente, en el cuadrante superior derecho, se observan células que expresan ambos miembros del CAR DuoSet, que comprende el DuoCAR.

En la fila inferior, las poblaciones celulares que expresan el DuoCAR se generan de una manera diferente. A diferencia del método de cotransducción, en el que 2 preparaciones de LV creadas independientemente se usan en el momento de la transducción de células T, la "cotransfección" se refiere a un método en el que dos plásmidos de la cadena principal (que codifican los dos CAR que comprenden el DuoCAR) se transfecan en las células 293T generando LV al mismo tiempo. Los otros plásmidos que comprenden este sistema LV de tercera generación son idénticos en ambos métodos. La ventaja del método de cotransfección es que se crea una única preparación de LV, que contiene vectores que codifican ambos CAR. Como puede verse a partir de los datos, se observan patrones casi idénticos de expresión de CAR CD20-CD19 y CAR CD22, en comparación con el método de cotransducción en la segunda fila. El patrón de tinción para ambas glicoproteínas inducido por LV generado por cotransfección (CD22 para el CD22-CAR y cotinción con CD19 para el CD20_19 CAR), en el cuadrante superior derecho de los datos en la segunda columna, demuestra que ambos métodos generan eficientemente DuoCAR.

Bibliografía referenciada:

- 55 1) Wu, A.M., et al., Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain exchange. Protein engineering, 2001. 14(12): p. 1025-1033.
- 2) Haso, W., et al., Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood, 2013. 121(7): p. 1165-1174.

3) Kuroda, H., et al., Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection. Journal of virological methods, 2009. 157(2): p. 113-121.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

5 Esta solicitud contiene un Listado de secuencias que se presentará electrónicamente a la United States Patent and Trademark Receiving Office (Oficina Receptora de Patentes y Marcas de Estados Unidos) mediante un archivo PDF titulado "Listado de Secuencias".

SECUENCIAS DE LA DESCRIPCIÓN

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

SEQ ID NO: 1 es la secuencia nucleotídica del dominio de unión de scFv reactivo con CD22 (LTG1495):

GAGGTGCAGTGCAACAGTCAGGAGCTGAAGTGGCAAGCCAGGAGGCCAGCG
TGAAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTCACCTCACAAACATGCAC
TGGGTGAAACAGACCCGGACAAGGGCTGAATGGATTGGCGCCATCTACC
CCGGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGTCAAGGGAAAGGCCACCC
GACCGCCGACAAGAGCTCCTCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTCCCTGACCT
CCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCCAACTAATATGGAAGCTCG
TACTGGTTCTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCACTGTGACCGTCAGCTCCGG
GGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCGGAAGCGGGGGTGGAGGATCCGACATTGTG
CTGACTCAGTCCCCGGCAATCCTGTCGGCCTCACCGGGCGAAAAGGTACGAT
GACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAACTACATGGATTGGTACCAAAAGAAGC
CTGGATCGTCACCCAAAGCCTGGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCTCCGGC
GTGCCAGCGCGGTTAGCGGGTCCGGCTGGGCACCTCATACTCGCTGACCAT
CTCCCGCGTGGAGGCTGAGGACGCCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCT
TCAACCCGGCACTTTGGAGGCGGTACTAAGCTGGAGATCAA

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión de scFv reactivo con CD20 (LTG1495):

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPG
NGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSESDADYYCARSNNYGSSYWF
FDVVGAGITTVTSSGGGGSGGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVMTCRAS
SSVNYMDWYQKKPGSSPKWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAED
AATYYCQQWSFNPPTFQGGTKLEIK

SEQ ID NO: 3 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1495 (LP-1495-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTCCTCTCGTACCTCCCTGCTTCTGCAGACTGCCCATCCTGCCTTCC
TGCTGATTCCGAGGTGCAAGTCAGGAGCTGAACGGTCAAGCCA
GGAGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCTCCGGTTACACCTCACCTCCTA
CAACATGCACTGGGTAAACAGACCCCCGGACAAGGGCTCGAATGGATTGGC
GCCATCTACCCCAGGAATGGCGATACTCGTACAACCAGAAGTTAACGGAA
AGGCCACCCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACCGCGTATATGCAGTTGAGC
TCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCAAACACTA
TGGAAAGCTCGTACTGGTCTTCGATGTCGGGGGCCGCACCACTGTGACCG
TCAGCTCCGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCGGAAGCGGGGGTGGAGGATC
CGACATTGTGCTGACTCAGTCCCCGGCAATCCTGCGGCTCACCGGGCGAAA
AGGTACAGATGACTTGTAGACGTCGTCAGCGTAACATGGATTGGTAC
CAAAGAAAGCCTGGATCGTACCCAGCCTGGATCTACGCTACATCTAACCT
GGCCTCCGGCGTGCCAGCGCGGTTACGGGGTCCGGCTGGCACCTCATACT
CGCTGACCATCTCCCGGTGGAGGCTGAGGACGCCGACCTACTACTGCCAG
CAGTGGCTCTCAACCCGCCACTTGGAGGCGGTACTAACGCTGGAGATCAA
AGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCCCCAACCA
TCGCAAGCCAACCCCTCTCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCTGGCGGGCGGGT
GGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCGTGCATATCTACATTGGC
CCCGCTGGCCGGCACTTGCAGCGTGTCTGCTGCGTGGTCATCACCTTTA
CTGCAAGAGGGGCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTTCATGC
GGCCCCTGCAAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTCAAGATTCCCTGA
GGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTCTCACGGTCCGCCGAC
GCCCGCATAATCAACAGGGCAGAACATGCTCTACACGAGCTAACCTGG
GAAGGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCCGACGCCG
AGATGGGGGGAAACACGGCGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACG
AACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGG
AGAGCGGAGGGAGGGAAAGGGTACGACGGCTGTACCAAGGACTGAGCAC
GCCCACTAAGGATACCTACGATGCCTGCATATGCAAGCACTCCCACCCGG

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1495 (LP-1495-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLLLCELPHAFLLIPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYN
MHWVKQTPQQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKKGATLTADKSSSTAYMQLSSLT
SESDADYYCARSNYYGSYYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGGGGGGGSDIVL
TQSPAILSASPGEKVMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWYATSNLASGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKAATTIPAP
RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSL
VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDQCSRFPEEEAGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQQNQQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPREMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 5 es la secuencia nucleotídica de la secuencia del péptido líder/señal:

ATGCTGCTGCTGGTACCAGCCTGCTGCTGTGCGAAGTGCCTGCATCCGGCGTT
TCTGCTGATTCCG

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia del péptido líder/señal:

MLLVTSLLLCELPHAFLLIP

SEQ ID NO: 7 es la secuencia nucleotídica del dominio de unión de scFv reactivo con CD22 (LTG2200):

CAGGTACAGCTCCAGCAGAGTGGCCCAGGGCTCGTGAAGCCAAGCCAGACGC
TGTCCCTGACTTGTGCAATTCAAGGGATTCAAGTTCATCAAATAGCGCGCGT
GGAATTGGATTGACAATCTCCTTCCCAGGGTTGGAATGGCTTGGACGAACA
TATTACAGATCCAATGGTATAACGACTATCGGTATCAGTAAAGTCAGAAT
AACCATTAACCCCGACACAAGCAAGAACCAATTCTCTTGACAGCTTAACCTG
TCACGCCAGAAGACACGGCAGTCTATTATTGCGCTCGCAGGTAACGGGTGAC
CTGGAAAGACGCTTTGACATTGGGGCAGGGTACGATGGTACAGTCAGITC
AGGGGGCGGTGGGAGTGGGGAGGGGTAGCGGGGGGGAGGGTCAGACAT
TCAGATGACCCAGTCCCCATCCTTGTCTGCCTCCGTCGGTGACAGGGTGAC
AATAACATGCAGAGCAAGCAAACAATCTGGAGCTATCTCAACTGGTACCA
CAGCGACCAGGAAAAGGCCAACCTGCTGATTACGCTGCTTCTCCCTCCA
ATCAGGCGTGCCTAGTAGATTAGCGGTAGGGCTCCGGCACCGATTACGC
TCACTATAAGCTCTTCAAGCAGAAGATTGCACTTATTACTGCCAGCAGT
CCTATAGTATACCTCAGACTTCGGACAGGGTACCAAGTTGGAGATTAGGCG
GCCGCA

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión de scFv reactivo con CD22 (LTG2200):

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYY
RSKWYNDYAVSVKSRITNPDTSKNQFSQLQNSVTPEDTA VYYCAREVTGDLEDA
FDIWGQGTMTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTTICRAS
QTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSQTDFTLTSSLQAED
FATYYCQQSYSIPTFGQGTKEIKAAA

SEQ ID NO: 9 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG2200 (LP-2200-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTTTGGTGA CTTCCCTTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCCTTCC
TGCTTATTCCCCAGGTACAGCTCCAGCAGAGTGGCCAGGGCTCGTGAAGCCA
AGCCAGACGCTGCTTGACTTGTCAATTCAAGGGATTCAAGTTCATCAA
TAGCGCGCGTGGATTGGATTGACAAATCTCCTCCGAGGGTTGGAATGGC
TTGGACGACATATTACAGATCCAATGGTATAACGACTATCGGTATCAGTA
AAGTCAGAATAACCATTAAACCCGACACAAGCAAGAACCAATTCTTTGCA
GCTTAACTCTGTACGCCAGAAGACACGGCAGTCTATTATTGCGCTCGCGAGG
TAACGGGTGACCTGGAAGACGCTTTGACATTGGGGCAGGGTACGATGGTG
ACAGTCAGTTCAAGGGCGGTGGAGTGGGGAGGGTAGCGGGGGGG
GGGTAGACATTAGATGACCCAGTCCCCATCCTTGTCTGCCTCCGTCGGT
GACAGGGTGACAATAACATGCAGAGCAAGCCAACAATCTGGAGCTATCTCA
ACTGGTACCAAGCAGCGACCAGGAAAGCGCAAACCTGCTGATTACGCTGCT
TCCTCCCTCAATCAGCGTGCCTAGTAGATTAGCGTAGGGCTCCGGCAC
CGATTTACGCTCACTATAAGCTCTTCAAGCAGAAGATTGCGACTTATT
CTGCCAGCAGTCCTATAGTATACCTCAGACTTCCGACAGGGTACCAAGTTGG
AGATTAAGGCGGCCGAACTACCAACCCCTGCCCTCGGCCCGACTCCGGCC
CCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCGAAGCTTGCCTGG
CGCGGGTGGAGCGTGCATACCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACA
TTTGGGCCCCGCTGCCGGCACTTGCAGCGTGCCTGCTGCGTGGTCA
CCCTTACTGCAAGAGGGCCGGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCG
TTCATGCGCCCGTGCAGACCAACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATT
CCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGCTGCGTCAAGTCTCACGGTCC
GCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCAGAACATCAGCTTACAACGAGCTGA
ACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCCAGCG
ACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCCTAGGAAGGACTGTA
CAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATG
AAGGGAGAGCGGAGGAGGGAAAGGGTACGACGGGCTGTACCAAGGGACTG
AGCACGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTGCATATGCAAGCACTCCCACC
CCGG

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG2200 (LP-2200-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLLCELPHAPFLIPQVQLQQSGPGLVKPSQLSLTCAISGDSVSSNSAA
WNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVT
PEDTAVYYCAREVTGDLLEDADIWGQCTMVTVSSGGCGCGGCGGGSDIQM
TQSPSSLASAVGDRVITCRASQTIWSYLWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPS
RFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKEIKAAATTTPAPR
PPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLV
ITYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCEL.RVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPREMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR

SEQ ID NO: 11 es la secuencia nucleotídica del dominio de bisagra de CD8 de ADN:

ATCTACATCTGGGCCCTGGCCGGACTTGTGGGGCCTCTCTGTCACTG
GTTATCACCTTACTGC

SEQ ID NO. 12 es la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana de CD8:

IWAPLAGTCGVLLSLVITLYC

SEQ ID NO: 13 es la secuencia nucleotídica del dominio de bisagra de CD8 de ADN:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCCACCATCGCGTCGC
AGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGCGTGCCGCCAGCGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTAC

SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos del dominio bisagra de CD8:

TTTPAPRPPAPTIAQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIY

SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de números de aminoácidos 137 a 206 de la región bisagra y transmembrana de CD8.alfa. (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3):

TTTPAPRPPAPTIAQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG
VLLLSLVITLYC

SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia CL de IgG humana:

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
TTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO 17 es la secuencia nucleotídica del dominio de señalización de ADN de 4-1BB:

AAACGGGGCAGAAAGAAACT CCTGTATATATTCAAACAAACCATTATGAGACC
AGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAG
AAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGT

SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos del dominio de señalización de 4-1BB:

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 19 es la secuencia nucleotídica del dominio de señalización de ADN de CD3-zeta:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGA
ACCAGCTCTATAACGAGCTAACCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTG
GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAG
AACCCCTCAGGAAGGCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGG
CCTACAGTGAATGGATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGA
TGGCCTTACCAAGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTC
ACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de CD3zeta:

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPREMGGKPRRK
PQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

SEQ ID NO: 21 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1562 (LP-ligante Cd19-enlazador CD8-CD4tm-41BB-CD3zeta):

ATGCTGCTGGTACCAAGCCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTT
 TCTGCTGATTCCGGATATTCAAGATGACCCAGACCACCAAGCAGCCTGAGCGCGA
 GCCTGGCGATCGCGTGAACATTAGCTGCCGCGAGCCAGGATATTAGCAA
 TATCTGAACGGTATCAGCAGAACCGGATGGCACCGTAAAAGTGTGATT
 TCATACCAAGCCCTGCATAGCGCGTCCGAGCCGTTAGCGGCAGCGGCA
 GCGGCACCGATTAGCCTGACCAATTAGCAACCTGGAACAGGAAGATATTGCG
 ACCTATTTGCCAGCAGGGCACACCCCTGCCGTATACCTTGGCGCGGCAC
 CAAACTGGAAATTACCGGGCGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCGGC
 GCGGCAGCGAAGTAAAAGTCAGGAAAGCGGCCCGGGCTGGTGGCGCCGA
 GCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGACCGTGAGCGCGTGAGCCTGCCGGATTAT
 GCGTGAGCTGGATTGCCAGCCCGCGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGCG
 TGATTGGGCAGCGAAACACCTATTATAACAGCGCTGAAAAGCCGCCTG
 ACCATTATAAAGATAACAGCAAAGCCAGGTGTTCTGAAAATGAACAGCCT
 GCAGACCGATGATACCAGCATTATTATTGCGCAAACATTATTATGGCG
 GCAGCTATGCGATGGATTATTGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAG
 CGCGCGGGCGCCGGCGCCCGACCCGGAGCGTGCCGCGCGGCG
 TGCATACCCGCGGCCCTGGATTGTCAGCCGATGGCGCTGATTGCTGGC
 GCGTGCGGGCTGCTGTTATTGGCCTGGCATTTTTTGCGTGC
 TGCCGCCCGCGCCGAAAAACTGCTGTATATTAAACAGCCGTTATGCG
 CCCGGTGCAGACCACCCAGGAAGAAGATGGCTGAGCTGCCGTTCCGGAA
 GAAGAAGAAGGCGGCTGCGAAGTGCCTGAAATTAGCCGCAGCGCGGATG
 CGCCGGCGTACAGCAGGGCAGAACCGAGCTGTATAACGAACCTGGG
 CGCCCGCGAAGAATATGATGTGCTGGATAAACGCCGCGCGATCCGGAA
 ATGGGCGGCAAACCGCGCCGAAAAACCCGAGGAAGGCCTGTATAACGAAC
 TGCAGAAAGATAAAATGGCGAAGCGTATAGCGAAATTGGCATGAAAGGC
 ACGCCGCCCGGCAAAGGCCATGATGCCGTATCAGGCCGAGCACCGCG
 ACCAAAGATACCTATGATGCG CTGCATATGCAGCGCTGCCGCCGCG

SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1562 (LP-ligante Cd19-enlazador CD8-CD4tm-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLLCELPHAFALLIPDIQMKTQTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
 YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQQ
 NTLPYTFGGTKLEITGGGSGGGSGCGGSEVKLQESEGPLVAPSQSLSVICTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTHKDNNSKSQVFLK
 MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAPAPRPPTPAPTI
 ASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFVQPMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC
 RPRRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEAGGCELRVKFSRSADAPAYQ
 QGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 23 es la secuencia nucleotídica del dominio de unión de scFv reactivo con CD20_19 (LTG1497 ligante específico dual):

GAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACCTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCG
 TGAAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTCACCTCACACATGCAC
 TGGGTGAAACAGACCCGGACAAGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACC
 CCGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGTCAGGGAAAGGCCACCC
 GACCGCCACAAGAGCTCCTCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTCCGTGACCT
 CCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGCCAAGTACTATGGAAGCTCG
 TACTGGTTCTCGATGTCGGGGGGCCGGCACCAGTGTGACCGTCAGCTCCGG
 GGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCAGGAAGCGGGGGTGGAGGATCCGACATTGTG
 CTGACTCAGTCCCCGGCAATCCTGTGCGCCTCACCGGGCAAAGGTACAG
 GACTTGTAGAGCGTCGTCAGCGTGAACATACATGGATTGGTACCAAAAGAAGC
 CTGGATCGTACCCAAAGCCTGGATCTACGCTACATCTAACCTGCCCTCCGGC

GTGCCAGCGCGGTTACGGGGTCCGGCTGGCACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCAGCGTGGAGGCTGAGGACGCCGCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCAACCCGCCGACTTTGGAGGCGGTACTAAGCTGGAGATCAAAGGAGGC GGCGCAGCGGGGGGGAGGGTCCGGAGGGGGTGGTCTGGTGAGGAGGATCGGGAGGCGGTGGCAGCGACATTAGATGACTCAGACCACCTCCCTCCCTGCGCTCCCTGGCGACCCGCTGACCATCTCATGCCCGGCCAGCCAGGACATCTGAAGTACCTCAACTGGTACCCAGCAGAAGCCGACCGTAAGCTCCTGATCTACACACTCCCGCTGCACAGCGGAGTGCCGTCTAGATTCTCGGGTTCCGGG GTCGGGAACTGACTACTCCCTACTATTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTCTGCCAACAGGAAACACCCCTGCCGTACACTTTGGGGGGGAAACCAAGCTGGAAATCACTGGCAGCACATCCGGTCCGGAAAGCCCCGCTCCGGAGGGCAGCACCAAGGGGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCTGGCCTGGTGGCCCCGAGCCAGTCACTGTCCGTGACTTGTACTGTGTCGGAGTGTGCTGCCCGTGGGATTACGGAGTGTCCGTGGATCAGGCAGCCACCTCGGAAAGGATTGGAA TGGCTCGGAGTCATCTGGGGTCCGAACACCTATTACAACCTCGGACTGAAATCCAGGCTCACCAATTATCAAGGATAACTCCAAGTCACAAGTGTCCCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACTGACGACACGGCGATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACACGGCGGATCCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGGACCAGCGTGACCGTGTCACTCCCGGGCGCA

SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión de scFv reactivo con CD20_19 (LTG1497 ligante específico dual):

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNNYGSSYWF FDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAED AATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQTTSSLSASLGDRVITSCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQQNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPG SGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWQGTTSVTVSSAAA

SEQ ID NO: 25 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1497 (LP-LTG1497-CD8 TM-41BB-CD3zeta) o (LP-CD20 VH-(GGGGS)₃-CD20 VL-(GGGGS)₅-CD19VL-enlazador Whitlow-CD19 Vh-bisagra CD8+TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTCTTCGTGACCTCCCTGCTTCTCGAACCTGCCCATCCTGCCTTCC TGCTGATTCCCGAGGTGCAAGTCAACAGTCAGGAGCTGAACCTGGTCAGGCCA GGAGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCCTCCGGTTACACCTCACCTCCTAACACATGCACTGGGTGAAACAGACCCCCGGACAAGGGCTGAATGGATTGGCGCATCTACCCCGGAATGGCGATACTCGTACAACCAGAACAGTTCAAGGGAA AGGCCACCCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCCTCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCAACTACTA TGGAGCTCGTACTGGTTCTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCACTGTGACCGTCAGCTCGGGGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCGGAAGCGGGGGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCCGGCAATCCTGCGCCTCACCGGGCGAAAAGGTCACGATGACTGTAGAGCGTCGTCAGCGTGAACATACATGGATTGGTAC CAAAAGAACCTGGATCGTACCCAAAGCCTGGATCTACGCTACATCTAACCT

GGCCTCCGGCGTGCCAGCGCGGTTCAGCGGGTCCGGCTGGGCACCTCATACT CGCTGACCATCTCCCGCGTGGAGGCTGAGGACGCCGCACCTACTACTGCCAG CAGTGGTCCTCAACCCGCCACTTTGGAGGCCGTACTAAGCTGGAGATCAA AGGAGGCCGGCGCACGCCGGGGAGGGTCCGGAGGGGGTGGTCTGGTGGAGGAGGATCAGGGAGGCCGTGGCAGCGACATTCACTAGATGACTCAGACCACCTCCT CCCTGTCCGCCCTCCCTGGCGACCGCGTGAACCATCTCATGCCGCCAGCCAG GACATCTCGAAGTACCTCACTGGTACCCAGCAGAAAGCCCACGGAACCGTGA AGCTCCTGATCTACCAACACCTCCCGCTGCACAGCGGAGTGCCTAGATTCTCGGGTTCGGGGTCCGGAACTGACTACTCCCTACTATTTCAACCTGGAGCA GGAGGATAATTGCCACCTACTCTGCCAACAGGAAACACCCCTGCCGTACACTTTTGGCGGGGGAAACCAAGCTGGAAATCACTGGCAGCACATCCGGTCCGGAA GCCCGGCTCCGGAGAGGGCAGCACCAAGGGGGAACTGAAGCTGCAGGAATCA GGACCTGGCCTGGTGGCCCCGAGCCAGTCAGTGCCTGACTTGTACTGTGTC CGGAGTGTGCTCCCGGATTACGGAGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCTCGGA AAGGATTGGAATGGCTCGGAGTCATCTGGGGTCCGAAACCAACCTATTACAAC TCGGCACTGAAATCCAGGCTACCATTATCAAGGATAACTCCAAGTCACAAGT GTTCCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACTGACGACACGGCGATCTACTATTGCG CCAAGCACTACTACTACGGGGGATCCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGG ACCAGCGTGACCGTGTCACTCCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCC GCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCAGGGGAAG CTTGCCGCCGGCCGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCC TGCATATCTACATTGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCAGGCGTGCCTGCTG TCGCTGGTCATCACCCCTTAUTGCAAGAGGGGCCGAAAGAAGCTGCTTACAT CTTCAAGCAGCGTTCATGCAGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGA TGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCAAGCTC TACAACGAGCTGAACCTGGGAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGC GACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCAACGGCGAAAAACCTC AGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTC AGAAATCGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAAAGGGTCAKGACCGGCT GTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATAACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCG

SEQ ID NO: 26 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1497 (LP-LTG1497-CD8 TM-41BB-CD3zeta) o (LP-CD20 VH (GGGGS)₃-CD20 VL-(GGGGS)₅-CD19 VL-enlazador Whitlow-CD19 VH-bisagra CD8+TM-41BB-CD3zeta):

MILLVTSLLLCELPHAFLLIPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNNQFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTSSGGGGGGGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSCTSLSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTHKDNSKSQVFLKMNSQLTDDTAIYYCAHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFRMRPVQTQEEFDGCSRPEEEEFGCERVKFSRSADAPAY

QQGQNQLYNELNLGRREYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR

SEQ ID NO: 27 es la secuencia nucleotídica de scFV para CD19:

GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAG
AGTCACCACATCAGTTGCAAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAATATTAAATTGGT
ATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTAAACTCCTGATCTACCATACTCAAGA
TTACACTCAGGAGTCCCCTCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTCTGGAACAGATTA
TTCTCTCACCAATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTGCCA
ACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATC
ACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCC
GTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCACTATGGTGTAAAGCTGGAT
TCGCCAGCCTCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGAGTAATATGGGTAGT
GAAACCACATACTATAATTCAAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGA
CAACTCCAAGAGCCAAGTTCTAAAAATGAACAGTCTGCAAACATGATGACA
CAGCCATTACTACTGTGCCAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGG
ACTACTGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácidos de scFV para CD19:

DIQMTQTSSLSASLGDRVTLSCRASQDISKYLNWYQQKPDGVKLIIHTSRLHS
GVPSRFSCSGSGTDYSLTISNLEQEEDIATYFCQQQNTLPYTRGGTKEITGGOSG
GGGSQGGGSEVKLQESGPQLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLE
WLGVIWOSETTYYNSALKSRLTIKDNNSKQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYY
GGSYAMDYWQQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 29 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG 1494 (LP-ligante CD19-conexión CD8-CD8tm-41BB-CD3zeta):

ATGCTTCTCCTGGTACCTCCCTGCTCCTCTGCAGACTGCCTCACCCCTGCCTTC
CTTCTGATTCTGACACTGACATTAGATGACTCAGACCACCTCTTCTTGTC
GCGTCACTGGAGACAGAGTACCATCTCGTGTGCGCAAGCCAGGATATCTC
CAAGTACCTGAACGGTACCAACAGAAAGCCGACGGGACTGTGAAGCTGCTG
ATCTACCACACCTCACGCCCTGCACAGCGGAGTCCAAGCAGATTCTCCGGCTC
CGGCTCGGGAAACGATTACTCGCTTACCATAGCAACCTCGAGCAGGAGGACA
TCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGAATACCCCTGCCCTACACCTTGGCGGA
GGAACCAAATTGGAAATCACCGGCTCCACGAGCGCTCCGGGAAGCCTGGTT
CCGGGGAAAGGCTCACTAAGGGTGAAGTGAAGCTCCAGGAGTCCGGCCCCGG
CCTGGTGGCGCCGTGCAATCACTCTGTGACCTGTACCGTGTGGAGTGT
CCCTGCCTGATTACGGCGTGAGCTGGATTCGGCAGCGCCGGGAAGGGCCTG
GAATGGCTGGGTGTATCTGGGATCCGAGACTACCTACTACAACCTGGCCCT
GAAGTCCCCCTGACTATCATCAAAGACAACCTCGAAGTCCCAGGTCTTCTGA
AGATGAACCTCCTGCAAACACTGACGACACCGCCATCTATTACTGTGCTAACGAC
TACTACTACGGTGGAAAGCTATGCTATGGACTACTGGGCCAGGGACATCCGT
GACAGTCAGCTCCGGCCGAACCTACCAACCCCTGCCCTCGGCGCCGACTC
CGGCCCCAACATCGCAAGCCAACCCCTCCTCGGCCCGAAGCTGCCGC
CCGGCCGGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGCCTGCGATAT
CTACATTGGCCCCGCTGGCCGGACTTGCAGGCGTGTCTGCTGCGTGGT
CATCACCCCTTACTGCAAGAGGGCCGGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGC
AGCCGTTCATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTG
CAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGCAAGTTCTCA
CGGTCCGCCGACGCCCCGCAATACAAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGA
GCTGAACCTGGGAAGGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCC
CGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAAACCTCAGGAAGGA
CTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCG
GGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAGGGAAAGGGTACAGACGGCTGTACCAAGG
GACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTGCATATGCAAGCACTC
CCACCCCGG

SEQ ID NO: 30 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1494 (LP-ligante Cd19-conexión CD8-CD8tm-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPIPTDIQMTQTSSLSASLGDRVVTISCRASQDISKYLN
 WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSQVPSRFSGSQSGTDSLTISNLQEEDIATYFCQQ
 GNTLPYTFCGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVT
 CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ
 VFLKMNSLQTDATIYCAKHYYYGGSYAMDYWQQGTSVTVSSAAATTTPAPR
 PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLV
 ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRFPEEEQEGCERVKFSRSAD
 APAYQQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPREMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 31 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1538 (LP-ligante Cd19-enlazador CD8-CD8tm-señales (CD19 CAR rediseñado mediante LTI):

ATGCTTCTCCTGGTACCTCCCTGCTCCTCTGCAGACTGCCACCCCTGCCCT
 CTTCTGATTCTGACATTAGATGACTCAGACCACCTCTTGTCCCGCGTCA
 CTGGGAGACAGAGTGACCATCTCGTGTGCGCAAGCCAGGATATCTCCAAGTA
 CCTGAACGGTACCAACAGAACAGCCCACGGGACTGTGAAGCTGCTGATCTACC
 ACACCTCACGCCCTGCACAGCGGAGTCCAAGCAGATTCTCCGGCTCCGGCTCG
 GGAACCGATTACTCGCTTACCAATTAGAACCTCGAGCAGGAGGACATCGCTAC
 CTACTTCTGCCAGCAAGGAAATACCCCTGCCCTACACCTTCCGGAGGAGGAACCA
 AATTGGAAATCACCGCGGAGGAGGCTCCGGGGAGGAGGAGGTTCCGGGGCGG
 GGGTCCGAAGTGAAGCTCCAGGAGTCCGGCCCCGGCTGGTGGCGCCGTCGC
 AACACTCTGTGACCTGTACCGTGTCCGGAGTGTCCCTGCCCTGATTACGGCG
 TGAGCTGGATTCCGAGCCGGCGGAGGCTGGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGTGTATC
 TGGGGATCCGAGACTACCTACTACAACCTGGCCCTGAAGTCCCCTGACTAT
 CATCAAAGACAACCTCGAAGTCCCAGGTCTTCTGAAGATGAACCTCCCTGCAA
 CTGACGACACCGCCATCTATTACTGTGCTAACGACTACTACTACGGTGGAAAGC
 TATGCTATGGACTACTGGGGCAAGGCACTCGGTGACTGTGTCAAGCGCGGC
 CGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAA
 GCCAACCCCTCTCCTGCGCCCCGAAGCTGCCGCCGGCGGGTGGAGCC
 GTGCATACCGGGGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTGGGCCCCGCT
 GCCGGCACTTGCAGCGTGCCTGCTGCGCTGGTCATCACCTTACTGCAA
 GAGGGGGCCGAAGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTTATGCCGGCCCG
 TCCAGACGACTCAGGAAGAGGAGCGATGCTCGTCAGATCCCTGAGGAGGA
 AGAGGGGGGATGCGAAGTGCCTGCGCTCAAGTCTCACGGTCCGCCGACGCC
 GCATATCAACAGGGCCAGAACATCAGCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGA
 GAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCCAGCGACCCGGAGATGGG
 GGGGAAACCACGGCGAAAACCCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAG
 AAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGATGAAGGGAGAGCGG
 AGGAGGGGAAAGGGTACGACGGGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTA
 AGGATACTACGATGCCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

SEQ ID NO: 32 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1538 (LP-ligante Cd19-enlazador CD8-CD8tm-señales (CD19 CAR rediseñado mediante LTI):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPIQMTQTSSLSASLGDRVVTISCRASQDISKYLNW
 YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSQVPSRFSGSQSGTDSLTISNLQEEDIATYFCQQG
 NTLPYTFCGGTKLEITGGGSGGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS
 GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK
 MNSLQTDATIYCAKHYYYGGSYAMDYWQQGTSVTVSSAAATTTPAPRPTPA
 PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYC
 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRFPEEEQEGCERVKFSRSADAPAY
 QQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPREMGGKPRRKNPQEGLYNELQDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 33 es la secuencia nucleotídica del dominio de unión de scFv reactivo con CD19_20 (LTG1496):

GACATTAGATGACTCAGACCACCTCCCTGTCCGCCTCCCTGGCGACCG
 CGTGACCATCTCATGCCGCCAGCCAGGACATCTGAAGTACCTCACTGGT
 ACCAGCAGAAGCCCAGCGAACCGTGAAGCCTGTATCTACACACCTCCGG
 CTGCACAGCGAGTCCGTCTAGATTCTCGGGTCGGGGTGGAACTGACTA
 CTCCCTTACTATTTCAAACCTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTCTGCCA
 ACAAGGAAACACCCCGCCGTACACTTTGGCGGGGAACCAAGCTGGAAATC
 ACTGGCAGCACATCCGGTCCCGGAACCCCCGCTCCGGAGAGGGCAGCACCA
 AGGGGAAGTCAAGCTCAGGAATCAGGACCTGGCTGGTGGCCCCGAGCCA
 GTCACTGTCCGTGACTTGTACTGTGTCCGGAGTTCGCTCCGGATTACGGAGT
 GTCCCTGGATCAGGCAGCCACCTCGGAAAGGATTGGAATGGCTCGGAGTCATCT
 GGGGTTCCGAAACCACCTATTACAACACTCGGCACTGAAATCCAGGCTCACCATT
 ATCAAGGATAACTCCAAGTCACAAGTGTCCCTGAAGATGAATAGCCTGCAGAC
 TGACGACACGGCGATCTACTATTGCGCCAAGCAGTACTACTACGGCGGATCCT
 ACGCTATGGACTACTGGGGCAGGGGACCAGCGTACCGTGTATCCGGAGG
 CGCGGCAGCGCGGGGGAGGGTCCGGAGGGGTGGTCTGGTGGAGGAGGA
 TCAGGGAGGCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTTC
 ACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCCCGGACAAGGGCTCGAAT
 GGATTGGCGCATCTACCCCGGAATGGCGATACTCGTACAACCAGAAGTTC
 AAGGGAAAGGCCACCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCACCGCGTATATGC
 AGITGAGCTCCCTGACCTCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCC
 AACTACTATGGAAGCTCGTACTGGTCTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACAC
 TGTGACCGTCAGCTCCGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGGCGAAGCGGGGT
 GGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGCCCCGCAATCCTGCGGCTCACC
 GGGCGAAAAGGTACGATGACTTGTAGAGCGTGTCCAGCGTGAACATAC
 GATTGGTACCAAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAAGCCTGGATACGCTAC
 ATCTAACCTGGCCTCCGGTGTCCAGCGCGGTTAGCGGGTCCGGCTGGGCA

CCTCATACTCGTGTGACCATCTCCCGTGGAGGCTGAGGACGCCGACCTAC
 TACTGCCAGCAGTGGTCTTCAACCCGCCGACTTTGGAGGCGGTACTAAGCT
 GGAGATCAAAGCGGCCGCA

SEQ ID NO: 34 es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión de scFv reactivo con CD19_20 (LTG1496):

DIQMTQTSSLASLGDRVTLSCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS
 GVPSRFSGSQGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQQNTLPYTFGGGTKEITGSTSGS
 GKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK
 GLEWLGVIWGSETYYNSALKSRLTHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH
 YYYGGSYAMDYWQGGTSVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLQ
 QSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTS
 YNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSDYYCARSNYYGSSYWFFDWG
 AGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVMTCRASSSVNY
 MDWYQKKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLISRVEAEDAATYY
 CQQWSFNPPTEGGGTKEIKAAA

SEQ ID NO: 35 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1496 (LP-LTG1496-CD8 TM-41BB-CD3zeta) o (LP-CD19 VI-enlazador Whitlow-CD19 VH (GGGGS)s CD20 VH (GGGGS)₃-bisagra CD20 VL CD8+TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTCCCTCTCGTACCTCCCTGCTTCTCGAAGCTGCCCATCCTGCCTTCC
 TGCTGATTCCGACATTCAAGATGACTCAGACCACCTCCTCCCTGTCCGCCTCCC
 TGGCGACCGCGTGAACCATCTCATGCCCGCCAGCCAGGACATCTGAAGTAC
 CTCAACTGGTACCAGCAGAACGCCCCGACGGAACCGTGAAGCTCCTGATCTACCA
 CACCTCCGGCTGACAGCGGAGTAGCCGTCTAGATTCTGGGTTGGGGTCGG
 GAAGTGACTACTCCCTACTATTCAAACCTGGAGCAGGAGGATATTGCCACC
 TACTTCTGCCAACAAAGGAAACACCCCTGCCGTACACTTTGGCGGGGAACCAA
 GCTGGAAATCACTGGCAGCACATCCGGTCCGGGAAGCCCGCTCCGGAGAG
 GGCAGCACCAAGGGGAAGTCAGCTGCAGGAATCAGGACCTGGCCTGGTGG
 CCCCGAGCCAGTCAGTCCGTGACTTGTACTGTGTCCGGAGTGTGCGCTCCCG
 GATTACGGAGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCTCGGAAGGATTGGAATGGCT
 CGGAGTCATCTGGGTTCCGAAACCACCTATTACAACCTCGGCACTGAAATCCA
 GGCTCACCAATTATCAAGGATAACTCCAAGTCACAAGTGTCTGAAGATGAAT
 AGCCTGCAGACTGACGACACGGCGATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTA
 CGCGGATCCTACGCTATGGACTACTGGGCCAGGGGACCGAGCGTGACCGTGT
 CATCCGGAGGCAGCCGGCAGCGGGGGAGGGTCCGGAGGGGGTGGTCTGG
 TGGAGGAGGATCGGGAGGCAGGTGGCAGCAGGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGA
 GCTGAACGGTCAAGCCAGGAGCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCCTCCG
 GTTACACCTTCACCTCTACAAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCGGGACAA
 GGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCGGGAATGGCGATACTTCGTACAA
 CCAGAAGTTCAGGGAAAGGCCACCCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACC
 GCGTATATGCAAGTGCAGTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGGCACTACTG
 CGCACGGTCCAACTAATATGGAAGCTGTAUTGGTTCTCGATGTCAGGGGG
 CGGGCACCACTGTGACCGTCAGCTCCGGGGCGAGGATCCGGTGGAGGCGG
 AAGCGGGGGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCGGCAATCCTGT
 CGGCGTCAACGGGAAAAGGTACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTG
 AACTACATGGATTGGTACCAAAAGAACGCTGGATCGTCACCAAGCCTGGAT
 CTACGCTACATCTAACCTGGCCTCCGGCGTGCACGCGGGTCAAGCGGGTCCG
 GCTCGGGCACCTCATACTCGTGAACCATCTCCCGCGTGGAGGCTGAGGACGCC
 GCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCAACCCGCCACTTTGGAGGCAG
 TACTAAGCTGGAGATCAAAGCGGCCAACCTACCAACCCCTGCCCTGGCCGC
 CGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCTGGCGCCCCGAAGCT
 TGCCGCCCCGGCCGGTGGAGCGCCACTACCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTGGCTG
 CGATATCTACATTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTOCGGCGTGTCTCTGCTGTC
 GCTGGTCATCACCCCTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAACGCTGCTTACATCT
 TCAAGCAGCCGTTCATCGGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATG
 CTGCGAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTGGCGTCAAG
 TTCTCACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAGGGCAGAACGCTCTA
 CAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGA
 CGCGGACCGCAGCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCCTCAG
 GAAGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAAGATGGCGGAAGCCTACTCAG
 AAATCGGGATGAAAGGGAGAGCGGAGGGGGAAAGGCTCACGACGGCTGT
 ACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAACGGATACCTACGATGCCTGCATATGCAA
 GCACTCCCACCCCGG

SEQ ID NO: 36 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1496 (LP-LTG1496-CD8 TM-41BB-CD3zeta)

o (LP-CD19 VI-enlazador Whitlow-CD19 VH-(GGGGS)₅-CD20 VH (GGGGS)₃-bisagra CD20 VL-CD8+TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTSSLASALGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSQGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG
NTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSKPGSGEGSTKGEVKLQESCPGLVAPSQSLSVTC
TVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETIYYNSALKSRLTHKDNSKSQV
FLKMNSLQTDATIYCAKHYGGSYAMDYWQQGTSVTVSSGGGGSGGGGGSG
GGSGGGGGGGSEVQLQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ
TPGQGLEWIGAIYPGNGDTSVNQKPKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADY
YCARSNYYGSSYWFFDVWGAGITVTVSSGGGGGGGGSDIVLTQSPAIALS
ASPGEKVTMTCRASSVNMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGS
GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTEGGTKEIKAATITPAPRPTPAPT
IASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITYCK
RGRKKILLYIFKQPFMRPVQTTQEEGCSRFPREEEGGCELRVKFSSRADAPAYQ
QGQNQLYNELNLGRREYDVLKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPL

SEQ ID NO: 37 es la secuencia nucleotídica del dominio de unión de scFv reactivo con mesotelina (LTG1904):

GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTGATGATTATGCCATGCACTG
GGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG
AATAGTGGTAGCATAGGCTATCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTC
CAGAGACAACGCCAAGAACCTCCCTGTATCTGAAATGAACAGTCTGAGAGCT
GAGGACACGCCCTTGATTACTGTCAAAAGATTATCGTCAGTGGCTGGACC
CTTTAACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTCTCCTCAGGAGGTGGCG
GGTCTGGTGGAGGCCTAGCGGCGGTGGCGATCTCTCTGAGCTGACTCAG
GACCCCTGCTGTGTCTGTGGCCTGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGG
AGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAG
GCCCTGTACTTGTATCTATGGTAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGA
CCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTCCTGACCACACTGGGG
CTCAGGCGGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCAGGACAGCAGTGGT
AACCATCTGGTATTGGCGGAGGCACCCAGCTGACCGTCCTCGGT

SEQ ID NO: 38 es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión de scFv reactivo con mesotelina (LTG1904):

EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW
NSGSIGYADSVKQRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDLSSVAGPFN
YWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGGSSSLELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSL
RSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEA
DYYCNSRDSSGNHLVFGGGTQLTVLG

SEQ ID NO: 39 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1904 (LP-LTG1904-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTGCTGCTGGTACCAGCCTGCTGTCGAACGTCCGCATCCGGCGTT
 TCTGCTGATTCCGGAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGC
 CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTCAGCCTCTGGATTACCTTGATGATT
 ATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGTCTC
 AGGTATTAGTGGAATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCC
 GATTCAACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACCTCCCTGTATCTGCAAATGAAC
 AGTCTGAGAGCTGAGGGACACGGCCTGTATTACTGTGCAAAGAAGATTATCGTC
 AGTGGCTGGACCCTTAACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTCTCCT
 CAGGAGGTGGCGGGCTGGTAGGGGGTAGCGGCGGTGGCGGATCCTCTTCT
 GAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTCTGTGGCCTGGACAGACAGTCAGGAT
 CACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACAGCTATTATGCAAGCTGGTACCGCAG
 AAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTACATCTATGGAAAAACAACCGGCCCTC
 AGGGATCCCAGACCATTCTGGCTCAGCTCAGGAAACACAGCTCCCTTGA
 CCATCACTGGGCTCAGGCGGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCGG
 GACAGCAGTGGTAACCATCTGGTATTGGCGAGGCACCCAGCTGACCGTCT
 CGGTGGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCACTCCGGCCCCAA
 CCATCGCAAGCCAACCCCTCTCTTGCGCCCCGAAGCTTGGGCCGGCG
 GGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGCTGGACTTTGCTGCGATATCTACATTG
 GGCCCCGCTGGCCGGCACTTGGCGTGTCTCTGCTGCGTGGTACATACCCCT
 TTACTGCAAGAGGGGGCGGAAGAACAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTTCA
 TCGGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTGTGCAGATTCCCT
 GAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGGCGTCAAGTTCTACGGTCCGCC
 ACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAACAGCTTACACAGAGCTGAACCTG
 GGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCCGACGCC
 GAGATGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAAC
 GAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGG
 GAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTACGACGGCTGTACCGAGGACTGAGCA
 CCGCCACTAAGGATAACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCACCCCGG

SEQ ID NO: 40 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1904 (LP-LTG1904-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

MLLVTSLLLCELPHAFLLIPEVQLVQSGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYA
 MHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL
 RAEDTALYYCAKDLSVAGPFNYWGQGTLTVSSGGGSGGGGGGGSSSEL
 TQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIP
 DRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAYYCNSRDSGNHLVFGGGTQLTVLGAAA
 TTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYWAPLAGTC
 GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSRFPEEEAGGCELR
 VKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNP
 QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
 QALPPR

SEQ ID NO: 41 es la secuencia nucleotídica del dominio de unión monocatenario reactivo con CD33 VH-4 (LTG1906):

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCC
 TGAGACTCTCTGTCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGAGCT
 GGGTCGCCAGGCTCAAGACAAGGGCTTGAGTGGTGGCAACATAAAC
 AGATGGAAGTGAGAAATACTATGCGGACTCAGTGAAGGGCGATTACCATC
 TCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG
 CCGAGGACACGCCACGTATTACTGTGCGAAAGAAAATGTGGACTGGGCCA
 GGGCACCCCTGGTACCCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 42 es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión monocatenario reactivo con CD33 VH-4 (LTG1906):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWSVRQAPRQGLEWVANIKQD
 QSEKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAKENVDWGQGTL
 VTVSS

SEQ ID NO: 43 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1906 (LP-VH4-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

ATGCTGCTGCTGGTACCAGCCTGCTGCGAAGTGCCTGATCCGGCGTT
 TCTGCTGATTCCGGAGGTGCAAGCTGGTGAGTCTGGGGAGGCTTGTACAGC
 CTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCT
 ATGGCATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCAAGACAAGGGCTTGAGTGGGTGGC
 CAACATAAAGCAAGATGGAAGTGGAAATACTATGCGGACTCAGTGAAGGGC
 CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCACGTATTACTGTGCGAAAGAAAATGTG
 GACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTCTCAGCGGCCGCAACTACCAC
 CCCTGCCCTCGGCCGCCAGCTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCT
 CCTTGCGCCCGAAGCTTGCCTGGCCGGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGG
 GGGCTGGACTTGCCTGCGATATCTACATTGGGCCCCGCTGGCGGCACTTG
 CGCGTGCCTGCTGCGCTGGTCATACCCCTTACTGCAAGAGGGGCCGGA
 AGAAGCTGCTTACATCTCAAGCAGCCGTTATGCGGCCGTGCAGACGACT
 CAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGAT
 CGCAACTGCGCGTCAAGTCTCACGGTCCGCCGACGCCCGCATATCAACAG
 GGCCAGAACATCAGCTTACAACGAGCTGAACCTGGAAAGGAGAGAGGAGTACG
 ACGTGCAGACAAGCGACGCCGACGCCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACG
 CGGGAAAAACCCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCAGAAAGACAAGATG
 CGGGAAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGGAGGAGGGAAAG
 GTCAACGACGGCTGTACCAAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACG
 ATGCCTTGATATGCAAGCACTCCCACCCCG

SEQ ID NO: 44 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1906 (LP-VH4-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM
 WVRQAPRQGLEWVANIKQDGSEKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
 DTATYYCAKENVDWQGQTLTVSSAAATTTPAPRPPPTAPTASQPLSLRPEACRP
 AAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLYIFKQPF
 MRPVQTTEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLG
 RREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGER
 RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 45 es la secuencia nucleotídica del dominio de unión de scFv reactivo con TSLPR (LTG1789):

ATGGCACTGCCGTGACCGCCCTGCTCTGCCCTTGCACTTCTGCTGCACGCC
 GCTAGGCCCAAGTCACCCCAAAGAGTCAGGGCAGGAATCCTCAAGCCCTC
 ACAGACTCTGCTCTTAACCTGCTATTAGCGGATTAGGAAAGGGCTTGAATGGCTG
 TATGGCGTGGGGATTAGGAAACCTAGCGGAAAGGGCTTGAATGGCTG
 GCCCACATCTGGTGGACGACAAAGTACTACAACCCCTACTGAAGTCCCA
 GCTCACTATTCAAAGATACTCCCGAATCAGGTGTTCTCAAGATTACCTC
 TGTCGACACCGCTGATACCGCCACTTACTATTGTTACCGACAGCCGAGAGGTA
 CCATGGACCAATGGACTACTGGGACAGGGCACCAGCGTGACCGTGTCACT
 GCGGTGGAGGGTCAGGAGGTGGAGGTAGCGGAGGCGGTGGGTCCGACATTG
 TCATGACCCAGGCCAGCAGCCTGAGCGCTTACTGGGCACAGGGTGACC
 ATCAGCTGCGCGCATACAAGATATCTCTAAGTATCTTAATTGGTACCAAGCA
 AAAGCCGGATGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACTACACCTCACGGCTGCATT
 CTGGAGTGCCTAGCCGCTTAGCGGATCTGGGTCCGGTACTGACTACAGCCTC
 ACCATTAGAAACCTTGAACAGGAGGACATCGCAACTTATTCTGCCAACAGGT
 CTATACTCTGCCGTGGACCTCGCGGAGGTACCAACTGGAGATTAAGTCGG
 G

SEQ ID NO: 46 es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión de scFv reactivo con TSLPR (LTG1789):

MALPVTALLPLALLLHAARPQVTLKESGPGLKPSQLSITCSFGFSLSTSGMGV
 GWIRQPSKGLEWLAIWWDDDKYYNPSLKSQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTAD
 TATYYCSRPRGTMDAMDYWGQGTSVTSSGGGGSGGGGGSDIVMTQAA
 SSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYTSLRHSGVPSRFSGS
 GSGTDYSLTIRNLEQEDIATYFCQQVYTLWTFGGTKLEIKS

SEQ ID NO: 47 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1789 (LP-3G11-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

ATGGCACTGCCGTGACCGCCCTGCTTCTGCCGCTTGCACTTCTGCTGCACGCC
GCTAGGCCCAAGTCACCCTCAAAGAGTCAGGGCCAGGAATCCTCAAGCCCTC
ACAGACTCTGCTCTTACTTGCTATTAGCAGCGGATTCAAGCTTCCACCTCTGG
TATGGCGTGGGTGGATTAGGCAACCTAGCGAAAGGGCTTGAATGGCTG
GCCACACTGGTGGGACGACGACAAGTAACAAACCCCTCACTGAAGTCCC
GCTCACTATTCAAAGATACTTCCCAGAACCTAGGTGTTCTCAAGATTACCTC
TGTCGACACCGCTGATACCGCACTTACTATTGTCACGCAGACCGAGAGGT
CCATGGACGCAATGGACTACTGGGACAGGGCACCCAGCGTGAACCGTGT
GGCGGTGGAGGGTCAGGAGGTGGAGGTAGCGGAGGCAGTGGGTCCGACATTG
TCATGACCCAGGCCAGCAGCAGCTGAGCGCTTCACTGGCGACAGGGTGACC
ATCAGCTGCGCATACAAGATATCTAAGTATCTAATTGGTACCA
AAAGCCGGATGGAACCGTGAAGCTGATCTACTACACCTCACGGCTGCATT
CTGGAGTGCCTAGCCGTTAGCGGACTTGCGCGTGTCTGCTGTCGCTG
GTCATCACCTTACTGCAAGAGGGCCGGAAGAAAGCTGCTTACATCTCAA
GCAGCCGTTATGCCCGTGCAGACGACTAGGAAGAGGGACGGATGCTCG
TGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAAGTGCCTACAGCT
CACGGTCCGCCAGCCCCCATATCAACAGGCCAGAACAGCTCTACAAC
GAGCTGAACCTGGGAAGGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACCG
GACCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCAAGGGGGAAAAACCCCTAGGAAG
GACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCTACTCAGAAAT
CGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGGAAAGGGTACGACGGCTGTACCA
GGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACTACGATGCCTGATATGCAAGCAC
TCCCACCCCG

SEQ ID NO: 48 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1789 (LP-3G11-CD8 TM-41BB-CD3zeta):

MALPV TALLLPL ALLLHAARPQVTLKESGP GILKPSQ TL SL TCS FSG FSL STSGM GV
GWIRQPSKGLEWL AHIWWDDD KYYNPSLKS QL TS KDT SRN QVFL KIT SV DT AD
TAT YY CSRR PR GTMD AMDY WQ QG TS VT VSSGGG SGGG SGGG SDIV MT QAA
SSLSASLGDRVTISCRASQDISK YLNWYQQKPDGTVKLLI YYTSRLHSGV PSRF SG S
GSGTDYSLTIRNLEQEDIATYFCQVYTL PWTFGG KLEIKAA ATT PAPR PPTP
APTTASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRQLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLS LV ITLY
CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGS CRFPEEEEGG CELRVKF SRSAD APA
YQQQQNQOLYNELNLGRRE EYDVL DKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGD GLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR

SEQ ID NO: 49 es la secuencia nucleotídica del CAR LTG1563 (LP-CD19-TNFRSF19TM-41 BB-CD3zeta):

ATGCTGCTGCTGGTACCA GCGCTGCTGTGCAGCTCCCTCACCCCGCTT
CTGCTTATCCCGACATT CAGATGACACAGACCA CCTCGAGCTTGTCCCGC
GCTGGCGATCGCGT GACC ATCTCCTGCCGGGCTCCAAAGACATTCAAAGT
ATCTCAACTGGTACCA GAGAAGCCGGACGGAAACCGTGA ACTGCTGATCTAC
CATACCAGCCGCTGC ACTCCGGCGT GCGTCCCCTCTCCGGATCGGGTCC
GGA ACTGACTACTCACTGACTATCTCAACTTGGAAACAAGAGGACATGCCAC
TTACTTCTGTCAACAAGGAATACCCTCCCTACACCTCCGGGGGGTACCA

AGCTGGAGATCACTGGGGCGGAGGCTCCGGTGGAGGC GGATCCGGCGGTGG
AGGGAGCGAAGTCAGTCAGGAATCAGGACCAGGACTCGTGGCGCCATCC
CAGTCCTGTCGGTGACCTGTACTGTCTCCGGAGTCAGCCTCCCCGATTACGG
AGTGTATGGATTAGGCACCCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTGGAGTG
ATCTGGGGCTCCGAAACCACCTACTACAACTCGGCGCTGAAGTCCGGCTGAC
CATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTGTCTTGAAGATGAACAGCTTGC
AGACCGACGATACCGCAATCTACTACTGTGCCAACGACTATTACTACGGGGG
TCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAGGGCACCTCCGTGACTGTGCGTCCGC
GGCCGCGCCC CGCCCCCTCGGCCCCGACTCCTGCCCGACGATCGCTCCCAAC
CTCTCTCGCTGCGCCCGGAAGCATGCCGGCCGCCGGTGGCGCTGTCCAC
ACTCGCGACTGGACTTGTACCGCACTGGCGCCGTGATCTGTAGCGCCCT
GCCACCGTGCTGCTGGCGCTGCTCATCCTTGC GTGATCTACTGCAAGCGGC
AGCCTAGGCAGAAGAAGCTCCTACATTTCAAGCAACCCCTCATGCGCCCC
GTGCAAACCACCCAGGAGGAGGATGGATGCTCATGCCGGTCCCTGAGGAAG
AAGAGGGCGGTGCGAGCTCAGAGTCAAATTAGCCGGTGGCTGACGCC
GGCGTACCAAGCAGGGCAGAACCGAGCTGTACAATGAGCTAACCTGGGGCG
CGCGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGAGGAGAGATCCGGAAATG
GGCGGAAAGCCAAGGCGGAAGAACCCGAGGAAGGTCTTACAACGAACACTGC
AGAAGGACAAGATGGCGAGGCCTACTCCGAGATTGGGATGAAGGGAGAAAG
ACGGAGGGAAAGGGACATGACGGACTTACCAAGGGCTGAGCACTGCCACG
AAGGACACCTATGATGCCCTGCACATGCAGGCCTGCGCCCTCGG

SEQ ID NO: 50 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG1563 (LP-CD19-TNFRSF 19TM-41BB-CD3zeta):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIIPDIQMKTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLQEEDIATYFCQQQ
NTLPYTFGGTKLEITGGGSGGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS
GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK
MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYYGSYAMDYWQGQTSVTVSSAAAPAPRPTPAPTI
ASQPLSI.RPEACRPAAGGA VHTRGLDFDTALAAVICSALATVLLALLIICVIYCKR
QPRRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSA DAPAYQ
QGQNQLYNELNLGRREEYDVLKDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 51 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG2228 (LP-CD20_CD19-CD8TM-CD28-CD3zeta):

ATGCTCCTCTCGTACCTCCCTGCTTCTCGAACATGCCCATCCTGCCTTCC
TGCTGATTCCCGAGGTGCAAGTGCAACAGTCAGGAGCTGAACGGTCAAGCCA
GGAGCCACCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTCACCTCCTA
CAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCGGACAAGGGCTCGAATGGATTGGC
GCCATCTACCCCGGAATGGCGATACTCGTACAACCAGAAGTTCAAGGGAA
AGGCCACCCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCACCGCGTATATGCA GTTGAGC
TCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCAA CACTA
TGGAGCTCGTACTGGTCTTCGATGTCGGGGGGCGGCACC ACTGTGACCG
TCAGCTCGGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGC GGAAGCGGGGTGGAGGATC
CGACATTGTGCTGACTCAGTCCC GGCAATCCTGCGGCTCACGGCGAAA
AGGT CACGATGACTGTAGAGCGTCCAGCGTGAACATGGATTGGTAC
CAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAGCCTGGATCTACCGCTACATCTAACCT

GGCCTCCGGCGTGCCAGCGCGGTTCAGCGGGTCCGGCTGGGCACCTCATACT
 CGCTGACCATCTCCCGGTGGAGGCTGAGGACGCCGCACCTACTACTGCCAG
 CAGTGGTCCTCAACCCGCCACTTTGGAGGCCGTAAGCTGGAGATCAA
 AGGAGGCCGGCAGCGCGGGGGAGGGTCCGGAGGGGGTGGTCTGGTGGA
 GGAGGATCAGGGAGGCCGTCAGCAGCATTCAGATGACTCAGACCACCTCCT
 CCCTGTCCGCCCTCCCTGGCGACCGCGTGACCATCTCATGCCGCCAGCCAG
 GACATCTCGAAGTACCTCACTGGTACCCAGCAGAAAGCCCACGGAACCGTGA
 AGCTCCTGATCTACCACACCTCCCGCTGCACAGCGGAGTGCCTAGATT
 TCGGGTTCGGGGTCCGGAACTGACTACTCCCTACTATTTCAACCTGGAGCA
 GGAGGATAATTGCCACCTACTCTGCCAACAGGAAACACCCCTGCCGTACACTT
 TTGGCGGGGAACCAAGCTGGAAATCACTGGCAGCACATCCGGTCCGGAA
 GCCCGGCTCCGGAGAGGGCAGCAGCAAGGGGGAGTCAGCTGCAGGAATCA
 GGACCTGGCTGGTGGCCCCGAGCCAGTCAGTGCCTGACTTGTACTGTGTC
 CGGAGTGTGCTCCCGGATTACGGAGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCTCGGA
 AAGGATTGGAATGGCTCGGAGTCATCTGGGGTCCGAAACCACCTATTACAAC
 TCGGCACTGAAATCCAGGCTACCATTATCAAGGATAACTCCAAGTCACAAGT
 GTTCCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACTGACGACACGGGATCTACTATTGCG
 CCAAGCACTACTACTACGGGGATCCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGG
 ACCAGCGTGACCGTGTCACTCCGGCCGACTACCACTCTGCACCGGCC
 ACCTACCCAGCCCCCACCATTGCAAGCCAGCCACTTTACTGCGCCCCGAAG
 CGTAGACCACTGCTGGAGGAGCCGTGCATACCCGAGGGCTGGACTTCG
 TGTGACATCTACATCTGGCCCCATTGGCTGGAACTTGCCTGCTGCTT
 TCTCTGGTCACTACCTGTACTGCCGGTCAAGAGGGTCCAGACTCTGCACTCC
 GACTACATGAACATGACTCCTAGAAGGGCCGGACCCACTAGAAAGCACTACC
 AGCCGTACGCCCTCTCGGGATTCCGGCATACCGGTCCAGAGTGAAGTTC
 AGCCGCTAGCCGATGCAACGGGCTACAGCAGGGACAGAACCGAGCTACA
 ACGAGCTAACCTGGTCGGCGGAAGAATATGACGTGCTGGACAAACGGCG
 CGGCAGAGATCCGGAGATGGGGGGAAAGCCGAGGAGGAAGAACCTCAAGA
 GGGCCTGTACAACGAACTGAGAAGAACAGATGGCGGAAGCCTACTCCGAG
 ATCGGCATGAAGGGAGAACGCCGGAGAGGGCATGACGGACTGTACC
 AGGGCCTGTCAACTGCCACTAAGGACACTTACGATGCGCTCCATATGCAAGCT
 TTGCCCCCGCGG

SEQ ID NO: 52 es la secuencia de aminoácidos del CAR LTG2228 (LP-CD20_CD19-CD8TM-CD28-CD3zeta):

MLLVTSLLLCELPHAFLLIPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYN
 MHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNNQFKKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT
 SEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTTVSSGGGGGGGGGGSDIVL
 TQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKWIYATSNLASGVPA
 RFSQSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGTKLEIKGGGGGGGG
 SGGGGSGGGGGGGSDIQMTQTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK
 PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGCTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQQNTLPY
 TFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
 SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKM
 NSLQTDDETAJYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSAAATTPAPRPPTPAP
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVTLIYC
 RSKRSRLHSDDYMNMTPRRGPGPTRKHYQPYAPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAY
 QQGQNQLYNELNLGRREYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDYLALHMQALPPR

REIVINDICACIONES**1. Una composición de inmunoterapia, que comprende:**

una población de células T humanas, en la que cada célula de la población de células T humanas comprende al menos dos vectores, en la que al menos uno de los dos vectores comprende al menos un vector multicistrónico, cada uno del al menos un vector multicistrónico comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico multicistrónica que codifica dos o más CAR funcionales que comprenden al menos dos dominios de unión a antígeno extracelulares no idénticos, un dominio transmembrana, y uno o más motivos de señalización intracelular no idénticos, en la que

uno de los dos o más CAR funcionales comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 52; y

la combinación de los vectores da como resultado la expresión de al menos dos dominios de unión extracelulares no idénticos; y

en la que los al menos dos vectores se usan para modificar genéticamente una o más poblaciones de células T humanas, y en la que las células T son autólogas para un ser humano que tiene una leucemia o un linfoma.

15 2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad antitumoral eficaz de la composición de la reivindicación 1.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que la leucemia es leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), o leucemia mielógena crónica (CML), o en la que el linfoma es linfoma de células del manto, linfoma no Hodgkin, o linfoma de Hodgkin.

20 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que el linfoma es un linfoma de células del manto, un linfoma no Hodgkin, o un linfoma de Hodgkin.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 2 para uso en un método para tratar a un mamífero que tiene un linfoma.

25 6. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 5, en la que las células T autólogas se infunden directamente de nuevo en el paciente para promover la expansión *in vivo*, la persistencia de células T antitumorales específicas del paciente que da como resultado la estabilización, reducción, eliminación, remisión o eliminación del cáncer del tumor o recaída del cáncer de una manera específica del paciente.

30 7. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 5, en la que las células T autólogas se han preseleccionado en virtud de la expresión de activación específica o de marcadores de superficie asociados a la memoria, o en la que la célula T y las células dendríticas derivan de un donante de células madre hematopoyéticas, y en la que el procedimiento se lleva a cabo en el contexto del trasplante de células madre hematopoyéticas.

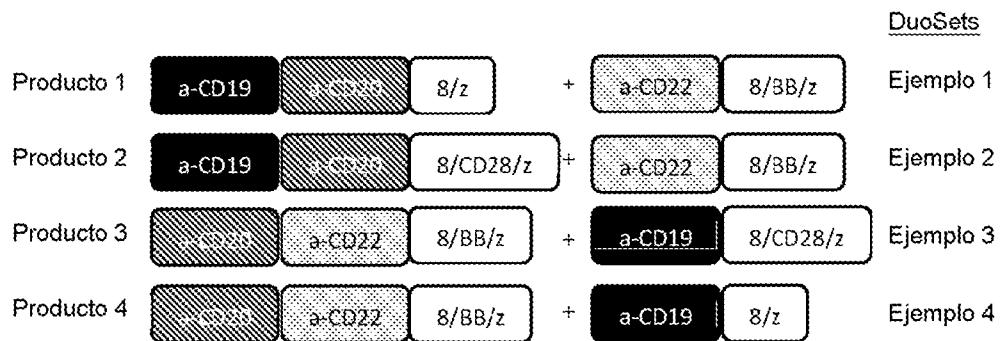


FIG. 1

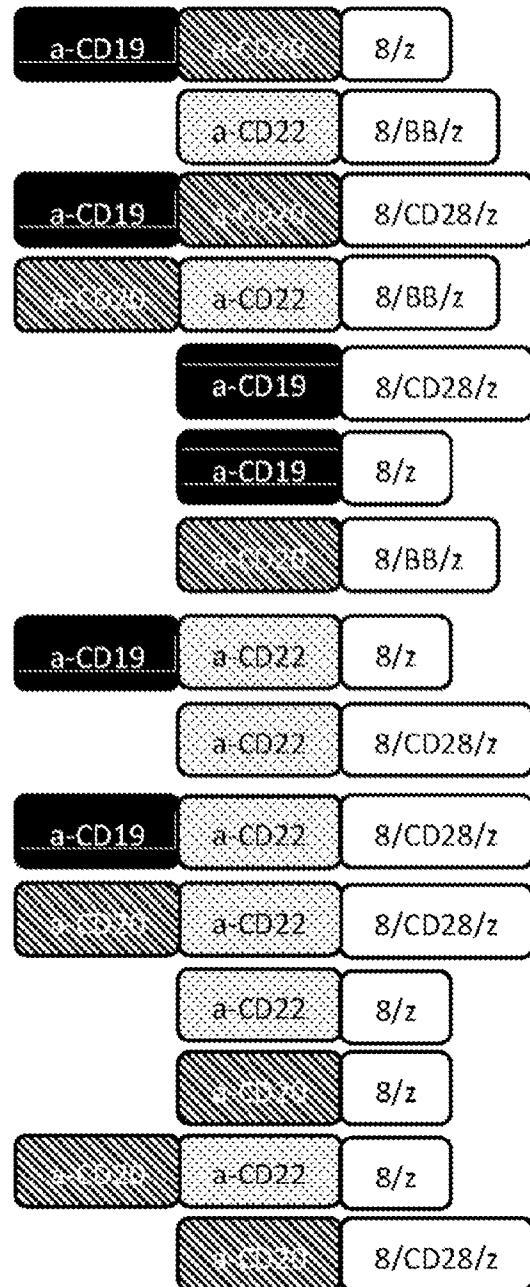
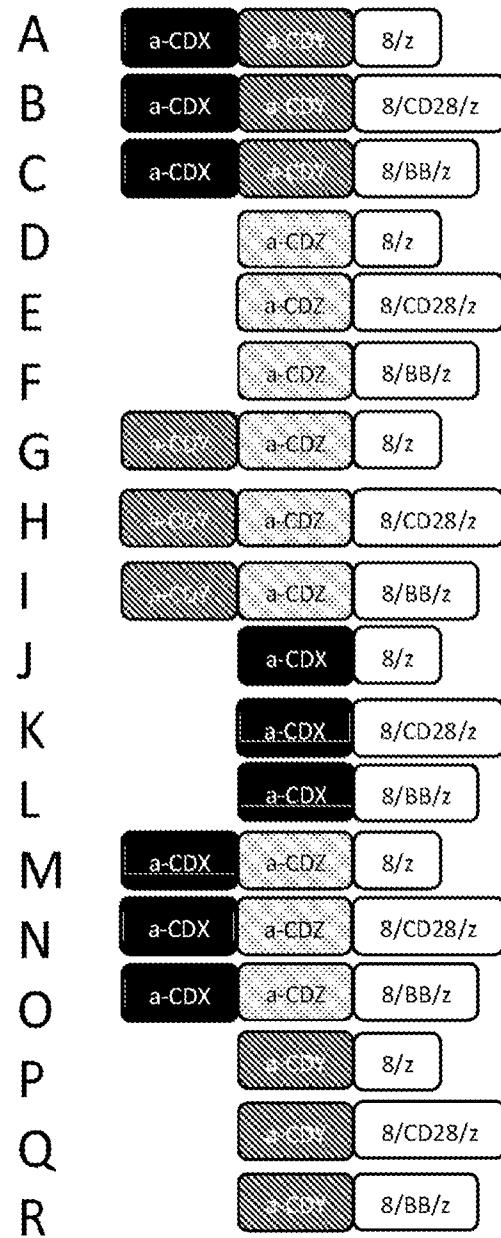
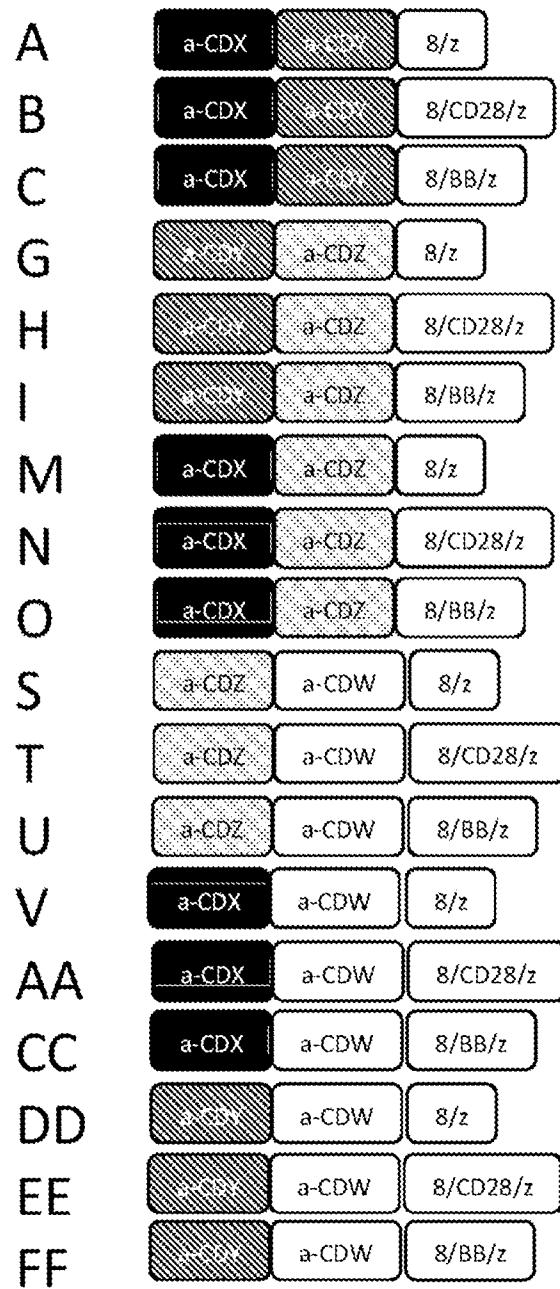
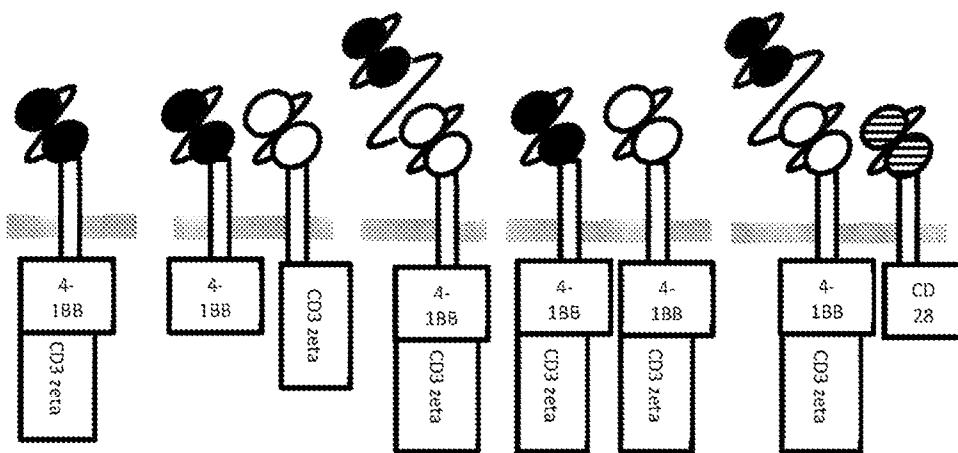


FIG. 2

**FIG. 3**

**FIG. 4**

A. CAR sencillo B. CAR dividido C. CAR en tandem D. CAR múltiples de un vector E. DuoCAR (formato DuoSet 2+1)



F. DuoCAR, formato de gigantes solubles de especificidad sencilla (DuoSet 2+1)

G. DuoCAR, formato de gigantes solubles de especificidad dual (DuoSet 2+1)

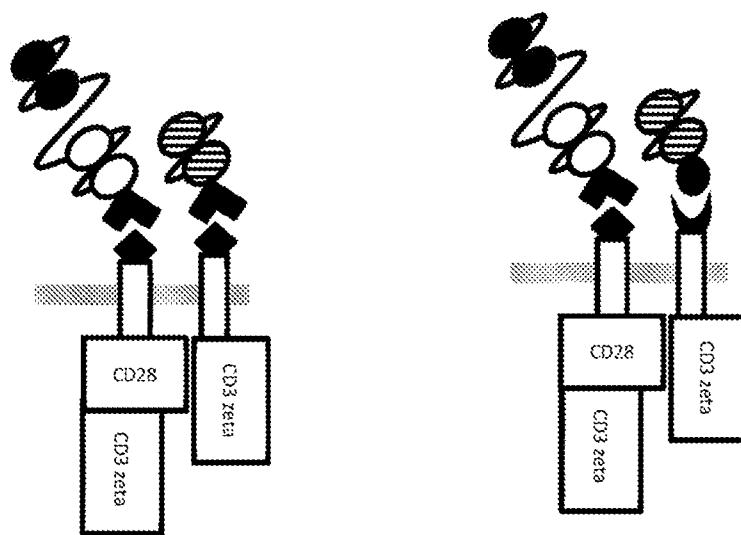


FIG. 5

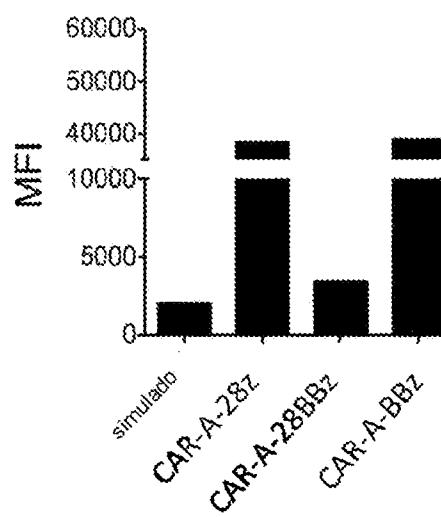
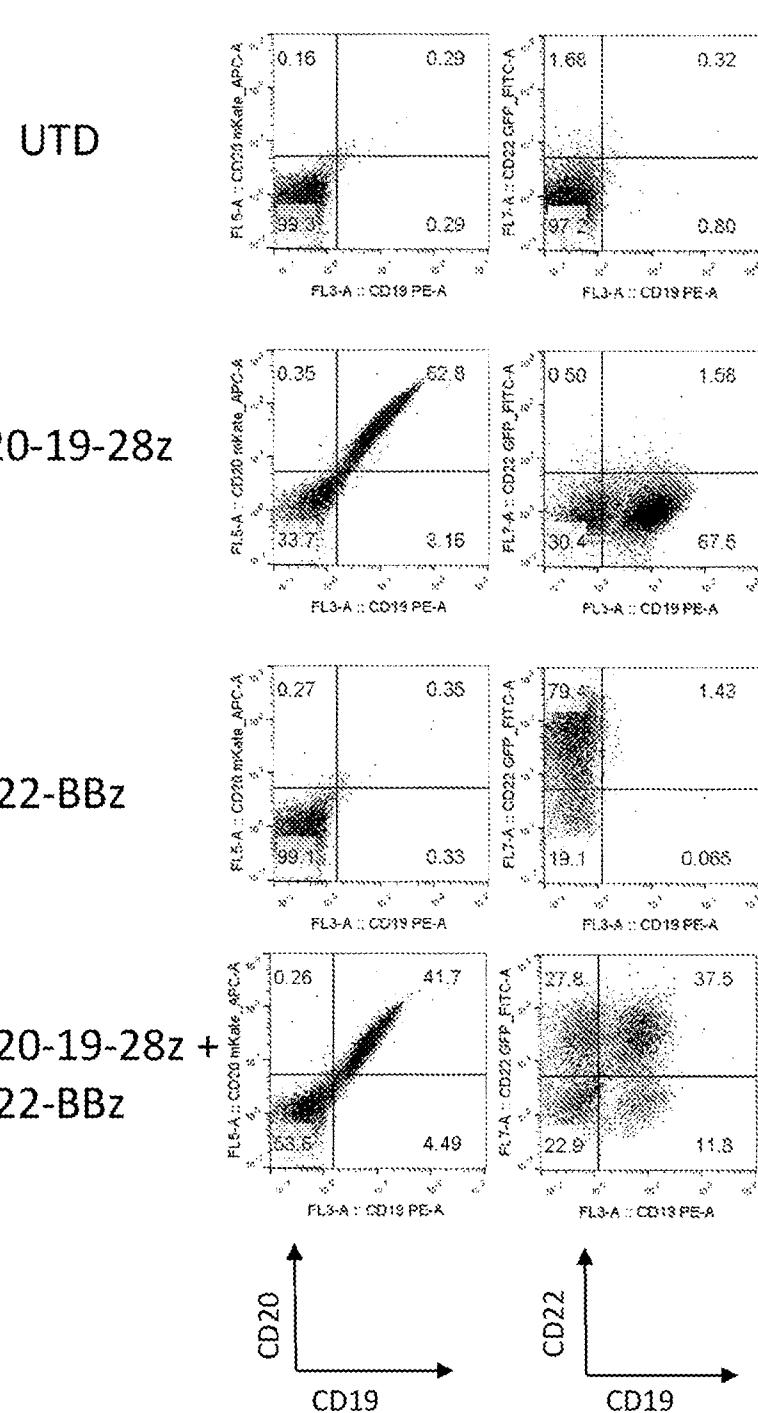


FIG. 6

**FIG. 7**

ES 2 981 703 T3

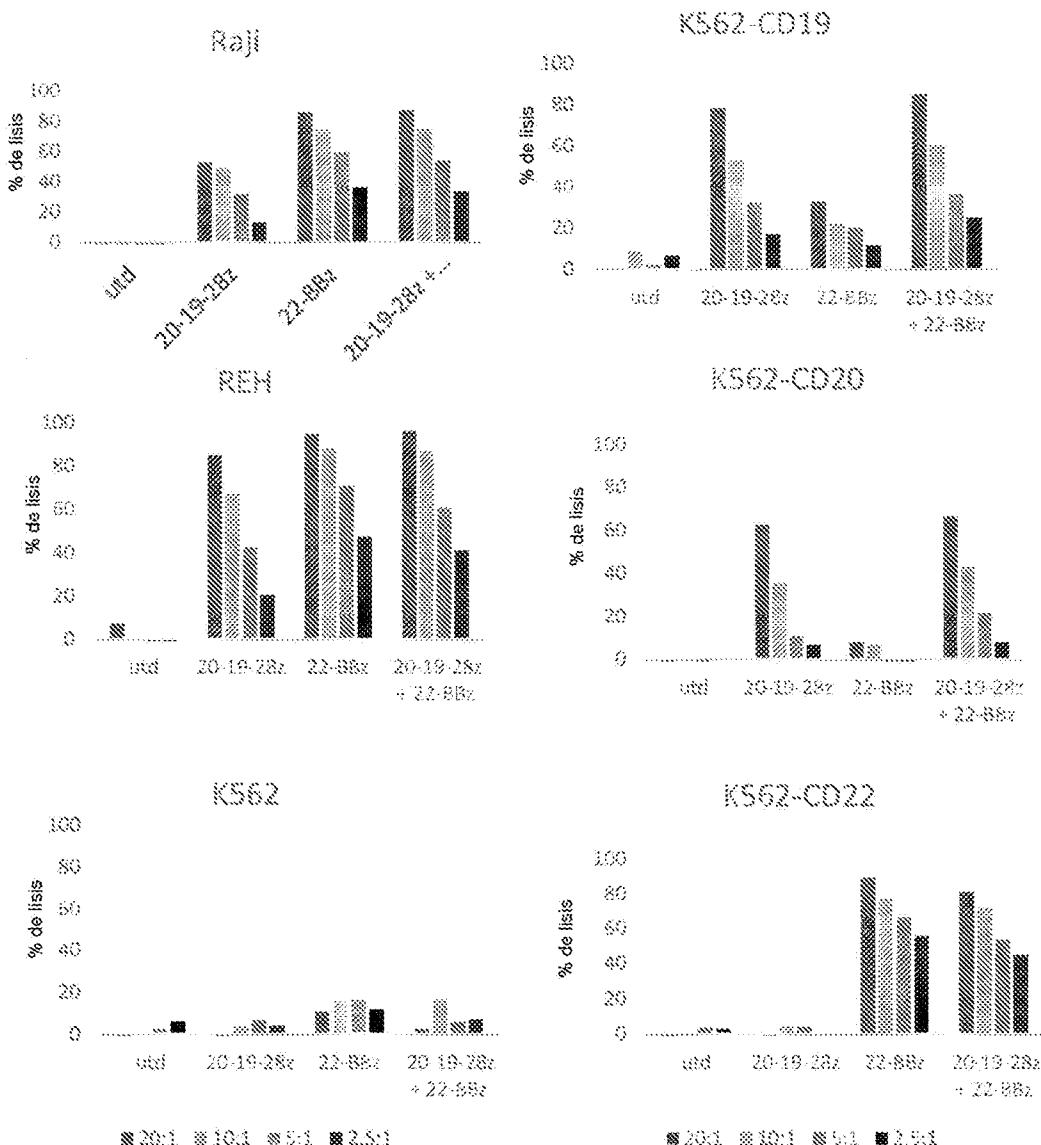


FIG. 8

Método de producción de DuoCAR

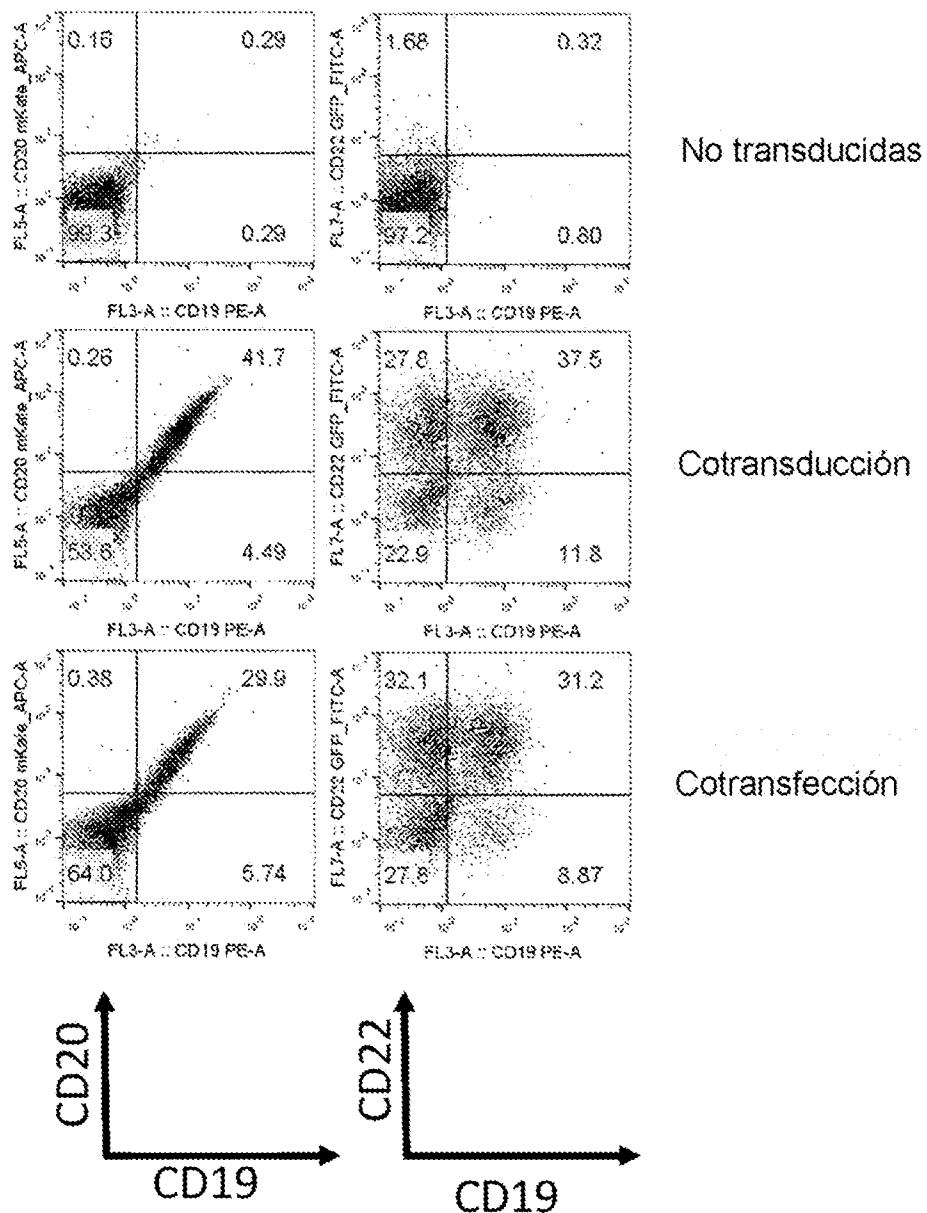


FIG. 9