

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 015 267**

(51) Int. Cl.:

<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)	<b>A61P 13/08</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/715</b>	(2006.01)	<b>A61P 13/12</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/725</b>	(2006.01)	<b>A61P 15/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/32</b>	(2006.01)	<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)	<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 19/00</b>	(2006.01)	<b>A61P 35/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/04</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/18</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)		

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 20201497 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025 EP 3824905**

(54) Título: **Método y composiciones para inmunoterapia celular**

(30) Prioridad:

**20.08.2012 US 201261691117 P**

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

**30.04.2025**

(73) Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER CENTER (50.00%)**  
**1100 Fairview Avenue North**  
**Seattle, WA 98109, US y**  
**SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL, DBA**  
**SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE**  
**(50.00%)**

(72) Inventor/es:

**RIDDELL, STANLEY R.;**  
**HUDECEK, MICHAEL y**  
**JENSEN, MICHAEL**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

### Observaciones:

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

**ES 3 015 267 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**

Método y composiciones para inmunoterapia celular

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la biomedicina y específicamente a métodos útiles para terapia contra el cáncer. En particular, realizaciones de la invención se refieren a métodos y a composiciones para llevar a cabo inmunoterapia celular que comprende células T modificadas con receptores de direccionamiento tumoral.

**10 Antecedentes de la invención**

La transferencia adoptiva de linfocitos T humanos que se modifican por ingeniería mediante transferencia génica para expresar receptores de antígenos químéricos (receptores químéricos) específicos para moléculas de superficie expresadas en células tumorales tiene la posibilidad de tratar eficazmente neoplasias malignas avanzadas. Los receptores químéricos son receptores sintéticos que incluyen un dominio de unión a ligando extracelular, lo más habitualmente un fragmento variable de cadena sencilla de un anticuerpo monoclonal (scFv) unido a componentes de señalización intracelulares, lo más habitualmente CD3ζ solo o en combinación con uno o más dominios coestimuladores. Gran parte de la investigación en el diseño de receptores químéricos se ha centrado en definir scFv y otros elementos de unión a ligando que seleccionan como diana células malignas sin provocar toxicidad grave a tejidos normales esenciales, y en definir la composición óptima de módulos de señalización intracelulares para activar funciones efectoras de células T. Sin embargo, no queda claro si las variaciones en el diseño de receptores químéricos que median en una función *in vitro* superior se traducirán de manera reproducible en una actividad terapéutica *in vivo* mejorada en aplicaciones clínicas de células T modificadas con receptor químérico.

**25** Existe una necesidad de identificar métodos para determinar elementos de diseño de receptores químéricos que son importantes para la actividad terapéutica y poblaciones celulares para modificar genéticamente y transferir de manera adoptiva que proporcionen una supervivencia y eficacia potenciadas *in vivo*.

**30 Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un polipéptido de receptor químérico que comprende:

**35** a) un dominio de unión a ligando, en el que el dominio de unión a ligando se une a un ligando, en el que el dominio de unión a ligando es un fragmento variable de cadena sencilla que se une específicamente a CD19 y en el que el dominio de unión a ligando comprende la secuencia de aminoácidos:

DIQMTQTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL  
TISNLEQEDIATYFCQQGNLPTYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVT  
40 CTVSGVSLPDYGVSIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC  
AKHYYYGGSYAMDYWGQQGTSVTVSS;

**45** b) un espaciador de una longitud que es específica para el ligando, en el que el espaciador proporciona proliferación de células T y/o producción de citocinas aumentadas en respuesta al ligando en comparación con un receptor químérico de referencia, en el que el espaciador tiene una longitud de 15 aminoácidos o menos y comprende la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPC;

c) un dominio transmembrana, en el que el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos **MFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFHFWV** de un dominio transmembrana de CD28; y

**50** d) un dominio de señalización intracelular, en el que el dominio de señalización intracelular comprende el dominio de señalización de CD3 zeta y el dominio de señalización de 4-1BB, en el que el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos:

**55** KRGKKLLYIFKQPMPRVQTTQEEDGCSCRPEEEEGCCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR  
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKD  
TYDALHMQALPPR.

**60** La invención también proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de receptor químérico aislado que codifica para un polipéptido de receptor químérico de la invención, en el que el vector de expresión es un vector de virus del simio 40, un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado (VAA), un vector lentiviral o un vector retroviral.

La invención también proporciona una célula huésped que comprende un polipéptido de receptor químérico de la

invención.

La invención también proporciona una composición que comprende una célula huésped de la invención en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 La invención también proporciona una célula huésped de la invención o una composición de la invención para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 10 En algunos de los casos a continuación se describen realizaciones de la invención.
- 15 Un caso se refiere a métodos y a composiciones para conferir y/o aumentar respuestas inmunitarias mediadas mediante inmunoterapia celular, tal como transfiriendo de manera adoptiva subconjuntos específicos de tumor, genéticamente modificados, de células T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> solas o en combinación. En otros casos descritos en el presente documento son ácidos nucleicos de receptor químérico y vectores y células huésped que incluyen tales ácidos nucleicos. La secuencia de ácido nucleico que codifica para el receptor químérico une entre sí varios componentes modulares que pueden escindirse y sustituirse por otros componentes con el fin de personalizar el receptor químérico para una activación y reconocimiento de células T eficientes de una molécula diana específica o un epítopo en la molécula diana.
- 20 En casos, un ácido nucleico de receptor químérico comprende un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando, en el que el ligando es una molécula expresada en células malignas o infectadas, un polinucleótido que codifica para un espaciador de polipéptido en el que el espaciador de polipéptido tiene aproximadamente 200 aminoácidos o menos, un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana; y un polinucleótido que codifica para dominios de señalización intracelulares. En casos, el espaciador de polipéptido comprende una región bisagra de IgG4 modificada que contiene una secuencia de aminoácidos X<sub>1</sub>PPX<sub>2</sub>P que puede unirse a otras secuencias de aminoácidos incluyendo, pero sin limitarse a, las secuencias CH2 y CH3 o sólo CH3 del Fc de Ig. Se ha encontrado sorprendentemente que la longitud de la región espaciadora que se supone que no tiene capacidad de señalización afecta a la eficacia *in vivo* de las células T modificadas para expresar el receptor químérico y necesita personalizarse para moléculas diana individuales para un reconocimiento de células diana o tumorales óptimo.
- 25
- 30 En otros casos descritos en el presente documento es un ácido nucleico de receptor químérico aislado que comprende: un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando, en el que el ligando es un antígeno específico de tumor, antígeno viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana que es adecuada para mediar en el reconocimiento y la eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica para un espaciador de polipéptido en el que el espaciador de polipéptido tiene una longitud personalizada que es específica para cada ligando seleccionado como diana, en el que el espaciador proporciona proliferación de células T y/o producción de citocinas potenciadas en comparación con un receptor químérico de referencia; un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana; y un polinucleótido que codifica para uno o más dominios de señalización intracelulares. En casos, se emplea un espaciador largo si el epítopo en el ligando diana está en una posición proximal a la membrana y se emplea un espaciador corto si el epítopo en el ligando diana está en una posición distal a la membrana. Algunos casos incluyen vectores de expresión y células huésped que comprenden el receptor químérico aislado tal como se describe en el presente documento.
- 35
- 40
- 45 En otros casos descritos en el presente documento es un polipéptido de receptor químérico que comprende un dominio de unión a ligando, en el que el ligando es un antígeno específico de tumor, antígeno viral o cualquier otra molécula que se expresa en una población de células diana y puede seleccionarse como diana para mediar en el reconocimiento y la eliminación por linfocitos; un espaciador de polipéptido en el que el espaciador de polipéptido tiene aproximadamente 10-229 aminoácidos; un dominio transmembrana; y uno o más dominios de señalización intracelulares. En casos, el espaciador de polipéptido comprende una región bisagra de IgG modificada que contiene la secuencia de aminoácidos X<sub>1</sub>PPX<sub>2</sub>P.
- 50
- 55 En otros casos descritos en el presente documento son composiciones para conferir y/o aumentar las respuestas inmunitarias mediadas mediante inmunoterapia celular, tal como transfiriendo de manera adoptiva un subconjunto específico de tumor de células T CD4<sup>+</sup> genéticamente modificadas específicas, en el que las células T CD4<sup>+</sup> confieren y/o aumentan la capacidad de células T CD8<sup>+</sup> para mantener la reactividad antitumoral y aumentar y/o maximizar la proliferación específica de tumor. En algunos casos, las células CD4<sup>+</sup> se modifican genéticamente para expresar un ácido nucleico de receptor químérico y/o polipéptido de receptor químérico tal como se describe en el presente documento.
- 60 En otros casos descritos en el presente documento son composiciones para conferir y/o aumentar respuestas inmunitarias mediadas mediante inmunoterapia celular, tal como transfiriendo de manera adoptiva un subconjunto específico de tumor de células T CD8<sup>+</sup> genéticamente modificadas específicas. En casos, las células CD8<sup>+</sup> expresan un ácido nucleico de receptor químérico y/o polipéptido de receptor químérico tal como se describe en el presente documento.
- 65 En otro caso, una composición de inmunoterapia celular adoptiva que tiene una preparación celular de linfocitos T

citotóxicos CD8<sup>+</sup> genéticamente modificados para conferir y/o aumentar respuestas inmunitarias, en la que la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende células T CD8<sup>+</sup> que expresan un receptor químérico que comprende un dominio de unión a ligando para un ligando asociado con la enfermedad o el trastorno, una región espaciadora personalizada, un dominio transmembrana; y un dominio de señalización intracelular de una célula T u

5 otros receptores, tales como un dominio coestimulador, y/o una preparación celular de linfocitos T cooperadores genéticamente modificados, en la que la preparación celular de linfocitos T cooperadores tiene células T CD4<sup>+</sup> que expresan un receptor químérico que comprende un dominio variable de anticuerpo específico para el ligando asociado con la enfermedad o el trastorno, una región espaciadora personalizada, un dominio transmembrana; y uno o más dominios de señalización intracelulares.

10 En un caso descrito en el presente documento es un método de realización de inmunoterapia celular en un sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno administrando al sujeto una preparación celular de linfocitos T citotóxicos genéticamente modificados que proporciona una respuesta inmunitaria celular, en el que la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende células T CD8<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un polinucleótido

15 que codifica para un dominio de unión a ligando, en el que el ligando es un antígeno específico de tumor, antígeno viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana que es adecuada para mediar en el reconocimiento y la eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica para un espaciador de polipéptido en el que el espaciador de polipéptido tiene una longitud personalizada que es específica para cada ligando seleccionado como diana, en el que el espaciador proporciona proliferación de células T y/o producción de citocinas potenciadas en

20 comparación con un receptor químérico de referencia; un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana; y un polinucleótido que codifica para uno o más dominios de señalización intracelulares. En casos, el dominio de unión a ligando es un dominio variable de anticuerpo extracelular específico para un ligando asociado con la enfermedad o el trastorno. Un caso incluye una preparación celular de linfocitos T cooperadores genéticamente modificados en la

25 que la preparación celular de linfocitos T cooperadores comprende células T CD4<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando, en la que el ligando es un antígeno específico de tumor, antígeno viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana que es adecuada para mediar en el reconocimiento y la eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica para un espaciador de polipéptido en el que el espaciador de polipéptido tiene una longitud personalizada que es específica para cada ligando seleccionado como diana, en el que el espaciador proporciona proliferación de células T y/o

30 producción de citocinas potenciadas en comparación con un receptor químérico de referencia; un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana; y un polinucleótido que codifica para uno o más dominios de señalización intracelulares. En casos, la población de células CD8<sup>+</sup> genéticamente modificadas y CD4<sup>+</sup> genéticamente modificadas se administran conjuntamente. En casos, las células T son células T autólogas o alogénicas.

35 Son posibles diversas modificaciones del método anterior. Por ejemplo, el receptor químérico que se expresa por la célula T CD4<sup>+</sup> y la célula T CD8<sup>+</sup> puede ser el mismo o diferente.

En otro caso descrito en el presente documento es un método de preparación de una composición de inmunoterapia adoptiva obteniendo una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> específicos de tumor modificados con receptor químérico que provoca una respuesta inmunitaria celular y expresa un receptor químérico reactivo frente a antígeno, en el que la preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificados comprende células T CD8<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio de unión a ligando, en el que el ligando es un antígeno específico de tumor, antígeno viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana que es adecuada para mediar en el reconocimiento y la eliminación por un linfocito; un espaciador de polipéptido en el que el espaciador de

45 polipéptido tiene una longitud personalizada que es específica para cada ligando seleccionado como diana, en el que el espaciador proporciona proliferación de células T y/o producción de citocinas potenciadas en comparación con un receptor químérico de referencia; un dominio transmembrana; y uno o más dominios de señalización intracelulares; y/u obteniendo una célula T cooperadora T CD4<sup>+</sup> virgen o de memoria modificada en el que la preparación celular de linfocitos T cooperadores modificados comprende células CD4<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un

50 dominio de unión a ligando, en el que el ligando es un antígeno específico de tumor, antígeno viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana que es adecuada para mediar en el reconocimiento y la eliminación por un linfocito; un espaciador de polipéptido en el que el espaciador de polipéptido tiene una longitud personalizada que es específica para cada ligando seleccionado como diana, en el que el espaciador proporciona proliferación de células T y/o producción de citocinas potenciadas en comparación con un receptor químérico de referencia; un dominio transmembrana; y uno o más dominios de señalización intracelulares.

Estos y otros casos se describen adicionalmente en la memoria descriptiva, dibujos y reivindicaciones adjuntos.

#### Breve descripción de los dibujos

60 **Figura 1: biblioteca de secuencias de espaciador.** Se construyó una biblioteca de plásmidos que contiene secuencias de ADN con codones optimizados que codifican para componentes extracelulares incluyendo la bisagra de IgG4 sola, bisagra de IgG4 unida a dominios CH2 y CH3, o bisagra de IgG4 unida al dominio CH3. Cualquier secuencia de scFV (VH y VL) puede clonarse en 5' con respecto a las secuencias que codifican para esta biblioteca de dominios espaciadores variables. Los dominios espaciadores están unidos a su vez a dominios transmembrana de CD28 y de señalización intracelular y a CD3zeta. Una secuencia T2A en el vector separa el receptor químérico

de un marcador seleccionable que codifica para un receptor de factor de crecimiento epidérmico humano truncado (tEGFR).

**Figura 2: citotoxicidad *in vitro*, producción de citocinas y proliferación de células T modificadas para expresar receptores quiméricos de ROR1 de 2A2 con longitud de espaciador modificada.** (A) Fenotipo de líneas celulares derivadas de  $T_{CM}$  CD8<sup>+</sup> purificadas modificadas con cada uno de los receptores quiméricos de ROR1 de 2A2 con dominio espaciador largo, intermedio y corto. La tinción con anticuerpo anti-F(ab) que se une a un epítopo en el scFV de 2A2 muestra expresión en superficie de receptores quiméricos de ROR1 con espaciador de longitud completa o truncado. (B) Actividad citolítica de células T que expresan los diversos receptores quiméricos de ROR1 de 2A2 con espaciador largo (•), intermedio (▲) y corto (◆), o un vector lentiviral de control de tEGFR frente a ROR1<sup>+</sup> (x) y células diana de control. El diagrama de barras resume los datos de citotoxicidad de 3 experimentos independientes ( $E:T = 30:1$ ) normalizados con respecto a la actividad citolítica por receptor quimérico de ROR1 de 2A2 “largo” = 1, y se analizaron mediante prueba de la t de Student. (C) Se usó dilución de colorante de CFSE para medir la proliferación de células T de receptor quimérico de ROR1 de 2A2 y de control de tEGFR, 72 horas después de la estimulación con Raji/ROR1 (panel izquierdo) y células de LLC primaria (panel derecho) sin adición de citocinas exógenas. Para el análisis, se combinaron pocillos por triplicado y se analizó la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> vivas (PI<sup>-</sup>). Los números encima de cada histograma indican el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto en proliferación, y la fracción de células T en cada puerta que experimentaron  $\geq 4/3/2/1$  divisiones celulares se proporciona junto a cada gráfico. (D) Ensayo de citocinas multiplexado de sobrenadantes obtenidos después de 24 horas a partir de cultivos conjuntos por triplicado de  $5 \times 10^4$  células T que expresan los diversos receptores quiméricos de ROR1 de 2A2 con Raji/ROR1 y células de LLC primaria. Se normalizaron los datos de citocinas multiplexados de 3 experimentos independientes (liberación de citocina por receptor quimérico de ROR1 de 2A2 “largo” = 1) y se analizaron mediante la prueba de la t de Student (diagrama de barras a la derecha).

**Figura 3: el receptor quimérico de R11 requiere un espaciador largo para el reconocimiento de células tumorales ROR1<sup>+</sup>.** Las secuencias que codifican para el scFV a partir del anticuerpo monoclonal R11 que es específico para un epítopo en el dominio Kringle proximal a la membrana del receptor de tirosina cinasa huérfano ROR1 se clonaron en el sentido de 5' de secuencias sólo de bisagra de IgG4 (corta), bisagra de IgG4/CH3 (intermedia) y bisagra de IgG4/CH2/CH3 en la presente biblioteca de receptores quiméricos que contenía los dominios coestimuladores de 4-1BB y se prepararon como vectores lentivirales. A). Se transdijeron células T CD8<sup>+</sup> humanas y se determinó la eficiencia de transducción con cada uno de los receptores quiméricos corto, intermedio y largo mediante tinción para detectar el marcador de tEGFR. B). Se sometieron a ensayo células T transducidas que expresaban el espaciador corto (parte superior), intermedio (centro) y largo (parte inferior) para determinar la lisis de células de leucemia K562 solas o transfectadas para expresar ROR1. Sólo las células T que expresaban el receptor quimérico de espaciador largo destruyeron eficazmente las células K562 ROR1<sup>+</sup>. C). Se marcaron células T transducidas que expresaban el espaciador corto (parte superior), intermedio (centro) y largo (parte inferior) con CFSE, se estimularon con células K562 que expresaban ROR1 o CD19 (control) y se sometieron a ensayo para determinar la proliferación celular a lo largo de 72 horas. Las células T que expresaban el receptor quimérico con espaciador largo proliferaron específicamente frente a las células K562 ROR1<sup>+</sup>. D). Se estimularon células T transducidas que expresaban el espaciador corto (parte superior), intermedio (centro) y largo (parte inferior) con células de linfoma Raji y células K562 que expresaban ROR1 o CD19 (control) y se sometieron a ensayo para determinar la secreción de interferón gamma en el sobrenadante a lo largo de 24 horas. Las células T que expresaban el receptor quimérico con espaciador largo proliferaron y produjeron los niveles más altos de interferón gamma en respuesta a células diana positivas para ROR1.

**Figura 4: diseño de receptores quiméricos de ROR1 con longitud de espaciador modificada y derivados a partir del scFV de 2A2 y R12 con diferente afinidad.** (A) Diseño de insertos de transgenes lentivirales que codifican para un panel de receptores quiméricos de ROR1 que contienen el scFV de 2A2, un espaciador derivado de Fc de IgG4 de “bisagra-CH2-CH3” (espaciador largo, 229 AA), “bisagra-CH3” (intermedio, 119 AA) o sólo “bisagra” (corto, 12 AA), y un módulo de señalización con CD3ζ y CD28. Cada casete de receptor quimérico contiene un marcador de EGFR truncado codificado en el sentido de 3' de un elemento de T2A. (B) Insertos de transgenes lentivirales que codifican para receptores quiméricos específicos de ROR1 derivados a partir del scFV de R12 y 2A2 con espaciador de “bisagra” de Fc de IgG4 corto (12 AA) y un módulo de señalización que contiene CD28 o 4-1BB y CD3ζ respectivamente (total: 4 constructos).

**Figura 5: reactividad antitumoral de células T modificadas con receptores quiméricos de ROR1 derivados a partir del AcM R12 con afinidad superior a 2A2.** (A) Expresión de tEGFR en líneas de células T derivadas de  $T_{CM}$  CD8<sup>+</sup> policlonales purificadas modificadas con cada uno de los receptores quiméricos de ROR1 de R12 y 2A2 con espaciador de “bisagra” de Fc de IgG4 corto y dominio coestimulador de CD28 o 4-1BB. (B) Citotoxicidad frente a células diana ROR1<sup>+</sup> y de control por células T que expresan R12 (28-▲; 4-1BB-Δ) y receptores quiméricos de ROR1 de 2A2 (28-●; 4-1BB-○) o un vector de control de tEGFR (x). (C) Ensayo de citocinas multiplexado de sobrenadantes obtenidos después de 24 horas a partir de cultivos conjuntos de  $5 \times 10^4$  células T que expresan los diversos receptores quiméricos de ROR1 con células tumorales Raji/ROR1. Los diagramas de barras en el centro/a la derecha muestran datos multiplexados normalizados de 3 experimentos independientes (liberación de citocina por receptor quimérico de ROR1, 2A2 = 1) analizados mediante prueba de la t de Student. (D) La proliferación de células T de receptor quimérico de ROR1 y células T de control de tEGFR 72 horas después de la estimulación con células Raji/ROR1 y sin adición de citocinas exógenas se evaluó mediante dilución de colorante de CFSE. Los números encima de cada histograma indican el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto en proliferación, y la fracción de células T en cada puerta que experimentaron  $\geq 4/3/2/1$  divisiones celulares se

proporciona encima de cada gráfico.

**Figura 6: análisis de producción de citocinas y proliferación de líneas de células T CD4<sup>+</sup> modificadas con un receptor químérico de ROR1 derivado a partir de AcM R12 con afinidad superior a 2A2. (A-B)** Los receptores químéricos de ROR1 de 2A2 y R12 tenían el espaciador corto y un dominio coestimulador de CD28. (A) Análisis de citocinas mutiplexado a partir de sobrenadantes obtenidos 24 horas después de la estimulación de 5x10<sup>4</sup> células T CD4<sup>+</sup> que expresaban el receptor químérico de ROR1 de 2A2 y R12 con células tumorales Raji/ROR1. (B) La proliferación de células T CD4<sup>+</sup> de receptor químérico de ROR1 de R12 y 2A2 y células T de control de tEGFR 72 horas después de la estimulación con células Raji/ROR1 y sin adición de citocinas exógenas se evaluó mediante dilución de colorante de CFSE. Los números encima de cada histograma indican el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto en proliferación, y la fracción de células T en cada puerta que experimentaron ≥5/4/3/2/1 divisiones celulares se proporciona encima de los histogramas.

**Figura 7: reconocimiento de LLC primaria por células T modificadas con receptores químéricos de ROR1 de 2A2 y R12 con espaciador corto óptimo y dominio coestimulador de 4-1BB o con un receptor químérico específico de CD19. (A)** Expresión de ROR1/CD19 en LLC primaria, y CD80/86 en LLC primaria y células tumorales Raji/ROR1 (gráficos de puntos negros) que pueden acoplarse a CD28 en células T de receptor químérico (histogramas blancos). La tinción con AcM de control de isotipo coincidente se muestra como gráficos/histogramas de puntos grises. (B) Actividad citolítica de células T que expresan el receptor químérico de ROR1 de 2A2 (●) y R12 (■), un receptor químérico específico de CD19 (▲) y células T modificadas con un vector de control de tEGFR (x) frente a LLC primaria (diagrama de la izquierda) y células B normales (diagrama de la derecha) analizada mediante ensayo de liberación de cromo. Los datos de citotoxicidad frente a LLC primaria de 4 experimentos independientes (E:T = 30:1) se normalizaron (actividad citolítica por receptor químérico de ROR1, 2A2 = 1) y se analizaron mediante prueba de la t de Student (diagrama de barras). (C) Análisis de citocinas mutiplexado después de una estimulación de 24 horas de 5x10<sup>4</sup> células T de receptor químérico con células de LLC primaria. La liberación de citocina de células T de receptor químérico no estimuladas estaba por debajo de 3,6 pg/ml (límite de detección) (diagrama de barras de la izquierda). ELISA para determinar la producción de IFN-γ mediante 5x10<sup>4</sup> células T de receptor químérico de ROR1 de 2A2 y R12 después de un cultivo conjunto de 24 horas con LLC primaria. La D.O. de 1 corresponde a aproximadamente 250 pg/ml (diagrama de barras a la derecha). (D) Proliferación de células T CD8<sup>+</sup> modificadas con el receptor químérico de ROR1 de 2A2, ROR1 de R12 y CD19, 72 horas después de la estimulación con células de LLC primaria. Los números encima de cada histograma indican el número de divisiones celulares, y la fracción de células T en cada puerta que experimentaron ≥3/2/1 divisiones celulares se proporciona junto a cada gráfico.

**Figura 8: la función de células T CD8<sup>+</sup> modificadas con receptor químérico de ROR1 y receptor químérico de CD19 contra LLC primaria se aumenta por células T cooperadoras modificadas con receptor químérico. (A)** ELISA para determinar la producción de IL-2 a partir de cultivos conjuntos por triplicado de 5x10<sup>4</sup> células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> que expresan el receptor químérico de ROR1 de R12 y CD19 respectivamente, incubadas con LLC primaria durante 24 horas. La D.O. de 1 corresponde a aproximadamente 800 pg/ml. (B) La proliferación de células T CD8<sup>+</sup> modificadas con receptor químérico en respuesta a LLC primaria se potencia mediante adición de células T CD4<sup>+</sup> modificadas con receptor químérico. Se cultivaron conjuntamente células T CD8<sup>+</sup> marcadas con CFSE que expresaban el receptor químérico de ROR1 de 2A2, ROR1 de R12 y CD19, respectivamente, con células tumorales y con células T CD4<sup>+</sup> transducidas con receptor químérico de ROR1 de 2A2, ROR1 de R12 y CD19 o no transducidas de control (CD8<sup>+</sup>:CD4<sup>+</sup> = 1:1). Se analizó la proliferación del subconjunto de CD8<sup>+</sup> 72 horas después de la estimulación. Los números encima de cada histograma indican el número de divisiones celulares, y la fracción de células T en cada puerta que experimentaron ≥3/2/1 divisiones celulares se proporciona encima de cada gráfico.

**Figura 9: eficacia antitumoral *in vivo* de células T de receptor químérico de ROR1 de 2A2, ROR1 de R12 y CD19.** Se inocularon cohortes de ratones con 0,5x10<sup>6</sup> MCL JeKo-1/ffluc mediante inyección en la vena de la cola, y se administraron 5x10<sup>6</sup> células T de receptor químérico de ROR1 de 2A2, ROR1 de R12 o CD19, o células T que expresaban un vector de control de tEGFR 7 días después de la inoculación de tumor. Todos los constructos de receptor químérico tenían el espaciador corto de "sólo bisagra" de IgG4 y un dominio coestimulador de 4-1BB. (A, B) Obtención de imágenes por bioluminiscencia en serie de tumor en cohortes de ratones tratados con células T que expresan el receptor químérico de ROR1 de 2A2 (▼), el receptor químérico de ROR1 de R12 de alta afinidad (■), un receptor químérico específico de CD19 (▲), con células T transducidas con tEGFR solo (●), y ratones sin tratar. La obtención de imágenes por bioluminiscencia mostró manifestaciones tumorales en la médula ósea y el tórax y, por tanto, se midió la intensidad de señal en regiones de interés que abarcaban todo el cuerpo y el tórax de cada ratón individual. (C) Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia en grupos de tratamiento individual y de control. Se realizaron análisis estadísticos usando la prueba de los rangos logarítmicos. Los datos mostrados en A-C son representativos de resultados obtenidos en 2 experimentos independientes. (D) Proliferación de células T de receptor químérico de ROR1 de 2A2, ROR1 de R12 y CD19 *in vivo*. Ratones NSG/JeKo-1 portadores de tumor recibieron una única dosis de 5x10<sup>6</sup> células T de receptor químérico de ROR1 de 2A2, ROR1 de R12 o CD19 marcadas con CFSE en el día 7 después de la inoculación de tumor, y 72 h después se extrajeron sangre periférica, médula ósea y bazo de cada ratón individual. Se analizó la frecuencia y proliferación de células T vivas (PI), CD45<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> tEGFR<sup>+</sup>. La frecuencia de células T de receptor químérico de ROR1 de 2A2, ROR1 de R12 y CD19 respectivamente se proporciona a la izquierda de cada histograma como porcentaje de células vivas y la fracción de células T que experimentaron ≥4/3/2/1 divisiones celulares se proporciona encima de cada gráfico.

**Figura 10: expresión de ligandos de ROR1 y NKG2D en líneas celulares de cáncer epitelial. (A)** Expresión de ROR1 en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 y 468, y las líneas celulares de cáncer renal FARP, TREP y RWL (histogramas negros). La tinción con anticuerpo de control de isotipo coincidente

se muestra como histogramas grises. **(B)** Expresión de CD80/86 y los ligandos de NKG2D, MICA/B, en células tumorales MDA-MB-231 y Raji/ROR1, y nK2D (CD314) en células T de receptor quimérico de ROR1 de 2A2 y R12. La tinción con AcM de control de isótipo coincidente se muestra como gráficos de puntos/histogramas grises.

**Figura 11: las células T modificadas con receptor quimérico de ROR1 reconocen células tumorales epiteliales ROR1<sup>+</sup> *in vitro*.** (A) Ensayo de liberación de cromo para evaluar la actividad citolítica de células T modificadas con receptor quimérico de ROR1 de R12 (espaciador corto/dominio coestimulador de 4-1BB, símbolos negros) y células T de control de tEGFR (símbolos blancos) contra líneas celulares de cáncer renal y cáncer de mama ROR1<sup>+</sup>. (A-D) Los receptores químicos de ROR1 de 2A2 y R12 tenían el espaciador corto óptimo y un dominio coestimulador de 4-1BB. (B) Análisis de citocinas multiplexado después de la estimulación de células T que expresan el receptor quimérico de ROR1 de 2A2 y R12 con células tumorales MDA-MB-231 y Raji/ROR1. (C) Proliferación de células T CD8<sup>+</sup> modificadas con el receptor quimérico de ROR1 de 2A2 y R12 72 horas después de la estimulación con células tumorales MDA-MB-231. Para el análisis, se combinaron pocillos por triplicado y se analizó la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> vivas (PI<sup>+</sup>). Los números encima de cada histograma indican el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto en proliferación, y la fracción de células T en cada puerta que experimentaron ≥4/3/2/1 divisiones celulares se proporciona junto a cada histograma. (D) ELISA para determinar la producción de IL-2 por células T de receptor quimérico de ROR1 de R12 después de un cultivo conjunto de 24 horas con MDA-MB-231 en medio simple, y tras la adición de un cóctel de anticuerpos que bloqueaba la ruta de NKG2D [anticuerpos anti-NKG2D (clon 1D11), anti-MICA/B (clon 6D4) y anti-ULBP] o AcM de control de isótipo coincidente. La D.O. de 0,6 corresponde a aproximadamente 1900 pg/ml.

**Figura 12: efecto de la longitud de espaciador extracelular sobre el reconocimiento y la activación de lisis de células tumorales por células T humanas CD8<sup>+</sup> que expresan un receptor quimérico específico de HER2.** A.) Representación de la ubicación de epítopo de Fab de Herceptin en epítopo proximal a la membrana de células tumorales en HER2 humano, B.) formatos estructurales de variantes de longitud de espaciador de CAR de scFv de Herceptin como polipéptidos unidos a T2A con la proteína transmembrana de marcador carboxil-EGFRt, C.) detección por inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de variante de Herceptin-CAR con espaciador corto, medio y largo en CTL CD8<sup>+</sup> humanos, D.) detección por citometría de flujo de EGFRt mediante CTL CD8<sup>+</sup> humanos transducidos con variantes de CAR de Herceptin, después purificados de manera inmunomagnética mediante Herceptin-biotina, microperlas anti-biotina, E.) función citolítica diferenciada por células T transducidas para expresar las variantes de CAR de Herceptin (corto - S; medio - M; y largo - L) contra líneas celulares de meduloblastoma humanas HER2<sup>+</sup> Med411FH y D283 (D341 es una línea celular de meduloblastoma de control HER2<sup>-</sup>, los gráficos de flujo insertados son líneas diana tumorales teñidas con AcM específicos anti-HER2). Verde = IgG4 completa (Espaciador largo, ▼), azul = bisagra de IgG4:CH3 (espaciador medio; ▲), rojo = sólo bisagra de IgG4 (espaciador corto; ■).

**Figura 13: vectores de receptor quimérico de CD19 y generación de células T de receptor quimérico de CD19.** (A) Diseño de insertos de transgenes lentivirales que codifican para un panel de receptores químicos específicos de CD19 que difieren en cuanto a la longitud de espaciador extracelular y la coestimulación intracelular. Cada receptor quimérico codificaba para el fragmento variable de cadena sencilla específica de CD19 derivado a partir del AcM FMC63 en una orientación VL-VH, un dominio espaciador derivado de IgG4 de bisagra-CH2-CH3 (espaciador largo, 229 AA) o sólo bisagra (espaciador corto, 12 AA), y un módulo de señalización que contenía CD3ζ con CD28 o 4-1BB solos o en tandem. Cada casete de receptor quimérico contiene un marcador de EGFR truncado codificado en el sentido de 3' de un elemento de 2A escindible. (B, C) Se prepararon líneas de células T policlonales modificadas con cada uno de los constructos de receptor quimérico de CD19 a partir de células T de memoria central (T<sub>CM</sub>) CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> purificadas de donantes normales. Tras la transducción lentiviral, se purificaron las células T positivas para transgén en cada línea celular usando el marcador de tEGFR y se expandieron para experimentos *in vitro* e *in vivo*. (D) La MFI tras la tinción para el marcador de tEGFR muestra expresión transgénica equivalente en células T modificadas con cada uno de los receptores químicos de CD19.

**Figura 14: citotoxicidad *in vitro*, producción de citocinas y proliferación de células T modificadas con distintos receptores químicos de CD19.** (A) Actividad citolítica de células T que expresan los diversos receptores químicos de CD19 contra células diana CD19<sup>+</sup> y de control. (B) Ensayo de citocinas multiplexado de sobrenadantes obtenidos después de 24 horas a partir de cultivos conjuntos por triplicado de células T que expresan los diversos receptores químicos de CD19 y células K562 transfectadas con CD19, y células Raji CD19<sup>+</sup>. (C) Comparación de la producción de citocinas por células T que expresan los diversos receptores químicos de CD19. Los datos de citocinas multiplexados a partir de 6 experimentos independientes se normalizaron (liberación de citocina mediante CTL de "corto/CD28" de receptor quimérico de CD19 = 1) y se analizaron mediante prueba de la t de Student. (D) Se usó la dilución de colorante de CFSE para medir la proliferación de células T de receptor quimérico de CD19 72 horas después de la estimulación con K562/CD19 (panel superior) y células tumorales Raji CD19<sup>+</sup> (panel inferior) sin adición de citocinas exógenas. Para el análisis, se combinaron pocillos por triplicado y se analizó la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> vivas (PI<sup>+</sup>). Los números encima de cada histograma indican el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto en proliferación, y la fracción de células T en cada puerta que experimentaron ≥4/3/2/1 divisiones celulares se proporciona en la parte superior izquierda de cada gráfico. (E) Se realizó la tinción con PI al final de un cultivo conjunto de 72 horas de células T que expresaban los diversos receptores químicos de CD19 con células tumorales Raji. El porcentaje de células PI<sup>+</sup> dentro de la línea de células T de receptor quimérico (CD3<sup>+</sup>) se proporciona en cada histograma.

**Figura 15: las células T de receptor quimérico de CD19 con un dominio espaciador extracelular corto erradicán los tumores de Raji en ratones NOD/SCID.** (A) Se inocularon cohortes de ratones con Raji-ffluc mediante inyección en la vena de la cola y se administraron células T transducidas con receptores químicos de

CD19 que contenían dominios espaciadores largo y corto o con tEGFR solo 2 y 9 días después de la inoculación de tumor mediante inyección en la vena de la cola. Se evaluó la progresión y distribución tumoral mediante obtención de imágenes por bioluminiscencia en serie después de la inyección de sustrato de lucifera. **(B)** Obtención de imágenes por bioluminiscencia en serie de tumor en cohortes de ratones o bien tratados con células T que expresan receptores químéricos de CD19 con dominios espaciador corto ("corto/CD28" y "corto/4-1BB") y espaciador largo ("largo/CD28" y "largo/4-1BB"), con células T transducidas con el vector de control de tEGFR o no tratados. Cada diagrama que representa cohortes de ratones tratados con células T transducidas con receptor químérico de CD19 o con tEGFR también muestra la media de progresión tumoral en ratones no tratados para comparación (triángulos rojos). **(C)** Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia de ratones no tratados y ratones tratados con células T que expresan receptores químéricos de CD19 con dominios espaciador corto ("corto/CD28" y "corto/4-1BB"), espaciador largo ("largo/CD28" y "largo/4-1BB") y con tEGFR de control. Se realizaron análisis estadísticos usando la prueba de los rangos logarítmicos. Los datos mostrados en **B** y **C** son representativos de resultados obtenidos en 3 experimentos independientes.

**Figura 16: las células T de receptor químérico de CD19 con un espaciador corto (corto/4-1BB) erradican tumores de Raji establecidos en ratones NSG de una manera dependiente de la dosis. (A)** Se inocularon ratones con Raji-ffluc mediante inyección en la vena de la cola y se confirmó el injerto de tumor mediante obtención de imágenes por bioluminiscencia en el día 6. En el día 7, los ratones recibieron una única inyección i.v. de diversas dosis de células T transducidas con el receptor químérico de CD19 "corto/4-1BB" o con el lentivirus de control de tEGFR. **(B, C)** Eficacia antitumoral dependiente de la dosis de células T que expresan el receptor químérico de CD19 "corto/4-1BB". Una cohorte de control de ratones recibió una única dosis alta de células T modificadas con tEGFR solo. **(D)** Persistencia de células T de receptor químérico de CD19 tras la transferencia adoptiva en ratones NSG/Raji. Análisis por citometría de flujo de sangre periférica (sangrados oculares) en la cohorte de ratones tratados con  $2,5 \times 10^6$  células T de receptor químérico de CD19 "corto/4-1BB". La frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> tEGFR<sup>+</sup> se muestra como porcentaje de células de sangre periférica vivas.

**Figura 17: las células T que expresan receptores químéricos de CD19 con un espaciador corto y o bien CD28 o bien 4-1BB son más eficaces contra linfoma establecido que aquellas que expresan receptores químéricos de CD19 con un espaciador largo. (A)** Se inocularon ratones NSG con Raji-ffluc en el día 0 y se trataron en el día 7 con una dosis de  $2,5 \times 10^6$  células T de receptor químérico de CD19 que expresaban espaciador corto o largo y o bien CD28 o bien dominio coestimulador de 4-1BB. **(B)** Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia de ratones en cada uno de los grupos de tratamiento. Se realizaron análisis estadísticos usando la prueba de los rangos logarítmicos. **(C)** Obtención de imágenes por bioluminiscencia de cohortes de ratones tratados con células T que expresan receptores químéricos de CD19 con espaciadores cortos ("corto/CD28" y "corto/4-1BB") y espaciadores largos ("largo/CD28" y "largo/4-1BB"). La carga tumoral media observada en ratones no tratados en cada punto de tiempo se muestra en cada diagrama para comparación (triángulos). **(D)** La persistencia *in vivo* de células T que expresan receptor químérico de CD19 con dominio espaciador corto está potenciada en comparación con células T que expresan receptores químéricos de CD19 con dominio espaciador largo. La frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> tEGFR<sup>+</sup> en la sangre periférica obtenida en el día 3 y 10 después de la transferencia se determinó mediante citometría de flujo y se muestra como porcentaje de células de sangre periférica vivas (PI<sup>-</sup>). Se realizaron análisis estadísticos mediante prueba de la t de Student. Los datos mostrados en **B-D** son representativos de resultados obtenidos en 3 experimentos independientes.

**Figura 18: aumentar la dosis de células T de receptor químérico o aumentar la señalización coestimuladora no mejora la eficacia antitumoral de receptores químéricos de CD19 con un dominio espaciador largo contra linfoma establecido. (A)** Actividad citolítica de células T que expresan receptores químéricos de CD19 con "largo/CD28", "largo/4-1BB" y "largo/CD28\_4-1BB" contra células diana CD19<sup>+</sup> y de control. **(B)** Ensayo de citocinas multiplexado de sobrenadante obtenido después de 24 horas a partir de cultivos conjuntos por triplicado de células tumorales K562/CD19 y Raji con células T que expresan los diversos receptores químéricos de CD19. **(C)** Evaluación de proliferación de células T de receptor químérico de CD19 72 horas después de la estimulación con células tumorales CD19<sup>+</sup> (K562/CD19 - panel izquierdo; Raji - panel derecho) mediante dilución de colorante de CFSE. Para el análisis, se combinaron pocillos por triplicado y se analizó la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> vivas (PI<sup>-</sup>). Los números encima de cada histograma indican el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto en proliferación, y la fracción de células T en cada puerta que experimentaron  $\geq 4/3/2/1$  divisiones celulares se proporciona en la parte superior izquierda de cada gráfico. **(D)** Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia de ratones tratados con células T que expresan receptores químéricos de CD19 con dominio espaciador corto ("corto/CD28") y largo ("largo/CD28" y "largo/CD28\_4-1BB"), o células T modificadas con un vector lentiviral de control que codifica para tEGFR. Se realizaron análisis estadísticos usando la prueba de los rangos logarítmicos. **(E)** Obtención de imágenes por bioluminiscencia de cohortes de ratones tratados con células T que expresan receptores químéricos de CD19 con espaciador corto ("corto/CD28") y espaciadores largos ("largo/CD28" y "largo/CD28\_4-1BB"). Los diagramas muestran la progresión tumoral media en ratones no tratados para comparación (triángulos rojos). **(F)** Persistencia *in vivo* de células T que expresan los diversos receptores químéricos de CD19. La frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> tEGFR<sup>+</sup> en la sangre periférica obtenida en el día 3 y 10 después de la transferencia se determinó mediante citometría de flujo y se muestra como porcentaje de células de sangre periférica vivas (PI<sup>-</sup>). Se realizaron análisis estadísticos mediante prueba de la t de Student.

**Figura 19: las células T de receptor químérico de CD19 con un dominio espaciador largo se activan mediante tumor *in vivo* pero no logran aumentar su número celular. (A)** Expresión de CD69 y CD25 en células T modificadas con cada receptor químérico de CD19 antes de la transferencia en ratones NSG/Raji. **(B)** Se inocularon cohortes de ratones con células tumorales Raji-ffluc y 7 días después recibieron células T transducidas

con receptor químérico de CD19 marcado con CFSE o de control. Se extirparon médula ósea y bazos a partir de subgrupos de ratones 24 y 72 horas después de la administración de células T. **(C, D)** Análisis por citometría de flujo multiparamétrico de células mononucleares de médula ósea obtenidas 24 horas (C) y 72 horas (D) después de la transferencia de células T. Los gráficos de puntos muestran la tinción anti-CD3 y anti-CD45 después de la aplicación de puertas con respecto a células PI<sup>-</sup> para detectar células T humanas viables. La puerta CD3<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup> contiene células tumorales Raji. La expresión de CD25 y CD69 en células T CD3<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> vivas (PI<sup>-</sup>) se muestra en los histogramas. **(E)** Frecuencia de células T CD3<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> en bazos obtenidos 24 y 72 horas después de la transferencia de células T. Se aplican puertas en gráficos de puntos con respecto a esplenocitos vivos PI<sup>-</sup> y el porcentaje de células T CD3<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> se muestra en cada gráfico. **(F)** Tinción con PI de médula ósea y esplenocitos horas después de la transferencia de células T en ratones NSG/Raji. Los números en los histogramas indican el porcentaje de células PI<sup>+</sup> dentro de la población CD3<sup>+</sup>. **(G)** Obtención de imágenes por bioluminiscencia de cohortes de ratones tratados con células T que expresan receptores químéricos de CD19 con espaciador corto ("corto/CD28" y "corto/4-1BB"), espaciadores largos ("largo/CD28 y "largo/4-1BB") o células T de control.

**Figura 20:** las células T que expresan receptores químéricos de CD19 con 4-1BB y CD3zeta y una bisagra de Fc de IgG4 modificada muestran una función *in vitro* e *in vivo* superior en comparación con células T que expresan receptores químéricos de CD19 con 4-1BB y CD3zeta y una bisagra de CD8 alfa. A. Actividad citolítica de células T modificadas con receptor químérico de CD19 con bisagra de Fc de IgG4, bisagra de CD8 alfa y células T de control contra células K562 marcadas con Cr<sup>51</sup> transfectadas con CD19, células de linfoma Raji que expresan CD19, y células T de control K562. Se muestra la lisis a diferentes razones de E/T en un ensayo de liberación de Cr<sup>51</sup> de 4 horas. B. Producción de interferón gamma mediante 5x10<sup>4</sup> células T que expresan un receptor químérico de CD19 con una bisagra de Fc de IgG4 o bisagra de CD8 alfa después de un cultivo conjunto de 24 horas con células tumorales Raji. La D.O. de 1 corresponde a ~500 pg/ml de interferón gamma. C. Ensayo de dilución de colorante de CFSE para medir la proliferación de células T que expresan un receptor químérico de CD19 con una bisagra de Fc de IgG4 o bisagra de CD8 alfa y células T que expresan tEGFR solo (control) después de un cultivo conjunto de 72 horas con células de linfoma Raji positivas para CD19. Los números encima de cada histograma indican el número de divisiones celulares que experimentó el subconjunto de células en proliferación. La fracción de células T en cada puerta que experimentaron ≥3/2/1 divisiones celulares se proporciona junto al gráfico. D. Actividad antitumoral *in vivo* de células T que expresan un receptor químérico de CD19 con una bisagra de Fc de IgG4 (grupo 1) o bisagra de CD8 alfa (grupo 2) y células T que expresan tEGFR solo (grupo 3) en ratones NSG inoculados con células tumorales Raji que expresan luciferasa de luciérnaga (ffluc). Se obtuvieron imágenes de los ratones 17 días después de la inoculación de tumor y 10 días después de la inoculación de células T. Los datos muestran una mayor carga tumoral en ratones tratados con células T de tEGFR de control (grupo 3) o con células T de receptor químérico de CD19 de bisagra de CD8 alfa (grupo 2) en comparación con ratones tratados con células T de receptor químérico de CD19 de bisagra de Fc de IgG4 (grupo 1).

### 35 Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que se refiere la invención.

40 Se pretende que "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible, abarque variaciones de ±20 % o ±10 %, más preferiblemente ±5 %, incluso más preferiblemente ±1 % y todavía más preferiblemente ±0,1 % con respecto al valor especificado.

45 "Activación", tal como se usa en el presente documento, se refiere al estado de una célula T que se ha estimulado de manera suficiente como para inducir proliferación celular detectable, producción de citocinas o expresión de marcadores de superficie celular tales como CD69 y CD25, o funciones efectoras detectables.

50 "Muerte celular inducida por activación" tal como se usa en el presente documento se refiere a un estado de una célula T que está activada pero no es capaz de proliferar más de 2 generaciones y muestra marcadores de apoptosis.

55 "Antígeno" o "Ag" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar o bien producción de anticuerpo o bien la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. Resulta fácilmente evidente que un antígeno puede generarse, sintetizarse, producirse de manera recombinante o puede derivarse de una muestra biológica. Una muestra de este tipo puede incluir, pero no se limita a, una muestra tisular, una muestra tumoral, una célula o un líquido biológico.

60 "Efecto antitumoral", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto biológico, que puede manifestarse mediante una disminución de volumen tumoral, una disminución del número de células tumorales, una disminución del número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida o una disminución de diversos síntomas fisiológicos asociados con el estado canceroso. Un "efecto antitumoral" también puede manifestarse mediante una disminución de la recidiva o un aumento del tiempo antes de la recidiva.

65 "Receptor químérico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un receptor diseñado de manera sintética que comprende un dominio de unión a ligando de un anticuerpo u otra secuencia de proteína que se une a una molécula asociada con la enfermedad o el trastorno y está unido mediante un dominio espaciador a uno o más

dominios de señalización intracelulares de una célula T u otros receptores, tales como un dominio coestimulador.

"Dominio coestimulador", tal como se usa el término en el presente documento, se refiere a un resto de señalización que proporciona a células T una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, por la cadena de CD3 zeta del complejo TCR/CD3, media en una respuesta de células T, incluyendo, pero sin limitarse a, activación, proliferación, diferenciación, secreción de citocinas y similares. Un dominio coestimulador puede incluir la totalidad o una porción de, pero no se limita a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, ICOS, antígeno asociado a función de linfocitos 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente a CD83. En casos, el dominio coestimulador es un dominio de señalización intracelular que interacciona con otros mediadores intracelulares para mediar en una respuesta celular incluyendo activación, proliferación, diferenciación y secreción de citocinas, y similares.

"Codificar para", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la propiedad de secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otras macromoléculas tales como una secuencia de aminoácidos definida. Por tanto, un gen codifica para una proteína si la transcripción y traducción de ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Una "secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas unas de otras y que codifican para la misma secuencia de aminoácidos.

20 "Linfocito T citotóxico" (CTL) tal como se usa en el presente documento se refiere a un linfocito T que expresa CD8 en la superficie del mismo (es decir, una célula T CD8<sup>+</sup>). En algunos casos tales células son preferiblemente células T de "memoria" (células T<sub>M</sub>) que tienen experiencia en cuanto al antígeno.

25 Célula T de "memoria central" (o "T<sub>CM</sub>") tal como se usa en el presente documento se refiere a un CTL con experiencia en cuanto al antígeno que expresa CD62L o CCR-7 y CD45RO en la superficie del mismo y no expresa o tiene una expresión reducida de CD45RA en comparación con células vírgenes. En casos, las células de memoria central son positivas para la expresión de CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO y CD95, y tienen una expresión reducida de CD54RA en comparación con células vírgenes.

30 Célula T de "memoria efectora" (o "T<sub>EM</sub>") tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula T con experiencia en cuanto al antígeno que no expresa o tiene una expresión reducida de CD62L en la superficie de la misma en comparación con células de memoria central, y no expresa o tiene una expresión reducida de CD45RA en comparación con células vírgenes. En casos, células de memoria efectora son negativas para la expresión de CD62L y CCR7, en comparación con células vírgenes o células de memoria central, y tienen una expresión variable de CD28 y CD45RA.

35 Células T "vírgenes" tal como se usa en el presente documento se refiere a un linfocito T sin experiencia en cuanto al antígeno que expresa CD62L y CD45RA, y no expresa CD45RO- en comparación con células de memoria central o efectora. En algunos casos, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de células T vírgenes incluyendo CD62L, CCR7, CD28, CD127 y CD45RA.

40 Células T "efectoras" "T<sub>E</sub>" tal como se usa en el presente documento se refiere a células de linfocito T citotóxico con experiencia en cuanto al antígeno que no expresan o tienen una expresión reducida de CD62L, CCR7, CD28, y son positivas para granzima B y perforina en comparación con células T de memoria central o vírgenes.

45 "Enriquecido" y "agotado" tal como se usa en el presente documento para describir cantidades de tipos de célula en una mezcla se refieren a someter la mezcla de las células a un procedimiento o etapa que da como resultado un aumento del número del tipo "enriquecido" y una disminución del número de las células "agotadas". Por tanto, dependiendo de la fuente de la población de células original sometida al procedimiento de enriquecimiento, una mezcla o composición puede contener aproximadamente el 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento o más (en número o cuentas) de las células "enriquecidas" y aproximadamente el 40, 30, 20, 10, 5 o 1 por ciento o menos (en número o cuentas) de las células "agotadas".

55 "Epítopo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una parte de un antígeno o una molécula que se reconoce por el sistema inmunitario incluyendo anticuerpos, células T y/o células B. Los epítopos tienen habitualmente al menos 7 aminoácidos y pueden ser lineales o conformacionales.

60 "Aislado", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos divulgados en el presente documento, significa polipéptido o ácido nucleico que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Preferiblemente, el polipéptido o ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes con los que está naturalmente asociado. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirán con usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido o ácido nucleico, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos.

65 "Dominio de señalización intracelular" tal como se usa en el presente documento se refiere a la totalidad o una porción de uno o más dominios de una molécula (en este caso, la molécula de receptor químérico) que proporciona la

activación de un linfocito. Los dominios intracelulares de tales moléculas median en una señal mediante interacción con mediadores celulares para dar como resultado la proliferación, diferenciación, activación y otras funciones efectoras. En casos, tales moléculas incluyen la totalidad o porciones de CD28, CD3, 4-1BB y combinaciones de los mismos.

5 "Ligando" tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que se une específicamente a otra sustancia para formar un complejo. Los ejemplos de ligando incluyen epítopos en antígenos, moléculas que se unen a receptores, sustratos, inhibidores, hormonas y activadores. "Dominio de unión a ligando" tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia o porción de una sustancia que se une a un ligando. Los ejemplos de 10 dominios de unión a ligando incluyen porciones de unión a antígeno de anticuerpos, dominios extracelulares de receptores y sitios activos de enzimas.

15 "Operativamente unido" tal como se usa en el presente documento se refiere a la unión funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está colocada en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN 20 operativamente unidas son contiguas y, cuando es necesario para unir dos regiones codificantes de proteína, están en el mismo marco de lectura.

25 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptido de receptor químérico identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia de referencia para cada uno del dominio de unión a ligando, espaciador, dominio transmembrana y/o el dominio de activación de linfocitos, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que están dentro de las habilidades en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible para 30 el público tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGn-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que están comparándose. Por ejemplo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos generados usando el programa informático WU-BLaSt-2 [Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)] usan varios parámetros de búsqueda, la mayoría 35 de los cuales se establecen a los valores por defecto. Los que no se establecen a valores por defecto (es decir, los parámetros ajustables) se establecen con los siguientes valores: extensión de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = 11 y matriz de puntuación = BLOSUM62. Un valor de % de identidad de secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácido idénticos coincidentes entre cada una o la totalidad de la secuencia de aminoácidos de polipéptido de la secuencia de receptor químérico de 40 referencia proporcionada en la tabla 2 y la secuencia de aminoácidos de interés de comparación tal como se determina mediante WU-BLAST-2 entre (b) el número total de residuos de aminoácido del polipéptido de interés.

45 "Polinucleótido de variante de receptor químérico" o "secuencia de ácido nucleico de variante de receptor químérico" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para polipéptido tal como se define a continuación que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la secuencia de ácido de polinucleótido mostrada en la tabla 1 o un fragmento específicamente derivado de la misma, tal como polinucleótido que codifica para un dominio de unión a antígeno, un polinucleótido que codifica para un dominio espaciador, un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana y/o un polinucleótido que codifica para un dominio estimulador de linfocitos. Habitualmente, una variante de receptor químérico de polinucleótido 50 o fragmento del mismo tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos 55 aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos 60 aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos 65 aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos

aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, más preferiblemente al menos aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en la tabla o un fragmento derivado de la misma. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.

5 Con respecto a esto, debido a la degeneración del código genético, un experto habitual en la técnica reconocerá inmediatamente que un gran número de polinucleótidos de variantes de receptor químérico que tienen al menos 10 aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a la secuencia de nucleótidos de la tabla 1 codificarán para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la tabla 2.

10 "Sustancialmente purificado" se refiere a una molécula que está esencialmente libre de otros tipos de moléculas o a una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos de células con los que está normalmente asociada en su estado 15 que se produce de manera natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células.

20 "No encontrado sustancialmente" cuando se usa con referencia a la presencia de un antígeno tumoral u otras moléculas en células normales se refiere al porcentaje de un tipo de célula normal que tiene el antígeno o la molécula, y/o a la densidad del antígeno en las células. En casos, no sustancialmente encontrado significa que el antígeno o la molécula se encuentra en menos del 50 % del tipo de célula normal y/o a una densidad un 50 % inferior en comparación con la cantidad de células o antígeno encontrado en una célula tumoral u otra célula enferma.

25 "Células T" o "linfocitos T" tal como se usa en el presente documento pueden ser de cualquier especie de mamífero, preferiblemente primate, incluyendo monos, perros y humanos. En algunos casos las células T son alogénicas (de la misma especie pero de diferente donante) con respecto al sujeto receptor; en algunos casos las células T son autólogas (el donante y el receptor son el mismo); en algunos casos las células T son singénicas (el donante y los receptores son diferentes pero son gemelos idénticos).

#### **Modos de la divulgación**

30 Se divultan ácidos nucleicos de receptor químérico y vectores y células huésped que incluyen tales ácidos nucleicos. El ácido nucleico de receptor químérico comprende varios componentes modulares que pueden escindirse y sustituirse por otros componentes con el fin de personalizar el receptor químérico para una molécula diana específica. Los casos incluyen que uno de los componentes modulares sea el componente espaciador. Se ha encontrado 35 sorprendentemente que la longitud de la región espaciadora que se supone que no tiene capacidad de señalización afecta a la eficacia *in vivo* de las células T modificadas para expresar el receptor químérico y necesita personalizarse para moléculas diana individuales para una actividad terapéutica potenciada.

40 En un caso, se describen métodos y constructos de ácido nucleico para diseñar un receptor químérico que tiene un reconocimiento tumoral mejorado, proliferación de células T y/o producción de citocinas aumentadas en respuesta al ligando en comparación con un receptor químérico de referencia. En casos, se describe una biblioteca de ácidos nucleicos, en la que cada ácido nucleico codifica para una región espaciadora que difiere de las otras en cuanto a la secuencia y la longitud. Entonces puede usarse cada uno de los ácidos nucleicos para formar un constructo de ácido nucleico de receptor químérico que puede someterse a prueba *in vivo* (en un modelo animal) y/o *in vitro* de modo que 45 puede seleccionarse un espaciador que proporciona reconocimiento tumoral mejorado, proliferación de células T y/o producción de citocinas aumentadas en respuesta al ligando.

50 En casos, un ácido nucleico de receptor químérico comprende un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando, en el que el ligando es un antígeno o molécula específico tumoral o viral, un polinucleótido que codifica para un espaciador de polipéptido personalizado, en el que el espaciador proporciona proliferación de células T potenciada; un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana; y un polinucleótido que codifica para uno o más dominios de señalización intracelulares. En casos, se emplea un espaciador largo si el epítopo de la molécula diana es proximal a la membrana en la célula diana y se emplea un espaciador corto si el epítopo de la molécula diana es distal a la membrana en la célula diana.

55 55 El diseño de un receptor químérico puede personalizarse dependiendo del tipo de tumor o virus, el antígeno o la molécula diana presente en el tumor, la afinidad del anticuerpo por la molécula diana, la flexibilidad necesaria para el dominio de unión a antígeno, y/o el dominio de señalización intracelular. En casos, se someten a prueba varios constructos de receptor químérico *in vitro* y en modelos *in vivo* para determinar la capacidad de células T modificadas con el receptor para destruir células tumorales en ratones inmunodeficientes y para proliferar y persistir después de la transferencia adoptiva. En casos, se selecciona un receptor químérico que proporciona la capacidad de que al menos el 30 % de las células proliferen a lo largo de al menos dos generaciones *in vitro* y/o dentro del plazo de 72 horas tras la introducción *in vivo*. En casos, no se selecciona un receptor químérico que da como resultado que más del 50 % de las células experimenten muerte celular inducida por activación (AICD) dentro del plazo de 72 horas *in vivo* en ratones inmunodeficientes y no logra erradicar células tumorales.

- Dependiendo de si la molécula diana está presente en las células tumorales de un sujeto, el receptor quimérico incluye un dominio de unión a ligando que se une específicamente a esa molécula diana. En casos, las células tumorales de un sujeto se caracterizan para moléculas tumorales de superficie celular. La molécula diana puede seleccionarse basándose en una determinación de su presencia en las células tumorales de un sujeto particular. En casos, se 5 selecciona una molécula diana que es una molécula de superficie celular encontrada predominantemente en células tumorales y no encontrada en tejidos normales en ningún grado sustancial. En casos, se selecciona un anticuerpo para unirse a un epítopo en la molécula de superficie celular seleccionada como diana. En algunos casos, el epítopo se caracteriza con respecto a su proximidad a la membrana celular. Un epítopo se caracteriza como proximal a la membrana cuando se predice o se sabe mediante análisis estructural que reside más cerca de la membrana de célula 10 diana que epítopos alternativos que se predice o se sabe mediante análisis estructural que residen a una mayor distancia desde la membrana de célula diana. En casos, se compara mediante ensayos de unión la afinidad del anticuerpo a partir del cual se construye el scFV y se examinan anticuerpos con afinidades diferentes en formatos de receptor quimérico expresados en células T para determinar qué afinidad confiere un reconocimiento tumoral óptimo, basándose en citotoxicidad superior de células diana y/o proliferación y producción de citocinas de células T.
- 15 Además, la región espaciadora del receptor quimérico puede hacerse variar para optimizar el reconocimiento por células T del ligando en la célula diana. En casos, cuando un anticuerpo se une a un epítopo en la célula diana que es muy proximal a la membrana, se selecciona un espaciador que es más largo de aproximadamente 15 aminoácidos. Por ejemplo, en casos, si el epítopo o porción del mismo en el antígeno diana está en los primeros 100 aminoácidos 20 de la secuencia lineal del dominio extracelular adyacente al dominio transmembrana, puede seleccionarse una región espaciadora larga. En casos, cuando un anticuerpo se une a un epítopo en la célula diana que es distal a la membrana, se selecciona un espaciador que tiene aproximadamente 119 o 15 aminoácidos o menos. Por ejemplo, en casos, cuando el epítopo o porción del mismo se encuentra en los 150 aminoácidos de la secuencia lineal del dominio extracelular desde el extremo terminal, puede usarse un espaciador corto o intermedio. En casos, un espaciador 25 comprende una secuencia de aminoácidos X<sub>1</sub>PPX<sub>2</sub>P.
- Puede emplearse una variedad de combinaciones de dominio de señalización intracelular primario y coestimulador para potenciar la eficacia *in vivo* del receptor quimérico. En casos, pueden someterse a prueba diferentes constructos 30 del receptor quimérico en un modelo animal *in vivo* para determinar la eficacia para la destrucción tumoral. En casos, se selecciona un dominio de señalización intracelular coestimulante del grupo que consiste en CD28 y versiones modificadas del mismo, 4-1BB y versiones modificadas del mismo y combinaciones de los mismos. Pueden incorporarse otros dominios coestimuladores, tales como OX40.
- 35 Las células T de memoria central CD8<sup>+</sup> tienen una programación intrínseca que les permite persistir durante períodos prolongados tras la administración, lo cual hace que sean un subconjunto preferido de células T CD8<sup>+</sup> para inmunoterapia. En casos, se administran células T citotóxicas modificadas con receptor quimérico específico de CD19 preparadas a partir de células T de memoria central CD8<sup>+</sup> purificadas, en presencia o ausencia de células T 40 modificadas con receptor quimérico específico de CD19 CD4<sup>+</sup>. En casos, las células T CD4<sup>+</sup> específicas de tumor ejercen reactividad antitumoral y proporcionan ayuda a células T CD8<sup>+</sup> específicas de tumor *in vitro* e *in vivo*. En un caso específico, se usan células T CD4<sup>+</sup> específicas de tumor o células T CD4<sup>+</sup> seleccionadas de los subconjuntos virgen o de memoria central solas o en combinación con T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup>.
- Ácidos nucleicos, vectores y polipéptidos**
- 45 Se divulga un ácido nucleico de receptor quimérico útil para transformar o transducir linfocitos para su uso en inmunoterapia adoptiva. En casos, el ácido nucleico contiene varios componentes modulares que proporcionan una fácil sustitución de elementos del ácido nucleico. Aunque sin pretender limitar el alcance de la divulgación, se cree que el receptor quimérico para cada antígeno tumoral se personaliza de manera deseable en cuanto a los componentes con el fin de proporcionar eficacia *in vivo* y expresión eficiente en células de mamífero. Por ejemplo, en un caso 50 específico, para la eficacia de un receptor quimérico que comprende un scFV que se une a un epítopo de ROR1 ubicado en el dominio de Ig/Frizzled distal a la membrana, se emplea un espaciador que tiene aproximadamente 15 aminoácidos o menos. En otro caso específico, para la eficacia de un receptor quimérico que comprende un scFV que se une a un epítopo de ROR1 ubicado en el dominio Kringle proximal a la membrana, se emplea un espaciador que tiene más de 15 aminoácidos. En otro caso, para la eficacia de un receptor quimérico que comprende un scFV que se 55 une a CD19, se emplea un espaciador que tiene 15 aminoácidos o menos.
- En casos, un ácido nucleico de receptor quimérico aislado comprende un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando, en el que la molécula diana es un antígeno específico de tumor, un polinucleótido que codifica para un espaciador de polipéptido en el que el espaciador de polipéptido tiene aproximadamente 229 aminoácidos o menos; 60 un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana; y un polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular. En casos, un vector de expresión comprende un ácido nucleico quimérico tal como se describe en el presente documento. En el presente documento también se incluyen polipéptidos codificados por la totalidad o una porción de los ácidos nucleicos de receptor quimérico.
- 65 **Dominio de unión a ligando**

- En casos, el ácido nucleico de receptor químérico comprende un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando. En casos, el dominio de unión a ligando se une específicamente a un antígeno específico tumoral o viral. En casos, el dominio de unión a ligando es un anticuerpo o fragmento del mismo. Una secuencia de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede determinarse fácilmente. En un caso específico, el polinucleótido codifica para un Fv de cadena sencilla que se une específicamente a CD19. En otros casos específicos, el polinucleótido codifica para un Fv de cadena sencilla que se une específicamente a ROR1. Las secuencias de estos anticuerpos las conocen o pueden determinarlas fácilmente los expertos en la técnica.
- 5 Los antígenos tumorales son proteínas que se producen por células tumorales que provocan una respuesta inmunitaria. La selección del dominio de unión a ligando dependerá del tipo de cáncer que va a tratarse y puede seleccionar como diana antígenos tumorales u otras moléculas de superficie de célula tumoral. Puede caracterizarse una muestra tumoral de un sujeto para determinar la presencia de determinados biomarcadores o marcadores de superficie celular. Por ejemplo, las células de cáncer de mama de un sujeto pueden ser positivas o negativas para cada uno de Her2Neu, receptor de estrógenos y/o el receptor de progesterona. Se selecciona un antígeno tumoral o 10 molécula de superficie celular que se encuentra en las células tumorales del sujeto individual. En la técnica se conocen antígenos tumorales y moléculas de superficie celular e incluyen, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, efrina B2, CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, mesotelina, c-Met, GD-2 y MAGE A3 TCR. En casos una molécula diana es una molécula de superficie celular que se encuentra en células tumorales y no se encuentra sustancialmente en 15 tejidos normales o su expresión está restringida a tejidos normales no vitales.
- 10 Otras moléculas diana incluyen, pero no se limitan a, antígenos derivados de patógenos infecciosos tales como VIH (virus de inmunodeficiencia humana), VHB (virus de la hepatitis B), VPH (virus del papiloma humano) y virus de la hepatitis C.
- 15 20 25 En un caso, la molécula diana en el tumor comprende uno o más epítopos asociados con un tumor maligno. Los tumores malignos expresan varias proteínas que pueden servir como antígenos diana para el reconocimiento mediado por receptor químérico o receptor de células T. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas transformación celular tales como el oncogén HER-2/Neu/ErbB2. En casos, el antígeno tumoral se expresa o se sobreexpresa de manera selectiva en las células tumorales en comparación con células de control del mismo tipo de tejido. En otros casos, el antígeno tumoral es un polipéptido de superficie celular.
- 25 30 35 Una vez identificada una molécula de superficie de célula tumoral que puede seleccionarse como diana con un receptor químérico, se selecciona y se caracteriza un epítopo de la molécula diana. En casos, se selecciona un epítopo que es proximal a la membrana de célula tumoral. En otros casos, se selecciona un epítopo que es distal a la membrana de célula tumoral. Se caracteriza que un epítopo es proximal a la membrana cuando se predice o se sabe mediante análisis estructural que reside más cerca de la membrana de célula diana que epítopos alternativos que se predice o se sabe mediante análisis estructural que residen a una mayor distancia desde la membrana de célula diana.
- 40 45 50 55 60 65 Pueden prepararse anticuerpos que se unen específicamente a una molécula de superficie de célula tumoral usando métodos de obtención de anticuerpos monoclonales, métodos de presentación en fagos, métodos para generar anticuerpos humanos o humanizados, o métodos que usan un animal o planta transgénico modificado por ingeniería para producir anticuerpos humanos. Están disponibles bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos parcial o totalmente sintéticos y pueden examinarse para detectar un anticuerpo o fragmento del mismo que puede unirse a la molécula diana. También están disponibles bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos humanos. En casos, los anticuerpos se unen específicamente a una molécula de superficie de célula tumoral y no reaccionan de manera cruzada con componentes no específicos tales como albúmina de suero bovino u otros antígenos no relacionados. Una vez identificada, puede aislarse y/o determinarse la secuencia de aminoácidos o secuencia de polinucleótido que codifica para el anticuerpo.
- 50 Anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno incluyen la totalidad o una porción de anticuerpos policlonales, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo sintético, un anticuerpo químérico, un anticuerpo biespecífico, un minicuerpo y un anticuerpo lineal. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto, y pueden prepararse fácilmente. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
- 55 En casos, pueden aislarse y caracterizarse varios anticuerpos diferentes que se unen a moléculas de superficie de célula tumoral particulares. En casos, los anticuerpos se caracterizan basándose en especificidad de epítopo de la molécula seleccionada como diana. Además, en algunos casos, pueden seleccionarse anticuerpos que se unen al mismo epítopo basándose en la afinidad del anticuerpo por ese epítopo. En casos, un anticuerpo tiene una afinidad de al menos 1 mM, y preferiblemente <50 nM. En casos, se selecciona un anticuerpo que tiene una afinidad superior por el epítopo en comparación con otros anticuerpos. Por ejemplo, se selecciona un anticuerpo que tiene una actividad al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces o al menos 50 veces mayor que un anticuerpo de referencia que se une al mismo epítopo.

En casos, se seleccionan moléculas diana del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD23, CD123, CS-1, ROR1, mesotelina, Her2, c-Met, PSMA, GD-2, MAGE A3 TCR y combinaciones de las mismas.

- 5 En casos específicos, el antígeno diana es CD19. Los expertos en la técnica conocen varios anticuerpos específicos para CD19 y pueden caracterizarse fácilmente para determinar la secuencia, unión a epítopo y afinidad. En un caso específico, el constructo de receptor químérico incluye una secuencia de scFv a partir del anticuerpo FMC63. En otros casos, el scFv es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDRL1 de RASQDISKYN, secuencia de CDRL2 de SRLHSGV y una secuencia de CDRL3 de GNTLPYTFG. En otros casos, el scFv es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena pesada variable que comprende secuencia de CDRH1 de DYGV, secuencia de CDRH2 de VIWGSETYYNSALKS y una secuencia de CDRH3 de YAMDYWG. La divulgación también contempla regiones variables que tienen al menos el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la del scFv para FMC63 y que tienen al menos la misma afinidad por CD19. En casos, el receptor químérico tiene un espaciador corto o intermedio de 119 aminoácidos o menos, o 12 aminoácidos o menos. En un caso específico, el espaciador tiene 12 aminoácidos o menos y tiene una secuencia de SEQ ID NO: 4.

En casos, las regiones CDR se encuentran dentro de regiones de anticuerpo según se numeran mediante Kabat de la siguiente manera: para la cadena ligera; CDRL1 aminoácidos 24-34; CDRL2 aminoácidos 50-56; CDRL3 en los aminoácidos 89-97; para la cadena pesada en CDRH1 en los aminoácidos 31-35; CDRH2 en los aminoácidos 50-65; y para CDRH3 en los aminoácidos 95-102. Las regiones CDR en anticuerpos pueden determinarse fácilmente.

- 20 En casos específicos, el antígeno diana es ROR1. Los expertos en la técnica conocen varios anticuerpos específicos para ROR1 y pueden caracterizarse fácilmente para determinar la secuencia, unión a epítopo y afinidad. En un caso específico, el constructo de receptor químérico incluye una secuencia de scFv de anticuerpo R12. En otros casos, el scFv es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDRL1 de ASGFDFSAAYM, secuencia de CDRL2 de TIYPSSG y una secuencia de CDRL3 de ADRATYFCA. En otros casos, el scFv es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena pesada variable que comprende secuencia de CDRH1 de DTIDWY, secuencia de CDRH2 de VQSDGSYTKRPGVPDR y una secuencia de CdRh3 de YIGGYVFG. Casos también contemplan regiones variables que tienen al menos el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la del scFv para R12 y que tienen al menos la misma afinidad por ROR1. En casos, el receptor químérico tiene un espaciador corto o intermedio de 119 aminoácidos o menos, o 12 aminoácidos o menos. En un caso específico, el espaciador tiene 12 aminoácidos o menos y tiene una secuencia de SEQ ID NO: 4.

- 25 En casos específicos, el antígeno diana es ROR1. Los expertos en la técnica conocen varios anticuerpos específicos para ROR1 y pueden caracterizarse fácilmente para determinar la secuencia, unión a epítopo y afinidad. En un caso específico, el constructo de receptor químérico incluye una secuencia de scFv de anticuerpo R11. En otros casos, el scFv es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDRL1 de SGSDINDYPIS, secuencia de CDRL2 de INSGGST y una secuencia de CDRL3 de YFCARGYS. En otros 30 casos, el scFv es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena pesada variable que comprende secuencia de CDRH1 de SNLAW, secuencia de CDRH2 de RASNLSAGVPSRSGS y una secuencia de CDRH3 de NVSYRTSF. Casos también contemplan regiones variables que tienen al menos el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la del scFv para R11 y que tienen al menos la misma afinidad por ROR1. En casos, el receptor químérico tiene un espaciador largo de 229 aminoácidos o menos. En un caso específico, el espaciador tiene 45 229 aminoácidos y tiene una secuencia de SEQ ID NO: 50.

- 40 En casos específicos, el antígeno diana es Her2. Los expertos en la técnica conocen varios anticuerpos específicos para Her2 y pueden caracterizarse fácilmente para determinar la secuencia, unión a epítopo y afinidad. En un caso específico, el constructo de receptor químérico incluye una secuencia de scFv de anticuerpo Herceptin. En otros casos, el scFv es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena ligera variable que comprende una secuencia de CDRL1, secuencia de CDRL2 y una secuencia de CDRL3 del anticuerpo Herceptin. En otros casos, el scFv es un scFv humano o humanizado que comprende una cadena pesada variable que comprende secuencia de CDRH1, CDRH2 y una secuencia de CDRH3 de Herceptin. Las secuencias de CDR pueden determinarse fácilmente a partir de la secuencia de aminoácidos de Herceptin. Casos también contemplan regiones variables que tienen al menos el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la del scFv para Herceptin y que tienen al menos la misma afinidad por Her2. En casos, el receptor químérico tiene un espaciador largo de 229 aminoácidos o menos. En un caso específico, el espaciador tiene 229 aminoácidos y tiene una secuencia de SEQ ID NO: 50.

- 45 En casos, un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando está operativamente unido a un polinucleótido que codifica para una región espaciadora. En casos, el polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante con el fin de proporcionar una fácil escisión y sustitución del polinucleótido por otro polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando que codifica para un antígeno diferente o que tiene características de unión diferentes. Por ejemplo, un sitio de restricción, Nhel, se codifica en el sentido de 5' de la secuencia líder; y un Rsrl en 3' ubicado dentro de la región bisagra permite la subclonación de cualquier scFv deseable en un vector de receptor químérico. En casos, el polinucleótido presenta optimización de codones para la expresión en células de

mamífero.

En casos, el polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando está operativamente unido a un péptido señal. En casos, el péptido señal es un péptido señal para factor estimulante de colonias de granulocitos. Pueden usarse polinucleótidos que codifican para otros péptidos señal tales como CD8 alfa.

- 5 En casos, el polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando está operativamente unido a un promotor. Se selecciona un promotor que proporciona expresión del receptor de antígeno químérico en una célula de mamífero. En un caso específico, el promotor es el promotor de factor de crecimiento de elongación (EF-1). Otro ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia de promotor de citomegalovirus (CMV) inmediato temprano. Sin embargo, también pueden usarse otras secuencias de promotor constitutivas, incluyendo el, pero sin limitarse al, promotor temprano de virus del simio 40 (SV40), virus de tumor de mama de ratón (MMTV), promotor de repetición terminal larga (LTR) de virus de inmunodeficiencia humana (VIH), promotor de MuMoLV, un promotor de virus de la leucemia aviar, un promotor inmediato temprano de virus de Epstein-Barr, un promotor de virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, pero sin limitarse al, promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. También se contemplan promotores inducibles. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.
- 10 15 20 25
- Un caso específico de un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando se muestra en la tabla 1 como scFv a partir de un anticuerpo que se une específicamente a CD19, tal como FMC63. Un polinucleótido que codifica para un ligador flexible que incluye los aminoácidos GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 36) separa las cadenas de VH y VL en el scFv. La secuencia de aminoácidos del scFv que incluye el ligador se muestra en la tabla 2 (SEQ ID NO: 11). Se conocen otros anticuerpos que seleccionan CD19 como diana tales como SJ25C1 y HD37. (SJ25C1: Bejcek *et al.* Cancer Res 2005, PMID 162538901; HD37: Pezutto *et al.* JI 1987, PMID 3542437199).

### Espaciador

- 30 35 40 45
- En casos, el ácido nucleico de receptor químérico comprende un polinucleótido que codifica para una región espaciadora. Se ha encontrado sorprendentemente que la longitud de la región espaciadora que se supone que no tiene capacidad de señalización afecta a la eficacia *in vivo* de las células T modificadas para expresar el receptor químérico y se necesita personalizar para moléculas diana individuales para un reconocimiento de células diana o tumorales óptimo. En casos, el ácido nucleico de receptor químérico comprende un polinucleótido que codifica para una región espaciadora personalizable seleccionada de una biblioteca de polinucleótidos que codifican para regiones espaciadoras. En casos, una longitud de espaciador se selecciona basándose en la ubicación del epítopo, afinidad del anticuerpo por el epítopo y/o la capacidad de las células T que expresan el receptor químérico para proliferar *in vitro* y/o *in vivo* en respuesta a un reconocimiento de antígeno.
- 40 45 50 55
- Normalmente una región espaciadora se encuentra entre el dominio de unión a ligando y el dominio transmembrana del receptor químérico. En casos, una región espaciadora proporciona flexibilidad del dominio de unión a ligando, permite altos niveles de expresión en linfocitos. Un receptor químérico específico de CD19 que tiene un dominio espaciador de aproximadamente 229 aminoácidos tuvo menos actividad antitumoral que un receptor químérico específico de CD19 con una región espaciadora corta compuesta sólo por la bisagra de IgG4 modificada. Otros receptores químéricos, tales como los construidos a partir de los scFv de R12 o 2A2, también requieren un espaciador corto para una activación óptima de funciones efectoras de células T, mientras que un receptor químérico construido con el scFv de ROR1 de R11 requiere un dominio espaciador largo de aproximadamente 229 aminoácidos para el reconocimiento tumoral.
- 50 55
- En casos, una región espaciadora tiene al menos aproximadamente de 10 a 229 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 200 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 175 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 150 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 125 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 100 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 75 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 40 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 30 aminoácidos, aproximadamente de 10 a 20 aminoácidos o aproximadamente de 10 a 15 aminoácidos, e incluyendo cualquier número entero entre los puntos de extremo de cualquiera de los intervalos indicados. En casos, una región espaciadora tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos, aproximadamente 119 aminoácidos o menos o aproximadamente 229 aminoácidos o menos.
- 60 65
- En algunos casos, la región espaciadora se deriva a partir de una región bisagra de una molécula de tipo inmunoglobulina. En casos, una región espaciadora comprende la totalidad o una porción de la región bisagra a partir de una IgG1 humana, una IgG2 humana, una IgG3 humana o una IgG4 humana, y puede contener una o más sustituciones de aminoácido. En la tabla 8 se proporcionan secuencias a modo de ejemplo de las regiones bisagra. En casos, una porción de la región bisagra incluye los aminoácidos de bisagra superior encontrados entre la cadena pesada variable y el núcleo, y los aminoácidos de bisagra de núcleo que incluyen una región de poliprolina. Normalmente, la región bisagra superior tiene aproximadamente de 3 a 10 aminoácidos. En algunos casos, la región espaciadora comprende una secuencia de aminoácidos de X<sub>1</sub>PPX<sub>2</sub>P (SEQ ID NO: 1). En casos, X<sub>1</sub> es una cisteína, glicina o arginina y X<sub>2</sub> es una cisteína o una treonina.

- En casos, pueden modificarse secuencias de región bisagra en uno o más aminoácidos con el fin de evitar interacciones estructurales no deseables tales como dimerización. En un caso específico, la región espaciadora comprende una porción de una región bisagra humana modificada a partir de IgG4, por ejemplo, tal como se muestra en la tabla 2 o la tabla 8 (SEQ ID NO: 21). En la tabla 1 se proporciona un representante de un polinucleótido que codifica para una porción de una región bisagra de IgG4 modificada (SEQ ID NO: 4). En casos, una región bisagra puede tener al menos aproximadamente el 90 %, el 92 %, el 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de región bisagra identificada en la tabla 2 o la tabla 8. En un caso específico, una porción de una región bisagra humana a partir de IgG4 tiene una sustitución de aminoácido en los aminoácidos de núcleo de 5 desde CPSP hasta CPPC.
- En algunos casos, se combina la totalidad o una porción de la región bisagra con uno o más dominios de una región constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, puede combinarse una porción de una región bisagra con la totalidad o una porción de un dominio CH2 o CH3 o variante del mismo. En casos, la región espaciadora no incluye la secuencia 10 de región bisagra de 47-48 aminoácidos a partir de CD8alfa o la región espaciadora que consiste en una porción extracelular de la molécula de CD28.
- En casos, una región espaciadora corta tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos y comprende la totalidad o una porción de una secuencia de región bisagra de IgG4 o variante de la misma, una región espaciadora intermedia 15 tiene aproximadamente 119 aminoácidos o menos y comprende la totalidad o una porción de una secuencia de región bisagra de IgG4 y una región de CH3 o variante de las mismas, y un espaciador largo tiene aproximadamente 229 aminoácidos o menos y comprende la totalidad o una porción de una secuencia de región bisagra de IgG4, una región de CH2 y una región de CH3 o variante de las mismas.
- 20 Un polinucleótido que codifica para una región espaciadora puede prepararse fácilmente mediante métodos sintéticos o recombinantes a partir de la secuencia de aminoácidos. En casos, un polinucleótido que codifica para una región espaciadora está operativamente unido a un polinucleótido que codifica para una región transmembrana. En casos, el polinucleótido que codifica para la región espaciadora también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción 25 en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante con el fin de proporcionar una fácil escisión y sustitución del polinucleótido por otro polinucleótido que codifica para una región espaciadora diferente. En casos, el polinucleótido 30 que codifica para la región espaciadora presenta optimización de codones para la expresión en células de mamífero.
- En casos, se proporciona una biblioteca de polinucleótidos, que codifican cada uno para una región espaciadora 35 diferente. En un caso, la región espaciadora se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de región bisagra a partir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o porción de las mismas, una secuencia de región bisagra a partir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en combinación con la totalidad o una porción de una región de CH2 o variante de la misma, una secuencia de región bisagra a partir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en combinación con la totalidad o una porción de una región de 40 CH3 o variante de la misma, y una secuencia de región bisagra a partir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en combinación con la totalidad o una porción de una región de CH2 o variante de la misma, y una región de CH3 o variante de la misma. En casos, una región espaciadora corta es una secuencia de bisagra de IgG4 modificada (SEQ ID NO: 4) que tiene 12 aminoácidos o menos, una secuencia intermedia es una secuencia de bisagra de IgG4 con una secuencia de CH3 que tiene 119 aminoácidos o menos (SEQ ID NO: 49); o una secuencia de bisagra de IgG4 con una región de CH2 y de CH3 que tiene 229 aminoácidos o menos (SEQ ID NO: 50).
- 45 En casos, en el presente documento se describe un método de selección de una región espaciadora para un receptor químérico. Sorprendentemente, algunos constructos de receptor químérico, aunque son eficaces para activar células T y dirigir su destrucción de células tumorales *in vitro*, no fueron eficaces *in vivo*. Además, el perfil de efectos secundarios de las células T modificadas con receptor químérico puede ser tal como para dar como resultado que más 50 células experimenten muerte celular inducida por activación o provocar un aumento de citocinas *in vivo*. En casos, un método comprende proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos de receptor químérico, en el que los ácidos nucleicos de receptor químérico sólo difieren en la región espaciadora; introducir cada uno de los ácidos nucleicos de receptor químérico en una población de linfocitos T independiente; expandir cada población de linfocitos independiente *in vitro*, e introducir cada población de linfocitos en un animal que porta un tumor para determinar la eficacia antitumoral 55 de cada uno de los receptores químéricos cuando se expresan en células T, y seleccionar un receptor químérico que proporciona eficacia antitumoral en comparación con cada una de las otras poblaciones de linfocitos independientes modificadas con cada uno de los otros receptores químéricos.
- Se conocen modelos de animales de diferentes tumores. La eficacia antitumoral puede medirse identificando una 60 disminución en el volumen tumoral, determinando la muerte de animales, persistencia de las células T genéticamente modificadas *in vivo*, activación de células T genéticamente modificadas (por ejemplo, detectando un aumento de la expresión de CD25 y/CD69) y/o proliferación de células T genéticamente modificadas *in vivo*. En un caso, se selecciona un receptor químérico que proporciona la mejor eficacia antitumoral *in vivo* tal como se determina mediante uno o más de estos parámetros. La falta de eficacia antitumoral puede determinarse mediante la falta de persistencia 65 de los linfocitos genéticamente modificados *in vivo*, muerte de animales, un aumento de la apoptosis tal como se mide mediante un aumento de la inducción de caspasa 3 y/o una disminución de la proliferación de linfocitos genéticamente modificados.

- En otros casos, un método para seleccionar un espaciador comprende seleccionar un epítopo de una molécula diana y caracterizar la ubicación del epítopo con respecto a la membrana celular, seleccionar una región espaciadora que es larga o corta dependiendo de la ubicación del epítopo con respecto a la membrana celular, seleccionar un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene una afinidad por el epítopo que es superior o inferior en comparación con un anticuerpo de referencia, y determinar si el constructo de receptor químérico proporciona la proliferación de células T o producción de citocinas potenciadas *in vitro* y/o *in vivo*.
- En algunos casos, si el epítopo diana o porción del mismo está ubicado proximal a la membrana, está ubicado en los primeros 100 aminoácidos de la secuencia lineal del dominio extracelular adyacente al dominio transmembrana. Si el epítopo está ubicado proximal a la membrana, se selecciona un espaciador largo (por ejemplo 229 aminoácidos o menos y más de 119 aminoácidos). En algunos casos, si el epítopo diana está ubicado distal a la membrana, está ubicado en los primeros 150 aminoácidos de la secuencia lineal del extremo terminal de dominio extracelular. Si el epítopo está ubicado distal a la membrana, se selecciona un espaciador intermedio o corto (por ejemplo 119 aminoácidos o menos o 12-15 aminoácidos o menos). Alternativamente, puede determinarse si el epítopo es proximal o distal a la membrana mediante modelado de la estructura tridimensional o basándose en el análisis de la estructura cristalina.
- En algunos casos, se selecciona un receptor químérico que proporciona que al menos el 30 % de las células proliferen a lo largo de dos generaciones *in vitro* y/o *in vivo*. En otros casos no se selecciona un receptor químérico si da como resultado que al menos el 50 % de las células experimenten muerte celular inducida por activación en 72 horas. En casos, se selecciona un espaciador corto (por ejemplo 15 aminoácidos o menos) si el epítopo es distal a la membrana. En casos, se selecciona un espaciador largo (por ejemplo 229 aminoácidos o menos y más de 119 aminoácidos) si el epítopo es proximal a la membrana.
- En casos, proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos de receptor químérico, en la que los ácidos nucleicos de receptor químérico sólo difieren en la región espaciadora, comprende proporcionar un constructo de receptor químérico que comprende un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando, en el que el ligando es un antígeno específico de tumor, antígeno viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana que es adecuada para mediar en el reconocimiento y la eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica para un primer espaciador de polipéptido que tiene un sitio de restricción definido en el extremo 5' y 3' de la secuencia codificante para el primer espaciador de polipéptido; un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana; y un polinucleótido que codifica para uno o más dominios de señalización intracelulares.
- En casos, un método comprende además proporcionar uno o más polinucleótidos, que codifican cada uno para una región espaciadora diferente. En casos, las diferentes regiones espaciadoras se seleccionan del grupo que consiste en una secuencia de región bisagra a partir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o variante de la misma o porción de la misma, una secuencia de región bisagra a partir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en combinación con la totalidad o una porción de una región de CH2 o variante de la misma, una secuencia de región bisagra a partir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en combinación con la totalidad o una porción de una región de CH3 o variante de la misma, y una secuencia de región bisagra a partir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en combinación con la totalidad o una porción de una región de CH2 o variante de la misma y una región de CH3 o variante de la misma. En casos, las regiones de CH2 o CH3 pueden modificarse mediante una o más delecciones o sustituciones de aminoácido con el fin de proporcionar la expresión en linfocitos y/o con el fin de minimizar interacciones con otras moléculas. En casos, una porción de una región bisagra comprende al menos los aminoácidos superiores y la secuencia de núcleo. En casos, una región bisagra comprende la secuencia X<sub>1</sub>PPX<sub>2</sub>P.
- En casos, un método comprende además sustituir el polinucleótido que codifica para la región espaciadora por un polinucleótido que codifica para una región espaciadora diferente para formar un ácido nucleico de receptor químérico con una región espaciadora diferente. El método puede repetirse para formar cualquier número de ácidos nucleicos de receptor químérico, que difieren cada uno en la región espaciadora. En casos, los ácidos nucleicos de receptor químérico sólo difieren unos de otros en la región espaciadora.
- Dominio transmembrana**
- En casos, el ácido nucleico de receptor químérico comprende un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana. El dominio transmembrana proporciona el anclaje del receptor químérico en la membrana.
- En un caso, se usa el dominio transmembrana que está asociado de manera natural con uno de los dominios en el receptor químérico. En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse mediante sustitución de aminoácido para evitar la unión de tales dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar interacciones con otros miembros del complejo de receptor.
- El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente o bien natural o bien sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana

comprenden al menos la(s) región/regiones transmembrana de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3, CD45, CD4, CD8, CD9, CD16, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En un caso específico, el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana de CD28 tal como se muestra en la tabla 2. En la tabla 1 se muestra una secuencia de polinucleótido representativa que codifica para el dominio transmembrana de CD28 (SEQ ID NO: 5).

Un dominio transmembrana puede ser sintético o una variante de un dominio transmembrana que se produce de manera natural. En casos, los dominios transmembrana sintéticos o variantes comprenden residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. En casos, un dominio transmembrana puede tener al menos aproximadamente el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a un dominio transmembrana tal como se muestra en la tabla 2 o la tabla 6. Los dominios transmembrana variantes tienen preferiblemente una puntuación de hidrofobicidad de al menos 50 tal como se calcula mediante Kyte Doolittle.

Un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana puede prepararse fácilmente mediante métodos sintéticos o recombinantes. En casos, un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana está unido operativamente a un polinucleótido que codifica para una región de señalización intracelular. En casos, el polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante con el fin de proporcionar una fácil escisión y sustitución del polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana por otro polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana diferente. En casos, el polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana presenta optimización de codones para la expresión en células de mamífero.

#### Dominio de señalización intracelular

En casos, el ácido nucleico de receptor químérico comprende un polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular proporciona la activación de una función de la célula transducida que expresa el receptor químérico tras la unión al ligando expresado en células tumorales. En casos, el dominio de señalización intracelular contiene uno o más dominios de señalización intracelulares. En casos, el dominio de señalización intracelular es una porción de y/o una variante de un dominio de señalización intracelular que proporciona la activación de al menos una función de la célula transducida.

Los ejemplos de dominios de señalización intracelulares para su uso en un receptor químérico tal como se describe incluyen las secuencias citoplásmicas de la cadena de CD3 zeta y/o correceptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales tras el acoplamiento del receptor químérico, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tiene la misma capacidad funcional. Puede decirse que la activación de células T está mediada por dos clases diferenciadas de secuencia de señalización citoplásmica: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno y proporcionan una señal de tipo receptor de células T (secuencias de señalización citoplásmicas primarias) y las que actúan de una manera independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplásmicas secundarias). Las secuencias de señalización citoplásmicas primarias que actúan de una manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina receptora o ITAM. Los ejemplos de secuencias de señalización citoplásmicas primarias que contienen ITAM incluyen las derivadas de CD3 zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En casos, el dominio intracelular de señalización primario puede tener al menos aproximadamente el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con respecto a CD3zeta que tiene una secuencia proporcionada en la tabla 2. En casos, variantes de CD3 zeta conservan al menos una, dos, tres o todas las regiones de ITAM tal como se muestra en la tabla 7.

En un caso preferido, el dominio de señalización intracelular del receptor químérico puede diseñarse para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta en sí mismo o combinado con cualquier otro dominio citoplásmico deseado. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular del receptor químérico puede comprender una cadena de CD3zeta y una región de señalización coestimuladora.

La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del receptor químérico que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta de linfocitos frente a un antígeno. Los ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), oX40, CD30, CD40, antígeno asociado a función de linfocitos 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente a CD83. En casos, el dominio de señalización coestimulador puede tener al menos aproximadamente el 80 %, el 85 %, el 90 % o el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto al dominio intracelular de CD28 tal como se muestra en la tabla 5 o con respecto a 4-1BB que tiene una secuencia proporcionada en la tabla 2. En un caso, una variante del dominio intracelular de CD28 comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones 186-187, en la que se sustituye LL por GG.

Las secuencias de señalización intracelulares del receptor químérico pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un ligador de oligo o polipéptido corto, preferiblemente de entre 2 y 10

aminoácidos de longitud, puede formar la unión. En un caso, los dominios de señalización intracelulares comprenden la totalidad o una porción del dominio de señalización de CD3-zeta o variante del mismo y la totalidad o una porción del dominio de señalización de CD28 o una variante del mismo. En otro caso, el dominio de señalización intracelular comprende la totalidad o una porción del dominio de señalización de CD3-zeta o variante del mismo y la totalidad o una porción del dominio de señalización de 4-1BB o variante del mismo. En aún otro caso, el dominio de señalización intracelular comprende la totalidad o una porción del dominio de señalización de CD3-zeta o variante del mismo, la totalidad o una porción del dominio de señalización de CD28 o variante del mismo y la totalidad o una porción del dominio de señalización de 4-1BB o variante del mismo. En un caso específico, la secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular que comprende una variante de CD3zeta y una porción del dominio de señalización intracelular de 4-1BB se proporciona en la tabla 2. En la tabla 1 se proporciona una secuencia de ácido nucleico representativa (SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7).

En un caso, un polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular comprende un dominio de intracelular de 4-1BB unido a una porción de un dominio de CD3zeta. En otros casos, un dominio de intracelular de 4-1BB y un dominio intracelular de CD28 están unidos a una porción de un dominio de CD3 zeta.

Un polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular puede prepararse fácilmente mediante métodos sintéticos o recombinantes a partir de la secuencia de aminoácidos. En casos, el polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante con el fin de proporcionar una fácil escisión y sustitución del polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular por otro polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular diferente. En casos, el polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular presenta optimización de codones para la expresión en células de mamífero.

## **25 Secuencias marcadoras**

En casos, el ácido nucleico de receptor químérico comprende opcionalmente además una secuencia de polinucleótido que codifica para una secuencia marcadora. Una secuencia marcadora puede proporcionar la selección de células transducidas y la identificación de células transducidas. En casos, la secuencia marcadora está operativamente unida a una secuencia de polinucleótido que codifica para una secuencia de ligador. En casos, la secuencia de ligador es una secuencia de ligador escindible.

Pueden emplearse varias secuencias marcadoras diferentes. Normalmente una secuencia marcadora tiene una característica funcional que permite la selección de células transducidas y/o la detección de células transducidas. En casos, la secuencia marcadora es compatible con la transducción de linfocitos humanos.

El marcador seleccionable positivo puede ser un gen, que, tras introducirse en la célula huésped, expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de células que portan el gen. En la técnica se conocen genes de este tipo, e incluyen, entre otros, gen de higromicina B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia frente a higromicina B, el gen de amino glicósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5 que codifica para resistencia frente al antibiótico G418, el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de adenosina desaminasa (ADA) y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR).

En un caso, un ácido nucleico de receptor químérico comprende además un polinucleótido que codifica para una secuencia marcadora. En un caso, la secuencia marcadora es un receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado tal como se muestra en la tabla 2. Un polinucleótido a modo de ejemplo para el receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado se muestra en la tabla 1 (SEQ ID NO: 9). En casos, el polinucleótido que codifica para la secuencia marcadora está operativamente unido a un polinucleótido que codifica para una secuencia de ligador. En un caso específico, la secuencia de ligador es una secuencia de ligador escindible T2A tal como se muestra en la tabla 2. Una secuencia de polinucleótido a modo de ejemplo que codifica para el ligador T2A se proporciona en la tabla 1 (SEQ ID NO: 8).

Un polinucleótido que codifica para secuencia marcadora puede prepararse fácilmente mediante métodos sintéticos o recombinantes a partir de la secuencia de aminoácidos. En casos, un polinucleótido que codifica para una secuencia marcadora está operativamente unido a un polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular. En casos, el polinucleótido que codifica para una secuencia marcadora también puede tener uno o más sitios de enzimas de restricción en los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante con el fin de proporcionar una fácil escisión y sustitución del polinucleótido que codifica para una secuencia marcadora por otro polinucleótido que codifica para una secuencia marcadora diferente. En casos, el polinucleótido que codifica para una secuencia marcadora presenta optimización de codones para la expresión en células de mamífero.

## **Vectores, células y métodos de transducción de células**

### **Selección y clasificación de poblaciones de linfocitos T**

Las composiciones descritas en el presente documento proporcionan linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup>. Pueden recogerse

linfocitos T según técnicas conocidas y enriquecerse o agotarse mediante técnicas conocidas tales como unión por afinidad a anticuerpos tales como citometría de flujo y/o selección inmunomagnética. Tras las etapas de enriquecimiento y/o agotamiento, puede llevarse a cabo la expansión *in vitro* de los linfocitos T deseados según técnicas conocidas (incluyendo, pero sin limitarse a, las descritas en la patente estadounidense n.º 6.040.177 a nombre de Riddell *et al.*) o variaciones de las mismas que resultarán evidentes para los expertos en la técnica. En casos, las

5 células T son células T autólogas obtenidas a partir del paciente.

Por ejemplo, la población o subpoblación de células T deseada puede expandirse añadiendo una población de 10 linfocitos T inicial a un medio de cultivo *in vitro* y después añadiendo al medio de cultivo células alimentadoras, tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no en división (por ejemplo, de tal manera que la población resultante de células contiene al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras PBMC por cada linfocito T en la población inicial que va a expandirse); e incubar el cultivo (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para expandir los números de células T). Las células alimentadoras no en división pueden comprender células alimentadoras PBMC irradiadas por radiación gamma. En algunos casos, las PBMC se irradian con radiación gamma 15 en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rad para prevenir la división celular. El orden de adición de las células T y las células alimentadoras a los medios de cultivo puede invertirse si se desea. El cultivo puede incubarse normalmente en condiciones de temperatura y similares que son adecuadas para el crecimiento de linfocitos T. Para 20 el crecimiento de linfocitos T humanos, por ejemplo, la temperatura será generalmente de al menos aproximadamente 25 grados Celsius, preferiblemente al menos aproximadamente 30 grados, de manera más preferible aproximadamente 37 grados.

Los linfocitos T expandidos incluyen linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8<sup>+</sup> y linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> que pueden ser específicos para un antígeno presente en un tumor humano o un patógeno.

25 Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir células linfoblastoides (LCL) transformadas por VEB no en división como células alimentadoras. Pueden irradiarse LCL con radiación gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras LCL pueden proporcionarse en cualquier cantidad adecuada, tal como una razón de células alimentadoras LCL con respecto a linfocitos T iniciales de al menos 30 aproximadamente 10:1.

Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28 al medio de cultivo (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/ml). Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además la etapa de añadir IL-2 y/o IL-15 al medio de cultivo (por ejemplo, en el que la concentración de IL-2 es de al menos aproximadamente 10 unidades/ml).

35 Tras el aislamiento de linfocitos T pueden clasificarse linfocitos T tanto citotóxicos como cooperadores en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectoras o bien antes o bien después de la expansión.

40 Pueden obtenerse células CD8<sup>+</sup> usando métodos convencionales. En algunos casos, las células CD8<sup>+</sup> se clasifican además en células vírgenes, de memoria central y de memoria efectora identificando antígenos de superficie celular que están asociados con cada uno de estos tipos de células CD8<sup>+</sup>. En casos, están presentes células T de memoria en subconjuntos tanto CD62L<sup>+</sup> como CD62L<sup>-</sup> de linfocitos de sangre periférica CD8<sup>+</sup>. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L-CD8<sup>+</sup> y CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> tras la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunos casos, la expresión de marcadores fenotípicos de Tcm de memoria central incluyen CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y 45 CD127 y son negativos para, o tienen una cantidad baja de, granzima B. En algunos casos, las células T de memoria central son células T CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>. En algunos casos, los Te efectores son negativos para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivos para granzima B y perforina. En algunos casos, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes se caracterizan por la expresión de marcadores fenotípicos de células T vírgenes incluyendo CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 y CD45RA.

50 Puede determinarse si una célula o población celular es positiva para un marcador de superficie celular particular mediante citometría de flujo usando tinción con un anticuerpo específico para el marcador de superficie y un anticuerpo de control de isotipo coincidente. Una población celular negativa para un marcador se refiere a la ausencia de tinción significativa de la población celular con el anticuerpo específico por encima del control de isotipo, positivo se refiere a tinción uniforme de la población celular por encima del control de isotipo. En algunos casos, una disminución de la expresión de uno o más marcadores se refiere a la pérdida de 1 log10 en la intensidad de fluorescencia media y/o disminución del porcentaje de células que muestran el marcador de al menos aproximadamente el 20 % de las células, el 25 % de las células, el 30 % de las células, el 35 % de las células, el 40 % de las células, el 45 % de las células, el 50 % de las células, el 55 % de las células, el 60 % de las células, el 65 % de las células, el 70 % de las células, el 75 % de las células, el 80 % de las células, el 85 % de las células, el 90 % de las células, el 95 % de las células y el 100 % de las células y cualquier % entre el 20 y el 100 % en comparación con una población celular de referencia. En algunos casos, una población celular positiva para uno o más marcadores se refiere a un porcentaje de células que muestran el marcador de al menos aproximadamente el 50 % de las células, el 55 % de las células, el 60 % de las células, el 65 % de las células, el 70 % de las células, el 75 % de las células, el 80 % de las células, el 85 % de las células, el 90 % de las células, el 95 % de las células y el 100 % de las células y cualquier % entre el 50 y el 100 % en comparación con una población celular de referencia.

Las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup> se clasifican en células vírgenes, de memoria central y efectoras identificando poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Pueden obtenerse linfocitos CD4<sup>+</sup> mediante métodos convencionales. En algunos casos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes son células T CD45RO<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>.

- 5 En algunos casos, las células CD4<sup>+</sup> de memoria central son CD62L<sup>+</sup> y CD45RO<sup>+</sup>. En algunos casos, las células CD4<sup>+</sup> efectoras son CD62L<sup>-</sup> y CD45RO<sup>-</sup>.

- 10 En casos, pueden obtenerse poblaciones de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que son específicas de antígeno estimulando con antígeno linfocitos T vírgenes o específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden generarse líneas o clones de células T específicas de antígeno frente a antígenos de citomegalovirus aislando células T a partir de sujetos infectados y estimulando las células *in vitro* con el mismo antígeno. También pueden usarse células T vírgenes. Puede usarse cualquier número de antígenos a partir de células tumorales como dianas para provocar respuestas de células T. En algunos casos, las composiciones de inmunoterapia celular adoptiva son útiles en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno incluyendo un tumor sólido, neoplasia maligna hematológica, cáncer de mama o melanoma.

- 15 **Modificación de poblaciones de linfocitos T**

En algunos casos puede desearse introducir genes funcionales en las células T que van a usarse en inmunoterapia. Por ejemplo, el gen o los genes introducidos pueden mejorar la eficacia de la terapia fomentando la viabilidad y/o función de células T transferidas; o pueden proporcionar un marcador genético para permitir la selección y/o evaluación de supervivencia o migración *in vivo*; o pueden incorporar funciones que mejoran la seguridad de la inmunoterapia, por ejemplo, haciendo que la célula sea propensa a selección negativa *in vivo* tal como se describe por Lupton S. D. *et al.*, Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); y Riddell *et al.*, Human Gene Therapy 3:319-338 (1992); véanse también las publicaciones de PCT/LTS91/08442 y PCT/US94/05601 de Lupton *et al.* que describen el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados a partir de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Esto puede llevarse a cabo según técnicas conocidas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.040.177 a nombre de Riddell *et al.* en las columnas 14-17) o variaciones de las mismas que resultarán evidentes para los expertos en la técnica basándose en la presente divulgación.

- 30 En casos, se modifican células T con receptores químéricos tal como se describe en el presente documento. En algunos casos, las células T se obtienen a partir del sujeto que va a tratarse, en otros casos, los linfocitos se obtienen a partir de donantes humanos alogénicos, preferiblemente donantes humanos sanos.

35 En algunos casos, los receptores químéricos comprenden un dominio de unión a ligando que se une específicamente a una molécula de superficie de célula tumoral, una región espaciadora de polipéptido, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular tal como se describe en el presente documento. En casos, el dominio de unión a ligando es un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que se deriva a partir de las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de un anticuerpo monoclonal (AcM). También pueden proporcionarse señales coestimuladoras a través del receptor químérico fusionando el dominio coestimulador de CD28 y/o 4-1BB a la cadena de CD3ζ. Los receptores químéricos son específicos para moléculas de superficie celular independientes de HLA, superando por tanto las limitaciones del reconocimiento de TCR incluyendo restricción de HLA y bajos niveles de expresión de HLA en células tumorales.

40 45 Pueden construirse receptores químéricos con una especificidad por cualquier marcador de superficie celular usando fragmentos de unión a antígeno o dominios variables de anticuerpo, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo. Las moléculas de unión a antígeno pueden unirse a uno o más módulos de señalización celular. En casos, los módulos de señalización celular incluyen dominio transmembrana de CD3, dominios de señalización intracelulares de CD3 y dominios transmembrana de CD28. En casos, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana y de señalización de CD28 unido a un dominio intracelular de CD3 zeta. En algunos casos, un receptor químérico también puede incluir un marcador de transducción tal como tEGFR.

50 55 En casos, puede introducirse el mismo receptor químérico o uno diferente en cada de población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. En casos, el receptor químérico en cada una de estas poblaciones tiene un dominio de unión a ligando que se une específicamente al mismo ligando en la célula tumoral o infectada. Los módulos de señalización celular pueden diferir. En casos, el dominio de señalización intracelular de las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> es el mismo que el dominio de señalización intracelular de las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup>. En otros casos, el dominio de señalización intracelular de las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> es diferente del dominio de señalización intracelular de las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup>.

60 65 En casos, cada uno de los linfocitos T CD4 o CD8 puede clasificarse en células vírgenes, de memoria central, de memoria efectora o efectoras antes de la transducción tal como se describe en el presente documento. En casos alternativos, cada uno de los linfocitos T CD4 o CD8 puede clasificarse en células vírgenes, de memoria central, de memoria efectora o efectoras tras la transducción.

65 Se han desarrollado diversas técnicas de transducción que usan partículas de virus infecciosas recombinantes para la administración génica. Esto representa un enfoque actualmente preferido a la transducción de linfocitos T. Los

- vectores virales que se han usado de esta manera incluyen vectores de virus derivados a partir de virus del simio 40, adenovirus, virus adenoasociados (VAA), vectores lentivirales y retrovirus. Por tanto, los métodos de transferencia y expresión génica son numerosos pero funcionan esencialmente para introducir y expresar material genético en células de mamífero. Varias de las técnicas anteriores se han usado para transducir células hematopoyéticas o linfoides, 5 incluyendo transfección de fosfato de calcio, fusión de protoplasto, electroporación e infección con vectores de adenovirus recombinante, virus adenoasociado y retrovirus. Se han transducido satisfactoriamente linfocitos T primarios mediante electroporación y mediante infección retroviral o lentiviral.
- Los vectores retrovirales y lentivirales proporcionan un método altamente eficiente para la transferencia génica en 10 células eucariotas. Además, la integración retroviral o lentiviral tiene lugar de una manera controlada y da como resultado la integración estable de una o unas pocas copias de la nueva información genética por célula.
- Se contempla que la sobreexpresión de un factor estimulante (por ejemplo, una linfocina o una citocina) puede ser 15 tóxica para el individuo tratado. Por tanto, se pueden incluir segmentos génicos que provocan que las células T sean propensas a selección negativa *in vivo*. Por "selección negativa" quiere decirse que la célula infundida puede eliminarse como resultado de un cambio en la condición *in vivo* del individuo. El fenotipo seleccionable negativo puede resultar de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. En la técnica 20 se conocen genes seleccionables negativos e incluyen, entre otros, los siguientes: el gen de timidina cinasa de virus del herpes simple tipo I (TK de VHS-I), que confiere sensibilidad a ganciclovir; el gen de hipoxantina fosfribosiltransferasa celular (HPRT), el gen de adenina fosforibosiltransferasa celular (APRT) y citosina desaminasa bacteriana.
- En algunos casos puede ser útil incluir en las células T un marcador positivo que permite la selección de células del 25 fenotipo seleccionable negativo *in vitro*. El marcador seleccionable positivo puede ser un gen que, tras introducirse en la célula huésped expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de células que portan el gen. En la técnica se conocen genes de este tipo e incluyen, entre otros, gen de higromicina B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia frente a higromicina B, el gen de amino glicósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5 que codifica para resistencia frente al antibiótico G418, el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de adenosina desaminasa (ADA) y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR).
- 30 Puede emplearse una variedad de métodos para transducir linfocitos T, tal como se conoce bien en la técnica. En casos, la transducción se lleva a cabo usando vectores lentivirales.
- En casos, pueden modificarse células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, cada una por separado, con un vector de expresión que codifica 35 para un receptor químérico para formar poblaciones definidas. En casos, después se clasifican adicionalmente estas células en subpoblaciones de células vírgenes, de memoria central y efectoras tal como se describió anteriormente mediante clasificación para detectar抗ígenos de superficie celular únicos para cada una de estas poblaciones celulares. Además, pueden seleccionarse poblaciones celulares CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> mediante su perfil de citocinas o 40 actividades proliferativas. Por ejemplo, pueden seleccionarse linfocitos T CD4<sup>+</sup> que tienen una producción de citocinas potenciada tales como IL-2, IL-4, IL-10, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en comparación con células transducidas de manera simulada o células CD8<sup>+</sup> transducidas cuando se estimulan con antígeno. En otros casos, se seleccionan células T CD4<sup>+</sup> vírgenes o de memoria central que tienen una producción potenciada de IL-2 y/o TNF $\alpha$ . Asimismo, se seleccionan células CD8<sup>+</sup> que tienen una producción de IFN $\gamma$  potenciada en comparación con células CD8<sup>+</sup> transducidas de manera simulada.
- 45 En casos, se seleccionan células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que proliferan en respuesta a dianas de antígeno o tumor. Por ejemplo, se seleccionan células CD4<sup>+</sup> que proliferan de manera vigorosa cuando se estimulan con dianas de antígeno o tumor en comparación con células transducidas de manera simulada, o células transducidas CD8<sup>+</sup>. En algunos casos, se seleccionan células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que son citotóxicas para células portadoras de antígeno. En casos, se espera que las células CD4<sup>+</sup> sean débilmente citotóxicas en comparación con las CD8<sup>+</sup>.
- 50 En un caso preferido, se seleccionan linfocitos transducidos, tales como células de memoria central CD8<sup>+</sup>, que proporcionan destrucción de células tumorales *in vivo* usando un modelo animal establecido para el tipo particular de cáncer. Los expertos en la técnica conocen tales modelos de animal y excluyen a seres humanos. Tal como se describe en el presente documento, no todos los constructos de receptor químérico transducidos en linfocitos confieren 55 la capacidad de destruir células tumorales *in vivo* a pesar de la capacidad de activarse y destruir células tumorales *in vitro*. En particular, para algunas moléculas diana, células T que tenían constructos de receptor químérico con una región espaciadora largo fueron menos eficaces en la destrucción de células tumorales *in vivo* en comparación con células T que tenían un receptor químérico con región espaciadora corto. Para otras moléculas diana, células T que tenían constructos de receptor químérico con una región espaciadora corto fueron menos eficaces en la destrucción 60 de células tumorales *in vivo* en comparación con células T que tenían receptores químéricos con una región espaciadora largo.
- En aún otros casos, se seleccionan células T que expresan receptor químérico transducidas que pueden persistir *in vivo* usando un modelo animal establecido para el tipo particular de cáncer. En casos, se ha mostrado que células de memoria central CD8<sup>+</sup> de receptor químérico transducidas con una región espaciadora corto persisten *in vivo* tras la introducción en el animal durante aproximadamente 3 días o más, 10 días o más, 20 días o más, 30 días o más, 40

días o más o 50 días o más.

Se contempla que se usarán combinaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en las composiciones tal como se describen. En un caso, pueden combinarse combinaciones de células CD4<sup>+</sup> transducidas de receptor químico con células CD8<sup>+</sup>

5 transducidas de receptor químico de la misma especificidad de ligando o combinarse con células T CD8<sup>+</sup> que son específicas para un ligando tumoral distinto. En otros casos, se combinan células CD8<sup>+</sup> transducidas de receptor químico con células CD4<sup>+</sup> transducidas de receptor químico específicas para un ligando diferente expresado en el tumor. En aún otro caso, se combinan células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> modificadas con receptor químico. En casos pueden combinarse células CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en diferentes razones, por ejemplo, una razón 1:1 de CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, una razón de 10:1 de CD8<sup>+</sup> con respecto a CD4<sup>+</sup>, o una razón de 100:1 de CD8<sup>+</sup> con respecto a CD4<sup>+</sup>. En casos, se somete a prueba la población combinada para determinar la proliferación celular *in vitro* y/o *in vivo*, y se selecciona la razón de células que proporciona proliferación de células.

10 Se contempla que pueden separarse adicionalmente células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en subpoblaciones, tales como poblaciones celulares vírgenes, de memoria central y de memoria efectora. Tal como se describe en el presente documento, en algunos casos, las células CD4<sup>+</sup> vírgenes son células T positivas CD45RO<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>. En algunos casos, las células CD4<sup>+</sup> de memoria central son positivas para CD62L y positivas para CD45RO. En algunos casos, las células CD4<sup>+</sup> efectoras son negativas para CD62L y positivas para CD45RO. Cada una de estas poblaciones puede modificarse independientemente con un receptor químico.

15 20 Tal como se describe en el presente documento, en casos, están presentes células T de memoria en subconjuntos tanto CD62L<sup>+</sup> como CD62L<sup>-</sup> de linfocitos de sangre periférica CD8<sup>+</sup>. Las PBMC se clasifican en fracciones CD62L<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> y CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> tras la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunos casos, la expresión de marcadores fenotípicos de células T de memoria central (T<sub>CM</sub>) incluyen CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativas para, o tienen una cantidad baja de, granzima B. En algunos casos, las células T de memoria central son células T CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>. En algunos casos, las células T efectoras (T<sub>E</sub>) son negativas para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivas para granzima B y perforina. En algunos casos, los linfocitos T cD8<sup>+</sup> vírgenes se caracterizan por CD8<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> y CD45RO<sup>+</sup>. Cada una de estas poblaciones puede modificarse independientemente con un receptor químico.

25 30 35 Tras la transducción y/o selección de células portadoras de receptor químico, preferiblemente se expanden las poblaciones celulares *in vitro* hasta que se obtiene un número suficiente de células para proporcionar al menos una infusión en un sujeto humano, normalmente de aproximadamente 10<sup>4</sup> células/kg a 10<sup>9</sup> células/kg. En casos, las células transducidas se cultivan en presencia de células portadoras de antígeno, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD28, e IL 2, IL-7, IL 15, IL-21 y combinaciones de los mismos.

40 Cada una de las subpoblaciones de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> puede combinarse entre sí. En un caso específico, se combinan células CD4<sup>+</sup> vírgenes o de memoria central modificadas con células T CD8<sup>+</sup> de memoria central modificadas para proporcionar un efecto citotóxico sinérgico sobre células portadoras de antígeno, tales como células tumorales.

#### Composiciones

45 Se divulga una composición de inmunoterapia celular adoptiva que comprende una preparación celular de linfocitos T genéticamente modificados tal como se describe en el presente documento.

50 55 En casos, la preparación celular de linfocitos T comprende células T CD4<sup>+</sup> que tienen un receptor químico que comprende un dominio extracelular variable de anticuerpo específico para un ligando asociado con la enfermedad o el trastorno, una región espaciadora personalizable, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de células T u otros receptores tal como se describe en el presente documento. En otros casos, una composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende además una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> específicos de tumor modificados con receptor químico que proporciona una respuesta inmunitaria celular, en la que la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende células T CD8<sup>+</sup> que tienen un receptor químico que comprende un anticuerpo de cadena sencilla extracelular específico para un ligando asociado con la enfermedad o el trastorno, una región espaciadora personalizable, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de células T tal como se describe en el presente documento. En casos, la población de células T modificadas con receptor químico de la divulgación puede persistir *in vivo* durante al menos aproximadamente 3 días o más.

60 65 En algunos casos, una composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> específicos de tumor modificados con receptor químico que proporciona una respuesta inmunitaria celular, en la que la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende células T CD8<sup>+</sup> que tienen un receptor químico que comprende un anticuerpo de cadena sencilla extracelular específico para un ligando asociado con la enfermedad o el trastorno, una región espaciadora personalizable, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de células T, en combinación con una célula cooperadora T CD4<sup>+</sup> virgen modificada con receptor químico reactivo frente a antígeno derivada a partir de células T CD45RO<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- En otros casos, una composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende una preparación celular de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno que proporciona una respuesta inmunitaria celular derivada a partir del paciente en combinación con una célula cooperadora T CD4<sup>+</sup> virgen modificada con receptor químérico reactivo frente a un antígeno que aumenta la respuesta inmunitaria CD8<sup>+</sup>, en la que la preparación celular de linfocitos T cooperadores comprende células T CD4<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio extracelular variable de anticuerpo específico para el antígeno asociado con la enfermedad o el trastorno, una región espaciadora personalizable, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de células T.
- 5 En un caso adicional, una composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende una célula cooperadora T CD4<sup>+</sup> virgen modificada con receptor químérico reactivo frente a un antígeno que aumenta la respuesta inmunitaria CD8<sup>+</sup>, en la que la preparación celular de linfocitos T cooperadores comprende células T CD4<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio extracelular variable de anticuerpo específico para un ligando asociado con una enfermedad o un trastorno, una región espaciadora personalizable, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de células T.
- 10 En un caso adicional, una composición de inmunoterapia celular adoptiva comprende una célula cooperadora T CD4<sup>+</sup> virgen modificada con receptor químérico reactivo frente a un antígeno que aumenta la respuesta inmunitaria CD8<sup>+</sup>, en la que la preparación celular de linfocitos T cooperadores comprende células T CD4<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio extracelular variable de anticuerpo específico para un ligando asociado con una enfermedad o un trastorno, una región espaciadora personalizable, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un receptor de células T.
- 15

En casos, la célula de linfocito cooperador T CD4<sup>+</sup> se selecciona del grupo que consiste en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes, células T CD4<sup>+</sup> de memoria central, células T CD4<sup>+</sup> de memoria efectora o células T CD4<sup>+</sup> a granel. En algunos casos, la célula de linfocito cooperador CD4<sup>+</sup> es una célula T CD4<sup>+</sup> virgen, en la que la célula T CD4<sup>+</sup> virgen comprende una célula T CD45RO<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>. En casos, la célula de linfocito citotóxico T CD8<sup>+</sup> se selecciona del grupo que consiste en células T CD8<sup>+</sup> vírgenes, células T CD8<sup>+</sup> de memoria central, células T CD8<sup>+</sup> de memoria efectora o células T CD8<sup>+</sup> a granel. En algunos casos, la célula de linfocito T citotóxico CD8<sup>+</sup> es una célula T de memoria central en la que la célula T de memoria central comprende una célula T CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>. En aún otros casos, la célula de linfocito T citotóxico CD8<sup>+</sup> es una célula T de memoria central y la célula de linfocito T cooperador CD4<sup>+</sup> es una célula T CD4<sup>+</sup> virgen o de memoria central.

### Métodos

- 30 Se divultan métodos de producción de composiciones de inmunoterapia adoptiva y usos o métodos de uso de estas composiciones para realizar inmunoterapia celular en un sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno. En casos, las células T modificadas con receptor químérico tal como se describe en el presente documento son capaces de persistir *in vivo* durante al menos 3 días o al menos 10 días. En casos, las células T modificadas con receptor químérico tal como se describe en el presente documento pueden proliferar *in vivo* a lo largo de menos 2 o al menos 3 generaciones tal como se determina mediante dilución de colorante de CFSE. La proliferación y persistencia de las células T modificadas con receptor químérico pueden determinarse usando un modelo animal de la enfermedad o el trastorno y administrando las células y determinando persistencia y/o capacidad proliferativa de las células transferidas. En otros casos, la proliferación y activación pueden someterse a prueba *in vitro* pasando a través de múltiples ciclos de activación con células portadoras de antígeno.
- 35
- 40 En casos, un método de fabricación de las composiciones comprende obtener una célula cooperadora T CD4<sup>+</sup> virgen modificada, en el que la preparación celular de linfocitos T cooperadores modificados comprende células T CD4<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie de célula tumoral, un dominio espaciador personalizado, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular tal como se describe en el presente documento.
- 45
- 50 En otro caso, un método comprende además obtener una célula T citotóxica CD8<sup>+</sup> modificada, en el que la preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificadas comprende células CD8<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie de célula tumoral, un dominio espaciador personalizado, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular tal como se describe en el presente documento.
- 55
- 60 En otro caso, un método comprende obtener una célula T citotóxica CD8<sup>+</sup> modificada, en el que la preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificadas comprende células T CD8<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie de célula tumoral, un dominio espaciador personalizado, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular tal como se describe en el presente documento, y que comprende además combinar las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> modificadas con una preparación celular de linfocitos de células cooperadoras CD4<sup>+</sup>.
- 65 La preparación de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que están modificadas con un receptor químérico se ha descrito anteriormente así como en los ejemplos. Pueden obtenerse linfocitos T específicos de antígeno a partir de un paciente que tiene la enfermedad o el trastorno o pueden prepararse mediante estimulación *in vitro* de linfocitos T en presencia de antígeno. También pueden aislarse subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que no se seleccionan para especificidad de antígeno tal como se describe en el presente documento y combinarse en los métodos de fabricación. En casos, la combinación de poblaciones celulares puede evaluarse para determinar la uniformidad de marcadores de superficie celular, la capacidad para proliferar a lo largo de al menos dos generaciones, para tener un estado de diferenciación celular uniforme. Puede realizarse control de calidad cultivando conjuntamente una línea celular que

- expresa el ligando diana con células T modificadas con receptor químérico para determinar si las células T modificadas con receptor químérico reconocen la línea celular usando ensayos de citotoxicidad, proliferación o producción de citocinas que se conocen en el campo. El estado de diferenciación celular y marcadores de superficie celular en las células T modificadas con receptor químérico pueden determinarse mediante citometría de flujo. En casos, los marcadores y el estado de diferenciación celular en las células CD8<sup>+</sup> incluyen CD3, CD8, CD62L, cCD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4, CD45RO y CD45RA. En casos, los marcadores y el estado de diferenciación celular en las células CD4<sup>+</sup> incluyen CD3, CD4, CD62L, CD28, CD27, CD69, CD25, PD-1, CTLA-4 CD45RO y CD45RA.
- En casos, en el presente documento se describe un método de selección de una región espaciadora para un receptor químérico. Sorprendentemente, algunos constructos de receptor químérico, aunque eficaces para activar células T *in vitro*, no fueron eficaces *in vivo*. En casos, un método comprende proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos de receptor químérico, en el que los ácidos nucleicos de receptor químérico sólo difieren en la región espaciadora; introducir cada uno de los ácidos nucleicos de receptor químérico en una población de linfocitos T independiente; expandir cada población de linfocitos independiente *in vitro*, e introducir cada población de linfocitos en un animal que porta un tumor para determinar la eficacia antitumoral de cada una de las células T modificadas con receptor químérico, y seleccionar un receptor químérico que proporciona eficacia antitumoral en comparación con cada una de las otras poblaciones de linfocitos independientes modificadas con cada una de las otras células T modificadas con receptor químérico.
- Se conocen modelos de animales de diferentes tumores. La eficacia antitumoral puede medirse identificando una disminución del volumen tumoral, determinando la muerte de animales, persistencia de las células T genéticamente modificadas *in vivo*, activación de células T genéticamente modificadas (por ejemplo, detectando un aumento de la expresión de CD25 y/CD69) y/o proliferación de células T genéticamente modificadas *in vivo*. En un caso, se selecciona un receptor químérico que proporciona la mejor eficacia antitumoral *in vivo* tal como se determina mediante uno o más de estos parámetros. La falta de eficacia antitumoral puede determinarse mediante la falta de persistencia de los linfocitos genéticamente modificados *in vivo*, muerte de animales, un aumento de la apoptosis tal como se mide mediante un aumento de la inducción de caspasa 3 y/o una disminución de la proliferación de linfocitos genéticamente modificados.
- En casos, proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos de receptor químérico, en la que los ácidos nucleicos de receptor químérico sólo difieren en la región espaciadora, comprende proporcionar un constructo de receptor químérico que comprende un polinucleótido que codifica para un dominio de unión a ligando, en el que el ligando es un antígeno específico de tumor, antígeno viral o cualquier otra molécula expresada en una población de células diana que es adecuada para mediar en el reconocimiento y la eliminación por un linfocito; un polinucleótido que codifica para un primer espaciador de polipéptido que tiene un sitio de restricción definido en el extremo 5' y 3' de la secuencia codificante para el primer espaciador de polipéptido; un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana; y un polinucleótido que codifica para un dominio de señalización intracelular.
- Métodos de realización de inmunoterapia celular en un sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno que comprenden: administrar una composición de linfocitos que expresan un receptor químérico tal como se describe en el presente documento. En otros casos, un método comprende administrar al sujeto una preparación celular de linfocitos T citotóxicos genéticamente modificados que proporciona una respuesta inmunitaria celular, en el que la preparación celular de linfocitos T citotóxicos comprende células T CD8<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie de célula tumoral, un dominio espaciador personalizado, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular tal como se describe en el presente documento, y una preparación celular de linfocitos T cooperadores genéticamente modificados que provoca reconocimiento tumoral directo y aumenta la capacidad de preparaciones celulares de linfocitos T citotóxicos genéticamente modificados para mediar en una respuesta inmunitaria celular, en la que la preparación celular de linfocitos T cooperadores comprende células T CD4<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie de célula tumoral, un dominio espaciador personalizado, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular tal como se describe en el presente documento.
- Sin limitar el alcance de la divulgación, se cree que seleccionar la población de células T modificadas con receptor químérico que puede persistir y proliferar *in vivo* antes de la administración puede dar como resultado la capacidad de usar una dosis inferior de células T y proporcionar una actividad terapéutica más uniforme. En casos, la dosis de células T puede reducirse en al menos el 10 %, el 20 % o el 30 % o más. La reducción de la dosis de células T puede ser beneficiosa para reducir el riesgo o síndrome de lisis tumoral o tormenta de citocinas.
- En otro caso, un método de realización de inmunoterapia celular en sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno comprende: administrar al sujeto una preparación celular de linfocitos T cooperadores genéticamente modificados, en el que la preparación celular de linfocitos T cooperadores modificados comprende células T CD4<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio de unión a ligando específico para una molécula de superficie de célula tumoral, un dominio espaciador personalizado, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular tal como se describe en el presente documento. En un caso, el método comprende además administrar al sujeto una preparación celular de linfocitos T citotóxicos genéticamente modificados, en el que la preparación celular de linfocitos T citotóxicos modificadas comprende células CD8<sup>+</sup> que tienen un receptor químérico que comprende un dominio de

unión a ligando específico para una molécula de superficie de célula tumoral, un dominio espaciador personalizado, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular tal como se describe en el presente documento.

- 5 Otro caso describe un método de realización de inmunoterapia celular en un sujeto que tiene una enfermedad o un trastorno que comprende: analizar una muestra biológica del sujeto para determinar la presencia de una molécula diana asociada con la enfermedad o el trastorno y administrar las composiciones de inmunoterapia adoptiva descritas en el presente documento, en el que el receptor quimérico se une específicamente a la molécula diana.
- 10 En algunos casos, la célula de linfocito cooperador T CD4<sup>+</sup> se selecciona antes de la introducción del receptor quimérico del grupo que consiste en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes, células T CD4<sup>+</sup> de memoria central, células T CD4<sup>+</sup> de memoria efectora o células T CD4<sup>+</sup> a granel. En un caso específico, la célula de linfocito cooperador CD4<sup>+</sup> es una célula T CD4<sup>+</sup> virgen, en la que la célula T CD4<sup>+</sup> virgen comprende una célula T CD45RO<sup>−</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>. En aún otros casos, la célula de linfocito citotóxico T CD8<sup>+</sup> se selecciona antes de la introducción del receptor quimérico del grupo que consiste en células T CD8<sup>+</sup> vírgenes, células T CD8<sup>+</sup> de memoria central, células T CD8<sup>+</sup> de memoria efectora o células T CD8<sup>+</sup> a granel. En un caso específico, la célula de linfocito T citotóxico CD8<sup>+</sup> es una célula T de memoria central en la que la célula T de memoria central comprende una célula T CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>. En un caso específico, la célula de linfocito T citotóxico CD8<sup>+</sup> es una célula T de memoria central y la célula de linfocito T cooperador CD4<sup>+</sup> es una célula T CD4<sup>+</sup> virgen.
- 15 20 En casos, la célula T CD8<sup>+</sup> y la célula T CD4<sup>+</sup> están ambas genéticamente modificadas con un receptor quimérico que comprende un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente a una molécula de superficie celular específica de tumor. En otros casos, el dominio de señalización intracelular de las células T citotóxicas CD8 es el mismo que el dominio de señalización intracelular de las células T cooperadoras CD4. En aún otros casos, el dominio de señalización intracelular de las células T citotóxicas CD8 es diferente del dominio de señalización intracelular de las células T cooperadoras CD4.
- 25

Los sujetos que pueden tratarse son, en general, sujetos humanos y otros primates, tales como monos y simios con propósitos de medicina veterinaria. Los sujetos pueden ser machos o hembras y pueden ser de cualquier edad adecuada, incluyendo sujetos lactantes, juveniles, adolescentes, adultos y geriátricos.

- 30 35 Los sujetos que pueden tratarse incluyen sujetos afectados por cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de colon, pulmón, hígado, mama, renal, próstata, ovarios, piel (incluyendo melanoma), hueso y cerebro, etc. En algunos casos, los antígenos o las moléculas asociados a tumor se conocen, tales como melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de colon, leucemia, mieloma y cáncer de próstata. En otros casos, las moléculas asociadas a tumor pueden seleccionarse como diana con células T genéticamente modificadas que expresan un receptor quimérico modificado por ingeniería. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, linfoma de células B, cáncer de mama, cáncer de próstata y leucemia.
- 40 45 50 Pueden usarse células preparadas tal como se describió anteriormente en métodos y composiciones para inmunoterapia adoptiva según técnicas conocidas o variaciones de las mismas que resultarán evidentes para los expertos en la técnica basándose en la presente divulgación.

- 55 60 65 En algunos casos, las células se formulan recogiéndolas en primer lugar a partir de su medio de cultivo y después lavando y concentrando las células en un medio y sistema de recipiente adecuado para su administración (un portador "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. El medio de infusión adecuado puede ser cualquier formulación de medio isotónico, normalmente solución salina normal, Normosol R (Abbott) o Plasma-Lyte A (Baxter), pero también puede usarse dextrosa al 5 % en agua o solución de Ringer lactato. El medio de infusión puede complementarse con albúmina de suero humano, suero bovino fetal u otros componentes de suero humano.
- Una cantidad eficaz para el tratamiento de células en la composición es de al menos 2 subconjuntos de células (por ejemplo, 1 subconjunto de células T CD8<sup>+</sup> de memoria central y 1 subconjunto de células T cooperadoras CD4<sup>+</sup>) o es más normalmente de más de 102 células y hasta 106, hasta e incluyendo 10<sup>8</sup> o 109 células y puede ser de más de 10<sup>10</sup> células. El número de células dependerá del uso final para el que está destinada la composición al igual que el tipo de células incluidas en la misma. Por ejemplo, si se desean células que son específicas para un antígeno particular, entonces la población contendrá más del 70 %, generalmente más del 80 %, el 85 % y el 90-95 % de tales células. Para usos descritos en el presente documento, las células están generalmente en un volumen de un litro o menos, puede ser de 500 ml o menos, incluso 250 ml o 100 ml o menos. Por tanto, la densidad de las células deseadas es normalmente mayor de 10<sup>4</sup> células/ml y generalmente es mayor de 10<sup>7</sup> células/ml, generalmente 10<sup>8</sup> células/ml o mayor. El número clínicamente relevante de células inmunitarias puede distribuirse en múltiples infusiones que de manera acumulativa equivalen a, o superan, 106, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup> o 10<sup>11</sup> células.

- En algunos casos, los linfocitos pueden usarse para conferir inmunidad a individuos. Por "inmunidad" quiere decirse una reducción de uno o más síntomas físicos asociados con una respuesta a la infección por un patógeno, o a un tumor, al que se dirige la respuesta de linfocitos. La cantidad de células administradas está habitualmente en el intervalo presente en individuos normales con inmunidad frente al patógeno. Por tanto, las células se administran habitualmente mediante infusión, estando cada infusión en un intervalo de desde 2 células hasta al menos de 106 a 3x10<sup>10</sup> células, preferiblemente en el intervalo de al menos 10<sup>7</sup> a 10<sup>9</sup> células. Las células T pueden administrarse mediante una única infusión o mediante múltiples infusiones a lo largo de un intervalo de tiempo. Sin embargo, dado que se espera que diferentes individuos varíen en cuanto a la capacidad de respuesta, el tipo y la cantidad de células infundidas, así como el número de infusiones y el intervalo de tiempo a lo largo del cual se administran múltiples infusiones, se determinan por el médico encargado, y pueden determinarse mediante examen de rutina. La generación de niveles suficientes de linfocitos T (incluyendo linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T cooperadores) puede lograrse fácilmente usando el método de expansión rápida, tal como se muestra a modo de ejemplo en el presente documento. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.040.177 a nombre de Riddell *et al.* en la columna 17.
- 5 En casos, la composición tal como se describe en el presente documento se administra por vía intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, en la médula ósea, en el ganglio linfático y/o en el líquido cefalorraquídeo. En casos, las 10 composiciones modificadas por ingeniería con receptor químérico se administran al sitio del tumor. Alternativamente, las composiciones tal como se describe en el presente documento pueden combinarse con un compuesto que dirige las células al tumor o los compartimentos de sistema inmunitario y evitan sitios tales como el pulmón.
- 15 20 En casos, las composiciones tal como se describe en el presente documento se administran con agentes quimioterápicos y/o inmunosupresores. En un caso, en primer lugar se trata a un paciente con un agente quimioterápico que inhibe o destruye otras células inmunitarias seguido por las composiciones descritas en el presente documento. En algunos casos, puede evitarse totalmente la quimioterapia.
- 25 En los ejemplos expuestos a continuación se ilustran casos adicionales.

#### **PARTE EXPERIMENTAL**

30 **Ejemplo 1. Personalización de longitud de dominio espaciador y afinidad de scFv para el reconocimiento óptimo de ROR1 con células T modificadas con receptor químérico**

Se construyeron receptores químéricos específicos para la molécula de ROR1 que se expresa en un gran número de neoplasias malignas humanas incluyendo leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, leucemia 35 linfoblástica aguda y cáncer de mama, pulmón, próstata, páncreas y ovarios. Los receptores químéricos de ROR1 se diseñaron a partir de scFv específicos de ROR1 con diferentes afinidades y que contenían dominios espaciadores de Fc de IgG4 extracelulares de diferentes longitudes. Se analizó la capacidad de células T que expresaban cada receptor químérico específico de ROR1 para reconocer tumores hematopoyéticos y epiteliales ROR1<sup>+</sup> *in vitro* y para eliminar linfoma de células del manto humano injertado en ratones inmunodeficientes.

40 **Materiales y métodos**

##### **Sujetos humanos**

45 Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de donantes sanos y pacientes tras el consentimiento informado por escrito sobre protocolos de investigación aprobados por la junta de revisión institucional del Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC).

##### **Líneas celulares**

50 Se obtuvieron las líneas celulares K562, Raji, JeKo-1, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y 293T a partir de la Colección americana de cultivos tipo. El Dr. Edus H. Warren (FHCRC) proporcionó amablemente las líneas celulares de cáncer renal FARP, TREP y RWL. Se generaron K562/ROR1 y Raji/ROR1 mediante transducción lentiviral con el gen *ROR1* de longitud completa. Para derivar JeKo-1/ffluc, se transdijeron células JeKo-1 nativas con un vector lentiviral que codificaba para el gen de luciferasa de luciérnaga (*ffluc*) en el sentido de 5' de una secuencia de T2A y eGFP. Se clasificaron las células JeKo-1 transducidas para la expresión de eGFP y se expandieron para experimentos *in vivo*.

##### **Inmunofenotipado**

60 Se tiñeron PBMC y líneas celulares con los siguientes AcM conjugados: CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, CD28, CD45RO, CD62L, CD314 (NKG2D), MIC/A/B y controles de isotipo coincidente (BD Biosciences). Se realizó tinción con yoduro de propidio (PI) para la distinción de células vivas/muertas. Se analizó la expresión en superficie celular de ROR1 usando anticuerpo de cabra polyclonal anti-ROR1 humano (R&D Systems).

65 Se analizó la expresión en superficie de receptor químérico de ROR1 de 2A2 usando un anticuerpo de cabra polyclonal anti-IgG de ratón (específico de Fab) (Jackson ImmunoResearch). Se realizaron análisis de flujo en un dispositivo

FACSCanto®, purificaciones por clasificación en un dispositivo FACS Aria II® (Becton Dickinson) y se analizaron los datos usando el software FlowJo® (Treestar).

#### **Construcción de vectores y preparación de lentivirus que codifica para receptor quimérico**

5 Se construyeron receptores quiméricos específicos de ROR1 y específicos de CD19 usando segmentos de cadena de VL y VH de los AcM 2A2, R12 y R11 (ROR1) y AcM FMC63 (CD19). (Las secuencias de región variable para R11 y R12 se proporcionan en Yang et al, Plos One 6(6):e21018, 15 de junio de 2011). Se unió cada scFV mediante un péptido (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 12) a un dominio espaciador derivado a partir de Fc de IgG4 (base de datos Uniprot: P01861, SEQ ID NO: 13) que comprende secuencias de "bisagra-CH2-CH3" (229 AA, SEQ ID NO: ), "bisagra-CH3" (119 AA, SEQ ID NO: ) o sólo "bisagra" (12 AA, SEQ ID NO: 4) (figura 1). Todos los espaciadores contenían una sustitución S→P dentro del dominio de "bisagra" ubicada en la posición 108 de la proteína de Fc de IgG4 nativa, y se unieron al dominio transmembrana de 27 AA de CD28 humano (Uniprot: P10747, SEQ ID NO: 14) y a un módulo de señalización que comprendía o bien (i) el dominio citoplásmico de 41 AA de CD28 humano con una sustitución LL→GG ubicada en las posiciones 186-187 de la proteína CD28 nativa (SEQ ID NO: 14) o bien (ii) el dominio citoplásmico de 42 AA de 4-1BB humano (Uniprot: Q07011, SEQ ID NO: 15), cada uno de los cuales se unió al dominio citoplásmico de 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (Uniprot: P20963, SEQ ID NO: 16). El constructo codificaba para un elemento de omisión ribosómico de T2A (SEQ ID NO: 8) y una secuencia de tEGFR (SEQ ID NO: 9) en el sentido de 3' del receptor quimérico. Se sintetizaron secuencias de nucleótidos con codones optimizados que codificaban para cada transgén (Life Technologies) y se clonaron en el vector lentiviral epHIV7.

20 Se produjeron lentivirus que codificaban para receptor quimérico de ROR1, receptor quimérico de CD19 o tEGFR en células 293T usando los vectores de empaquetamiento pCHGP-2, pCMV-Rev2 y pCMV-G, y reactivo de transfección Calphos® (Clontech).

25 **Generación de líneas de células T que expresan receptores quiméricos de ROR1 y CD19**

30 Se clasificaron células T de memoria central (Tcm) CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> o células T CD4<sup>+</sup> a granel a partir de PBMC de donantes normales, se activaron con perlas anti-CD3/CD28 (Life Technologies) y se transdujeron en el día 3 tras la activación mediante centrifugación a 800 g durante 45 min a 32 °C con sobrenadante de lentivirus (MOI = 3) complementado con polibreno 1 µg/ml (Millipore). Se expandieron células T en RPMI con suero humano al 10 %, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina al 1 % (medio CTL), complementado con IL-2 humana recombinante hasta una concentración final de 50 U/ml. Se enriqueció el subconjunto tEGFR<sup>+</sup> de cada línea de células T mediante selección inmunomagnética con AcM anti-EGFR conjugado con biotina (ImClone Systems) y perlas de estreptavidina (Miltenyi). Se expandieron células T de receptor quimérico de ROR1 y de control de tEGFR usando un protocolo de expansión rápida (Riddell SR, Greenberg PD, The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. J Immunol Methods. 1990; 128(2):189-201. Publicación electrónica el 17/04/1990), y se expandieron células T modificadas con receptor quimérico de CD19 mediante estimulación con B-LCL irradiadas (8.000 rad) a una razón de células T:LCL de 1:7. Se cultivaron células T en medio CTL con IL-2 50 U/ml.

#### **Ensayos de citotoxicidad, secreción de citocinas y proliferación**

45 Se marcaron las células diana con <sup>51</sup>Cr (PerkinElmer), se lavaron y se incubaron por triplicado a 1-2x10<sup>3</sup> células/pocillo con células T efectoras modificadas con receptor quimérico a diversas razones de efector con respecto a diana (E:T). Se recogieron los sobrenadantes para recuento y tras una incubación de 4 horas y se calculó la lisis específica usando la fórmula convencional. Para el análisis de la secreción de citocinas, se sembraron en placas 5x10<sup>4</sup> células T por triplicado con células diana a una razón de E:T de 1:1 (LLC primaria), 2:1 (Raji/ROR1; JeKo-1), 4:1 (K562/ROR1, K562/CD19 y K562) o 10:1 (MDA-MB-231) y se midieron IFN-γ, TNF-α e IL-2 mediante ELISA o inmunoensayo de citocinas multiplexado (Luminex) en sobrenadante retirado después de una incubación de 24 h. En experimentos que bloqueaban la señalización de NKG2D, se usaron anticuerpos anti-NKG2D (clón 1D11), anti-MICA/B (clón 6D4, todos de BD) y anti-ULBP (amablemente proporcionado por Dr. Veronika Groh, FHCRC) a concentraciones de saturación. Para el análisis de la proliferación, se marcaron células T con éster succinimidílico de carboxifluoresceína 0,2 µM (CFSE, Invitrogen), se lavaron y se sembraron en placas por triplicado con células estimuladoras en medio sin citocinas exógenas. Después de una incubación de 72 h, se marcaron las células con AcM anti-CD8 y PI y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la división celular de células T CD8<sup>+</sup> vivas.

#### **Experimentos en ratones NOD/SCID/γc<sup>-/-</sup> (NSG)**

60 El comité institucional de uso y receptores quiméricos de animales aprobó todos los experimentos con ratones. Se obtuvieron ratones hembra NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) de seis a 8 semanas de edad del Jackson Laboratory o se criaron de manera interna. A los ratones se les inyectaron 0,5x10<sup>6</sup> células tumorales JeKo-1/ffluc mediante la vena de la cola y recibieron una inyección posterior en la vena de la cola de células T modificadas con receptor quimérico o de control.

65 Para la obtención de imágenes por bioluminiscencia de crecimiento tumoral, los ratones recibieron inyecciones

intraperitoneales de sustrato de luciferina (Caliper Life Sciences) resuspendido en PBS (15 µg/g de peso corporal). Se anestesiaron los ratones con isoflurano y se obtuvieron imágenes usando un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS (Caliper) 10, 12 y 14 minutos después de la inyección de luciferina en modo de agrupaciones pequeñas a un tiempo de adquisición de 1 s a 1 min para obtener imágenes no saturadas. Se analizó la actividad luciférica usando el software Living Image (Caliper) y se analizó el flujo de fotones dentro de regiones de interés que abarcaban todo el cuerpo o el tórax de cada ratón individual.

### Análisis estadísticos

5 10 Se realizaron análisis estadísticos usando el software Prism (GraphPad®). Se realizó la prueba de la t de Student como prueba bilateral para datos emparejados con un intervalo de confianza del 95 % y se consideró que resultados con un valor de p de p<0,05 eran significativos. Se realizaron análisis estadísticos de supervivencia mediante pruebas de los rangos logarítmicos y se consideró que los resultados con un valor de p de p<0,05 eran significativos.

### 15 Resultados

***Truncar el dominio espaciador del receptor químérico de ROR1 de 2A2 confiere un reconocimiento superior de tumores ROR1<sup>+</sup>***

20 25 Anteriormente se notificó el diseño de un receptor químérico específico de ROR1 usando el scFV de 2A2, que se une a un epítopo en la porción de tipo Ig-Frizzled distal a la membrana, NH2-terminal, de ROR1-1. El receptor químérico de ROR1 de 2A2 inicial tenía un espaciador largo de 229 AA que incluía la región de “bisagra-CH2-CH3” de Fc de IgG4, e incorporaba dominios coestimuladores de CD28 y de señalización de CD3ζ (Hudecek M *et al.* Blood, 2010). Este receptor químérico confirió reconocimiento específico de tumores ROR1<sup>+</sup>, pero se planteó la hipótesis de que, debido a la ubicación distal a la membrana del epítopo de ROR1, truncar el dominio espaciador podía potenciar el reconocimiento tumoral y la señalización de células T. Por tanto, se construyeron 2 receptores químéricos adicionales en los que se delecionó secuencialmente el dominio espaciador de Fc de IgG4 para derivar variantes de “bisagra - CH3” (119 AA, intermedia) y “sólo bisagra” (12 AA, corta). Cada uno de los nuevos receptores contenía scFV de 2A2 y los módulos de señalización de CD28 y CD3ζ idénticos. El casete de transgén incluía un EGFR truncado (tEGFR) para servir como marcador de transducción, selección y seguimiento *in vivo* para células T modificadas con receptor químérico.

30 35 Se transdijeron T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> purificadas con los receptores químéricos de ROR1 de 2A2 que contenían espaciadores de Fc de IgG4 de longitud completa o truncados, y con un vector de control de tEGFR. La eficiencia de transducción media fue del 15 % (intervalo del 9-22 %) y se enriquecieron células T positivas para transgén hasta una pureza uniforme (>90 %) en el día 10 mediante selección para la expresión de tEGFR y se expandieron (figura 2A). Se confirmó la expresión en superficie de cada uno de los receptores químéricos mediante tinción con anticuerpos específicos de F(ab) (figura 2A).

40 45 El análisis de la función *in vitro* de células T CD8<sup>+</sup> modificadas para expresar cada uno de los receptores químéricos de ROR1 de 2A2 demostró que cada receptor confería lisis específica de células de LCM de JeKo-1 y de LLC primaria que expresan de manera natural ROR1, y de células K562 que se habían transducido con *ROR1*, pero no confirieron reconocimiento de dianas ROR1<sup>-</sup> de control (figura 2B). Las células T que expresaban el receptor químérico de ROR1 de 2A2 de “sólo bisagra” corto tenían una actividad citolítica máxima y resultó claramente evidente una jerarquía (corto>intermedio>largo) de lisis tumoral contra todas las dianas de tumor ROR1<sup>+</sup> (figura 2B), ilustrando la importancia de la longitud de dominio espaciador en el reconocimiento de células tumorales ROR1<sup>+</sup>.

50 55 La eficacia antitumoral de la terapia adoptiva con células T se correlaciona con la proliferación y supervivencia de células T transferidas, lo cual puede alterarse mediante señalización a través del receptor químérico. Se usaron ensayos de dilución de CFSE para analizar la proliferación de células T modificadas con cada uno de los receptores químéricos de ROR1 de 2A2 tras el acoplamiento de Raji/ROR1 o LLC, y se encontró que el constructo de espaciador corto fomentaba la mayor proliferación de células T tras la estimulación (figura 2C). Para garantizar que la proliferación potenciada no estaba asociada con una mayor muerte celular inducida por activación (AICD), también se analizó la proporción de células T modificadas con receptor químérico de ROR1 de 2A2 que se teñían con yoduro de propidio (PI) después de la estimulación con células tumorales Raji/ROR1 y JeKo-1. Se detectó una frecuencia mucho menor de células T CD8<sup>+</sup> PI<sup>+</sup> en la línea de células T modificadas con el espaciador corto (Raji/ROR1: 17,2 % / JeKo-1: 20,2 %) en comparación con el intermedio (41,6 %/42,4 %) y el largo (44,5 %/48,5 %).

60 65 El análisis cuantitativo de la producción de citocinas en respuesta a la estimulación con células Raji/ROR1 y de LLC primaria mostró la producción de IFN-γ, TNF-α e IL-2 por células T que expresan cada uno de los receptores químéricos de ROR1 de 2A2. Tal como se observó en ensayos de citotoxicidad, el constructo de espaciador corto era superior en cuanto a la mediación de la secreción de citocinas después del reconocimiento tumoral (figura 2D). Por tanto, este análisis muestra que truncar el dominio espaciador de Fc de IgG4 extracelular del receptor químérico de ROR1 de 2A2 conduce a un aumento significativo de la citotoxicidad, proliferación y funciones efectoras *in vitro* después del reconocimiento tumoral.

***El scFv de R11 que es específico para un epítopo proximal a la membrana en el dominio Kringle de ROR1 requiere un dominio espaciador extracelular largo.***

Se transdijeron células T CD8<sup>+</sup> purificadas con receptores quiméricos de ROR1 que contenían el scFv de R11 que es específico para el dominio Kringle de ROR1 y que contenían espaciadores de Fc de IgG4 de longitud completa o truncados (CH3 y sólo bisagra). La eficiencia de transducción con cada uno de los vectores corto (sólo bisagra de IgG4), intermedio (bisagra de IgG4/CH3) y largo (bisagra de IgG4/CH2/CH3) era comparable (45-51 %) tal como se mide mediante expresión de EGFR (figura 3A). Se sometieron células T transducidas con cada uno de los vectores a ensayo para determinar la citólisis (figura 3 B), proliferación (figura 3C) y producción de citocinas (figura 3D) en respuesta a células de leucemia o linfoma que expresaron o no expresaron ROR1. Tal como se muestra, sólo las células T transducidas con el receptor químico de R11 que contenía una secuencia de espaciador largo fueron capaces de reconocer de manera eficiente tumores ROR1<sup>+</sup> y mediar en funciones efectoras.

***Los receptores quiméricos de ROR1 derivados a partir de un AcM R12 con afinidad superior a 2A2 median en reactividad antitumoral superior***

A continuación se examinó si aumentar la afinidad del scFV usado para construir el receptor químico de ROR1 podía influir en el reconocimiento tumoral y la función de células T. Se generaron receptores quiméricos específicos de ROR1 a partir del AcM R12 que, al igual que 2A2, se une a un epítopo en el dominio de Ig/Frizzled NH2-terminal de ROR1 pero con una afinidad de unión monovalente >50 veces superior.

Se construyeron receptores quiméricos de ROR1 de R12 con espaciadores de Fc de IgG4 tanto largo como corto para determinar si el diseño de espaciador óptimo para este scFV de afinidad superior difería con respecto a aquél para un scFV de afinidad inferior. Se encontró que, de manera similar a 2A2, el receptor químico de ROR1 de R12 de espaciador corto confería una actividad citolítica, secreción de citocinas y proliferación mejoradas (datos no mostrados), sugiriendo que la longitud de espaciador más corta proporciona un acoplamiento espacial superior de la célula T y la célula diana ROR1<sup>+</sup> para la activación de células T.

Después, se diseñaron receptores quiméricos de ROR1 de R12 y 2A2 que contenían un espaciador extracelular óptimo (corto) y un dominio coestimulador o bien de CD28 o bien de 4-1BB en tandem con CD3ζ (4 constructos) para comparación (figura 4A.B). Se expresaron estos constructos de receptor químico de ROR1 en Tcm CD8<sup>+</sup> purificadas de donantes sanos y se confirmó una expresión transgénica equivalente mediante tinción de tEGFR (figura 5A). Las células T modificadas con cada uno de los receptores quiméricos de ROR1 de 2A2 y R12 produjeron específicamente lisis de células tumorales K562/ROR1 y Raji/ROR1 con una eficiencia aproximadamente equivalente (figura 5B). Sin embargo, el análisis de la producción de citocinas mostró que los receptores químicos de ROR1 de R12 de alta afinidad que contenían CD28 o 4-1BB confirieron una producción de IFN-γ, TNF-α e IL-2 significativamente superior en comparación con los constructos de 2A2 correspondientes (figura 5C). Se encontró que las células T que expresaban receptores químicos con un dominio coestimulador de CD28 produjeron más IFN-γ, TNF-α e IL-2 en comparación con aquellos con 4-1BB.

Los experimentos para analizar la proliferación de células T de receptor químico de ROR1 mostraron un porcentaje superior de células T en proliferación y un número superior de divisiones celulares en células T que expresan los receptores químicos de ROR1 de R12 de alta afinidad con dominio de CD28 y 4-1BB en comparación con células T que expresan los homólogos de 2A2 respectivos (figura 4D). Hubo una proliferación más vigorosa en células T que expresaban receptores químicos con un dominio de CD28, de manera compatible con una producción de IL-2 superior inducida por estos receptores. Hubo una frecuencia inferior de AICD tal como se mide mediante tinción con PI en líneas de células T modificadas con R12 en comparación con receptores químicos de ROR1 de 2A2 después de la estimulación con células tumorales Raji/ROR1 y JeKo-1 respectivamente (R12: 5,6 % / 6,9 % frente a 2A2: 10 % / 9,65 %). Las líneas de células T que expresaban receptores químicos con un dominio de CD28 también tuvieron una AICD inferior en comparación con 4-1BB en respuesta a células tumorales Raji/ROR1 y JeKo-1 respectivamente (R12: 16,4 % / 18,4 % frente a 2A2 38,1 % / 39,6 %).

Para determinar si la función potenciada observada con receptores químicos de ROR1 de R12 en células T CD8<sup>+</sup> se extendía a células T CD4<sup>+</sup>, se transdijeron células T CD4<sup>+</sup> a granel con los receptores químicos de ROR1 de 2A2 y R12 que contenían el espaciador corto y el dominio coestimulador de CD28. En respuesta a células tumorales Raji/ROR1<sup>+</sup>, las células T CD4<sup>+</sup> que expresaban el scFv de R12 de alta afinidad produjeron niveles superiores de IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-10, y experimentaron una proliferación mayor que células T CD4<sup>+</sup> que expresaban 2A2 (figura 5A,B). Tanto la producción de citocinas como la proliferación eran superiores en células T CD4<sup>+</sup> en comparación con CD8<sup>+</sup> modificadas con los mismos receptores químicos de ROR1. En resumen, los presentes datos demuestran que ajustar a medida tanto la longitud del dominio espaciador de receptor químico extracelular no de señalización como la afinidad de scFV son parámetros independientes que afectan a la función de células T de receptor químico de ROR1.

***Las células T D8<sup>+</sup> modificadas con un receptor químico de ROR1 de alta afinidad tienen una actividad comparable a un receptor químico de CD19 contra LLC primaria in vitro***

Tanto ROR1 como CD19 se expresan de manera uniforme en todas las LLC primarias (figura 6A), sin embargo se estima que el número absoluto de moléculas de ROR1 por célula tumoral es 10 veces inferior al de CD19, que se ha seleccionado satisfactoriamente como diana en ensayos clínicos con células T de receptor químérico de CD19. Se comparó el reconocimiento de LLC primaria por células T CD8<sup>+</sup> que expresaban los receptores químéricos de ROR1 de R12 y 2A2 optimizados, y un receptor químérico de CD19 derivado a partir del scFV de FMC63. Se usaron Tcm CD8<sup>+</sup> purificadas para la modificación con receptor químérico para proporcionar un producto celular uniforme y cada receptor químérico contenía un espaciador de "sólo bisagra" de Fc de IgG4 corto y dominio coestimulador de 4-1BB. Se confirmó que el presente receptor químérico de CD19 (bisagra de IgG4) era al menos tan, y más, eficaz en el reconocimiento de tumores CD19<sup>+</sup> que un receptor químérico de CD19 con espaciador de bisagra de CD8a y dominio coestimulador de 4-1BB que está usándose en ensayos clínicos en curso (figura 20). Las células T que expresan receptores químéricos de CD19 con 4-1BB y CD3zeta y una bisagra de Fc de IgG4 modificada muestran una función superior *in vitro* e *in vivo* en comparación con células T que expresan receptores químéricos de CD19 con 4-1BB y CD3zeta y una bisagra de CD8 alfa. En la figura 20D, se comparó la actividad antitumoral *in vivo* de células T que expresaban un receptor químérico de CD19 con una bisagra de Fc de IgG4 (grupo 1) o bisagra de CD8 alfa (grupo 2) y células T que expresaban tEGFR solo (grupo 3) en ratones NSG inoculados con células tumorales Raji que expresaban luciferasa de luciérnaga (ffluc). Se obtuvieron imágenes de los ratones 17 días después de la inoculación de tumor y 10 días después de la inoculación de células T. Los datos muestran una mayor carga tumoral en ratones tratados con células T de tEGFR de control (grupo 3) o con células T de receptor químérico de CD19 de bisagra de CD8 alfa (grupo 2) en comparación con ratones tratados con células T de receptor químérico de CD19 de bisagra de Fc de IgG4 (grupo 1).

La actividad citolítica de células T de receptor químérico de ROR1 de R12 contra células tumorales primarias a partir de múltiples pacientes con LLC (*n*=4) fue superior en comparación con células T modificadas con el receptor químérico de ROR1 de 2A2 de afinidad inferior, y equivalente a la lisis observada con células T de receptor químérico de CD19 (figura 6B). El análisis de citocinas multiplexado mostró una producción de IFN-γ y TNF-α casi equivalentes, pero menos producción de IL-2 por células T CD8<sup>+</sup> que expresaban el ROR1 de R12 en comparación con las que expresaban el receptor químérico de CD19 después del cultivo conjunto con LLC primaria (figura 6C). Las células T de receptor químérico de ROR1 de 2A2 produjeron cantidades inferiores de todas las citocinas en comparación con células T de receptor químérico de ROR1 de R12 tal como se indicó anteriormente. La producción de citocinas por todas las células T transducidas con receptor químérico después de la estimulación con LLC fue sustancialmente menor que con Raji/ROR1, que, a diferencia de LLC, expresa tanto CD80 como CD86 que pueden acoplarse a CD28 expresado en células T de receptor químérico (figura 6A, C).

Se observó menos proliferación de células T que expresan el receptor químérico de ROR1 de R12 y 2A2 en comparación con el receptor químérico de CD19 después de la estimulación con LLC (CD19>R12>2A2) (figura 6D). Se planteó la hipótesis de que la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> de receptor químérico de ROR1 en respuesta a LLC puede aumentarse en presencia de células T CD4<sup>+</sup> modificadas con receptor químérico debido a su secreción superior de IL-2 en comparación con T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> (figura 4A; figura 8A). Para someter a prueba esta posibilidad, se realizaron experimentos de cultivo conjunto *in vitro* en los que se modificaron por separado T<sub>CM</sub> CD4<sup>+</sup> y CD8 con los receptores químéricos de ROR1 de R12, ROR1 de 2A2 y CD19, respectivamente, se enriquecieron para la expresión de receptor químérico y se combinaron a una razón de 1:1 para garantizar proporciones equivalentes de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> modificadas con cada uno de los vectores. Se marcaron estas células con CFSE y se estimularon con LLC primaria. Se observó un drástico aumento de la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> de receptor químérico de ROR1 de R12 después de la adición de células T CD4<sup>+</sup> transducidas con receptor químérico, pero no con no transducidas (figura 8B). De manera notable, cuando se proporcionó ayuda de CD4, se observó una proliferación equivalente de células T CD8<sup>+</sup> de receptor químérico de ROR1 de R12 y CD19 en respuesta a LLC, mientras que la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> que expresaban el receptor químérico de ROR1 de 2A2 de afinidad inferior siguió siendo inferior. De manera colectiva, los presentes datos muestran que el receptor químérico de ROR1 de R12 de alta afinidad confiere una reactividad superior en comparación con 2A2 contra células de LLC primaria *in vitro*.

#### 50 ***Las células T de receptor químérico de ROR1 median en la actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de ratón de linfoma de células del manto sistémico***

Siguió sin estar claro si la actividad *in vitro* superior de células T modificadas con el receptor químérico de R12 de afinidad superior se traduciría en una actividad antitumoral mejorada *in vivo*, y cómo sería la selección como diana de ROR1 en comparación con la selección como diana de CD19. Para abordar estas cuestiones, se inocularon cohortes de ratones inmunodeficientes NSG con la línea de LCM humano JeKo-1/ffluc mediante inyección en la vena de la cola, y siete días después, cuando el tumor estaba diseminado, se trataron los ratones con una única dosis intravenosa de células T CD8<sup>+</sup> de receptor químérico ROR1 de R12, ROR1 de 2A2 o CD19. Se trataron ratones de control con células T de tEGFR o no se trataron. Todos los receptores químéricos tenían el espaciador corto óptimo y el dominio coestimulador de 4-1BB. Los ratones NSG/JeKo-1 no tratados desarrollaron un linfoma sistémico de rápida progresión que necesitó eutanasia aproximadamente 4 semanas después de la inoculación de tumor (figura 9A-C).

65 Se observó regresión tumoral y supervivencia mejorada en todos los ratones tratados con células T de receptor químérico de ROR1 de R12, ROR1 de 2A2 y CD19. Los ratones tratados con células T de receptor químérico de ROR1 de R12 tenían una respuesta antitumoral y supervivencia superiores en comparación con ratones tratados con células

T receptor quimérico de ROR1 de 2A2 ( $p<0,01$ ), y actividad antitumoral comparable a ratones tratados con células T de receptor quimérico de CD19 (figura 9A-C).

5 Se analizó la frecuencia de células T de receptor quimérico en la sangre periférica tras la transferencia adoptiva y se detectaron números superiores de células T tEGFR<sup>+</sup> en ratones tratados con el receptor quimérico de ROR1 de R12 en comparación con el receptor quimérico de ROR1 de 2A2, lo que sugiere que una proliferación más vigorosa *in vivo* mejoró el control del tumor. Para confirmar esto, se administraron células T de receptor quimérico de CD19, receptor quimérico de ROR1 de R12 y 2A2 marcadas con CFSE a cohortes de ratones NSG que portaban JeKo-1/ffluc, y se analizó la proliferación de células T en la sangre periférica, médula ósea y bazo 72 horas después de la transferencia.

10 Un porcentaje superior de las células T de receptor quimérico de R12 y CD19 proliferó y experimentó un mayor número de divisiones celulares en comparación con células T de receptor quimérico de ROR1 de 2A2 (figura 9D). El tumor JeKo-1 presentó finalmente recidiva en todos los ratones tratados con células T de receptor quimérico de ROR1 o CD19 (figura 9A-C). La recidiva tumoral no fue el resultado de la selección de variantes sin ROR1 o CD19, ya que los tumores con recidiva eran positivos para ambas moléculas.

15 15 Para comparación, se analizó la eficacia antitumoral de células T de receptor quimérico de CD19 en ratones NSG con injerto de tumores de Raji y se observó una erradicación tumoral completa, indicando que la recidiva de JeKo-1 refleja la dificultad para erradicar este tumor (datos no mostrados). En resumen, estos datos son los primeros que muestran que células T de receptor quimérico de ROR1 tienen eficacia antitumoral *in vivo*, y sugieren que, para neoplasias malignas de células B, un receptor quimérico de ROR1 optimizado tal como R12 puede ser eficaz y no afectar a células B CD19<sup>+</sup> normales que carecen de expresión de ROR1.

***Las células T que expresan el receptor quimérico de ROR1 de R12 tienen una reactividad superior en comparación con 2A2 contra células tumorales epiteliales ROR1<sup>+</sup>***

25 25 Se ha detectado ROR1 en muchos tumores epiteliales, aunque se desconoce si la expresión de ROR1 es suficiente para el reconocimiento por células T de receptor quimérico de ROR1. Usando citometría de flujo, se confirmó la expresión de ROR1 en líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y 468, y en las líneas de carcinoma de células renales FARP, TREP y RWL (figura 10A). Después se analizó el reconocimiento tumoral por células T CD8<sup>+</sup> transducidas con los receptores quiméricos de ROR1 de R12 con el espaciador corto óptimo y dominio de 4-1BB, y se observó un reconocimiento eficiente de MDA-MB-231, MDA-MB-468, FARP, TREP y RWL (figura 11A). Se analizó la secreción de citocinas y proliferación de células T modificadas con los receptores quiméricos de ROR1 de R12 y 2A2 después del cultivo conjunto con MDA-MB-231, y se observó una mayor producción de citocinas y proliferación con el receptor quimérico de ROR1 de R12 (figura 11 B, C). De manera similar a lo observado con neoplasias malignas de células B ROR1<sup>+</sup>, la activación superior de células T de receptor quimérico de ROR1 de R12 después de la estimulación con MDA-MB-231 no estuvo asociada con un aumento de AICD (R12: 9,8 % frente a 2A2: 10,9 %).

## Discusión

40 40 ROR1 ha atraído interés como posible diana para inmunoterapia contra el cáncer debido a su expresión en la superficie de muchos cánceres epiteliales y linfoides de células B, incluyendo subconjuntos de cáncer de pulmón, colorrectal y de células renales. Anteriormente se mostró que LLC y LCM se reconocían específicamente por células T modificadas para expresar un receptor quimérico específico de ROR1 (Hudecek M, *et al.* Blood. 2010; 116(22):4532-41. Publicación electrónica el 13/08/2010). El diseño y la función de receptores quiméricos de ROR1 se han mejorado mediante modificación del dominio espaciador extracelular y derivando el receptor quimérico a partir de un scFV de afinidad superior, y demuestran que células T modificadas con receptores quiméricos de ROR1 diseñados tienen actividad *in vivo* contra linfoma de células B ROR1<sup>+</sup> y actividad *in vitro* contra una amplia gama de tumores epiteliales.

50 50 Se comparó la función de células T modificadas con receptores quiméricos de ROR1 derivados a partir del AcM 2A2 que contenían o bien el espaciador de "bisagra-CH2-CH3" de Fc de IgG4 largo original que se ha mostrado que permite una expresión en superficie celular de alto nivel, o bien variantes truncadas de espaciador de "bisagra-CH3" intermedio y "sólo bisagra" corto. Se conservó el dominio de bisagra de 12 AA en el presente constructo de espaciador corto basándose en datos previos de que se requería un espaciador flexible para separar el scFV de la membrana de célula T y permitir el reconocimiento de antígeno en células tumorales (Fitzgerald CJ, *et al.*, Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optimal design for T cell activation. J Immunol. 1998; 160(1):145-54. Publicación electrónica el 29/04/1998).

60 60 Los presentes estudios con el receptor quimérico de ROR1 de 2A2 muestran que la secreción de citocinas y proliferación de células T después del reconocimiento de células tumorales son superiores con los constructos de espaciador intermedio y corto en comparación con el constructo de espaciador largo. La tinción con Ac anti-F(ab) mostró una expresión de receptor quimérico equivalente de los tres receptores, demostrando que la función de células T mejorada con el receptor quimérico de espaciador corto no se debía a diferencias en la densidad de receptor quimérico. Estos datos respaldan el principio de que el diseño de espaciadores extracelulares debe ajustarse a medida para cada molécula y epítopo diana.

65 65 La afinidad del scFV seleccionado para diseñar un receptor quimérico es un parámetro adicional que puede afectar al

reconocimiento de células T. Se generó y caracterizó un panel de AcM específicos de ROR1 de diferentes afinidades y se seleccionó el AcM R12, que reconoce un epítopo en la región de tipo Ig/Frizzled como 2A2. R12 tiene una afinidad superior por proteína de ROR1 debido a una disociación mucho más lenta. El receptor químérico de R12, al igual que el receptor químérico de 2A2, confirió un reconocimiento y función de células T óptimos cuando se diseñó con un espaciador extracelular corto. Una comparación directa de proliferación y producción de citocinas después del acoplamiento a tumor por células T modificadas con los receptores químéricos de 2A2 y R12 demostró que el receptor químérico de R12 derivado a partir del AcM de afinidad superior era superior. Se planteó la preocupación de que la disociación más lenta de R12 a partir de ROR1 pudiera prolongar la activación de células T y conferir una propensión aumentada a AICD. Sin embargo, se detectó una tasa inferior de AICD en células T modificadas con el receptor químérico de ROR1 de R12 en comparación con 2A2, demostrando que la afinidad aumentada de R12 no tenía ningún efecto perjudicial sobre la supervivencia de células T en los presentes modelos preclínicos.

ROR1 tiene una posible ventaja con respecto a CD19 como diana para LLC y LCM dado que no se expresa en células B de memoria y vírgenes maduras normales. Sin embargo, hay un número inferior de moléculas de ROR1 en tumores de células B en comparación con CD19 y no está claro si un receptor químérico de ROR1 optimizado será tan eficaz como un receptor químérico de CD19 similar en cuanto al diseño a los que están usándose en la clínica. Desafortunadamente, los modelos de xenoinjerto de tumor de células B usados anteriormente en ratones NSG para evaluar la función de células T de receptor químérico de CD19 incluyendo Raji, Daudi y Nalm-6, no se derivan a partir de LLC o LCM y no expresan ROR1 de manera constitutiva. Por tanto, para comparar la selección como diana de CD19 y ROR1 *in vivo*, se usó la línea celular de LCM JeKo-1, que expresa de manera natural tanto CD19 como ROR1 y se injerta en ratones NSG. Para hacer que el presente modelo fuera clínicamente relevante, se inocularon células de linfoma JeKo-1 por vía intravenosa para generar tumores sistémicos y se trataron los ratones con productos de células T de compatibilidad uniforme una vez establecidos los tumores. Se encontró que las células T que expresaban el receptor químérico de R12 de alta afinidad conferían una actividad antitumoral *in vivo* equivalente a células T de receptor químérico de CD19. De manera compatible con el presente análisis *in vitro*, el receptor químérico de ROR1 de R12 también medió en una actividad *in vivo* superior en comparación con el receptor químérico de ROR1 de 2A2 óptimo. Estos resultados deben interpretarse cuidadosamente dado que los modelos tumorales murinos pueden no predecir la eficacia de terapia adoptiva en entornos clínicos. Sin embargo, los resultados sugieren que ROR1 merece una consideración como alternativa a CD19, o para proporcionar una diana adicional para minimizar la posibilidad de que surjan variantes sin CD19.

ROR1 parece desempeñar un papel decisivo en la supervivencia de algunos tumores epiteliales. Por tanto, una ventaja de seleccionar ROR1 como diana es que un único receptor químérico puede ser útil para tratar a pacientes con un gran número de tumores hematopoyéticos y no hematopoyéticos.

Los presentes datos muestran por primera vez que células T que expresan un receptor químérico de ROR1 diseñado reconocen de manera eficiente cánceres epiteliales *in vitro*. La secreción de citocinas y proliferación de células T inducidas por células de cáncer de mama ROR1+ fueron superiores a las inducidas por células de leucemia, a pesar de la ausencia del ligando coestimulador de CD80/86. Los estudios notificados en este caso demuestran que The el diseño del dominio espaciador extracelular y la afinidad del receptor químérico son parámetros que pueden modularse para potenciar el reconocimiento de tumores hematológicos y epiteliales ROR1+ *in vitro* e *in vivo* por células T modificadas con receptor químérico de ROR1. El desarrollo de receptores químéricos de ROR1 con reactividad tumoral potenciada proporciona la oportunidad de aplicaciones clínicas en una variedad de cánceres humanos.

#### 45 Ejemplo 2.

##### **Efecto de la longitud de dominio espaciador extracelular sobre la activación de lisis de células tumorales con un receptor químérico específico de Her2 que reconoce un epítopo ubicado proximal a la membrana de célula tumoral.**

El efecto de la longitud de espaciador de CAR sobre el reconocimiento y la activación del reconocimiento de células tumorales por linfocitos T humanos CD8+ que expresaban un receptor químérico específico de HER2 se examinó usando métodos similares a los descritos anteriormente para ROR1. Se construyeron receptores químéricos específicos de HER2 usando segmentos de cadena de VL y VH de un AcM específico de HER2 que reconoció un epítopo proximal a la membrana en HER2 (figura 12A), y se unieron los scFV a dominios espaciadores extracelulares de bisagra de IgG4/CH2/CH3, bisagra de IgG4/CH3 y sólo bisagra de IgG4 y al dominio transmembrana de CD28, dominios de señalización de 4-1BB y CD3 zeta (figura 12B). Se transdijeron células T CD8+ primarias con cada uno de los receptores químéricos de HER2 y se seleccionaron para la expresión del marcador de transducción de EGFR (figura 12D). Se confirmaron la expresión de los receptores químéricos de HER2 y el tamaño de cada receptor mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 12C). Después se expandieron las células T con AcM anti-CD3 y células alimentadoras y se examinaron para determinar su capacidad para reconocer células tumorales HER2+. Tal como se observó con el receptor químérico específico de ROR1 de R11, el receptor químérico de HER2 que contenía un dominio espaciador extracelular largo confirió un reconocimiento por células T superior de células tumorales HER2+ (figura 12E).

#### 65 Discusión

Este ejemplo del efecto de la longitud de espaciador extracelular sobre el reconocimiento por células T modificadas con receptor químérico de células tumorales usó un receptor químérico que comprendía un scFv construido a partir de las secuencias de VH+L del AcM químérico Herceptin. Estudios de Cho et al (Nature 421:756, 2003) localizaron la ubicación de epítopo de Herceptin en una ubicación proximal a la membrana en el dominio extracelular de HER2 (ERRB2) (figura 12A). Basándose en el presente conocimiento de la estructura de variantes de bisagra de Fc de IgG4 humana (figura 12B), se planteó la hipótesis de que una ubicación proximal a la membrana del epítopo de direccionamiento en un antígeno de célula tumoral extracelular se reconocería mejor por células T efectoras que expresan un receptor químérico que codifica para un espaciador largo. Los presentes datos demuestran un gradiente de actividad citolítica desde casi actividad de fondo por células T que expresan un receptor químérico de Herceptin de espaciador corto, hasta actividad intermedia por células T que expresan un receptor químérico de espaciador de longitud media y lisis máxima por células T que expresan el receptor químérico con espaciador largo. Por tanto, el espaciador extracelular tiene efectos definitivos sobre el reconocimiento tumoral por células T, y estos datos proporcionan un soporte adicional de la necesidad de ajustar a medida el diseño de receptor químérico basándose en la ubicación de epítopo de moléculas diana expresadas en tumor.

### Ejemplo 3.

**Personalización de la secuencia y longitud de espaciador para un reconocimiento y eficacia *in vivo* óptimos de CD19 con células T modificadas con receptor químérico.**

#### Materiales y métodos

##### Sujetos humanos

Se obtuvieron muestras de sangre a partir de donantes sanos que proporcionaron el consentimiento informado por escrito para participar en protocolos de investigación aprobados por la junta de revisión institucional del Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCRC). Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) y se cri Conservaron en RPMI, suero humano al 20 % y dimetilsulfóxido al 10 %.

##### Líneas celulares

Las líneas celulares K562, Raji, JeKo-1 y 293T se obtuvieron a partir de la Colección americana de cultivos tipo (Manassas, VA) y se cultivaron tal como se indica. Se produjo un lentivirus que codificaba para el gen ffluc en el sentido de 5' de una secuencia de T2A y eGFP en células 293T y se usó para transducir células tumorales Raji y JeKo-1. Se expandieron células Raji y JeKo-1 después de la transducción lentiviral y se purificó por clasificación el subconjunto positivo para eGFP.

##### Inmunofenotipado

Se tuvieron PBMC y líneas de células T con uno o más de los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados: CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD69 y controles de isótipo coincidente (BD Biosciences). Se realizó tinción con yoduro de propidio (PI, BD Biosciences) para la distinción de células vivas/muertas tal como se indica por el fabricante. Se realizaron análisis de flujo en un dispositivo FACSCanto, purificaciones por clasificación en un dispositivo FACS Aria II (Becton Dickinson) y se analizaron los datos usando el software FlowJo (Treestar).

##### Construcción de vectores y preparación de lentivirus que codifica para receptor químérico de CD19

Se construyeron receptores químéricos específicos de CD19 usando: (1) los segmentos de cadena de VL y VH del AcM específico de CD19 FMC63 (SEQ ID NO: 3), unido mediante un péptido ligador (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 12) (VL-ligador-VH); (2) un dominio espaciador derivado a partir de Fc de IgG4 (base de datos Uniprot: P01861, (SEQ ID NO: 13)) que comprendía o bien la porción de bisagra-CH2-CH3 (229 AA, (SEQ ID NO:)) o bien sólo bisagra (12 AA; (SEQ ID NO: 4)). Ambos espaciadores contenían una sustitución S → P dentro del dominio de bisagra ubicada en la posición 108 de la proteína de Fc de IgG4 nativa; el dominio transmembrana de 27 AA de CD28 humano (base de datos Uniprot: P10747, (SEQ ID NO: 14)); (4) un módulo de señalización que comprendía o bien (i) el dominio citoplásmico de 41 AA de CD28 humano con una sustitución LL → GG ubicada en la posición 186-187 de la proteína de CD28 nativa (SEQ ID NO: 14); y/o bien (ii) el dominio citoplásmico de 42 AA de 4-1BB humano (base de datos Uniprot: Q07011, (SEQ ID NO: 15)); unido al (iii) dominio citoplásmico de 112 AA de la isoforma 3 de CD3ζ humano (base de datos Uniprot: P20963, (SEQ ID NO: 16)); la secuencia de T2A de autoescisión (SEQ ID NO: 8); y (6) una secuencia de receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFR) (SEQ ID NO: 9).

Se sintetizaron secuencias de nucleótidos con codones optimizados que codificaban para cada transgén (Life Technologies, Carlsbad, CA) y se clonaron en el vector lentiviral epHIV7 usando sitios de restricción NheI y NotI. El vector lentiviral epHIV7 se había derivado a partir del vector pHIV7 sustituyendo el promotor de citomegalovirus de pHIV7 por un promotor de EF-1.

5 Se produjo lentivirus que codificaba para receptor quimérico de CD19 o tEGFR en células 293T transfectadas conjuntamente con el vector lentiviral y los vectores de empaquetamiento pCHGP-2, pCMV-Rev2 y pCMV-G usando reactivo de transfección Calphos (Clontech). Se cambió el medio 16 h después de la transfección y se recogió el lentivirus después de 24, 48 y 72 h.

#### **Generación de líneas de células T que expresan los receptores químéricos de CD19**

10 Se activaron células T de memoria central ( $T_{CM}$ )  $CD8^+ CD45RA^- CD45RO^+ CD62L^+$  purificadas por clasificación de donantes normales con perlas anti-CD3/CD28 (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante, y se transdujeron con sobrenadante de lentivirus (MOI = 3) complementado con polibreño 1  $\mu\text{g/ml}$  (Millipore) en el día 3 después de la activación mediante centrifugación a 2.100 rpm durante 45 min a 32 °C. Se expandieron las células T en RPMI, suero humano al 10 %, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina al 1 % (medio CTL), complementado con IL-2 humana recombinante (rh) hasta una concentración final de 50 U/ml cada 48 h. Después de la expansión, se 15 tiñó una alícuota de cada línea de células T transducidas con anticuerpo anti-EGFR (receptor de factor de crecimiento epitelial) conjugado con biotina y perlas de estreptavidina (Miltenyi), y se aislaron células T tEGFR $^+$  mediante selección inmunomagnética.

20 Después se estimuló el subconjunto de células T tEGFR $^+$  con TM EBV-LCL irradiadas (8.000 rad) a una razón de células T: LCL de 1:7, y se expandieron durante 8 días en medio CTL con adición de rh IL-2 50 U/ml cada 48 h.

#### **Ensayos de liberación de cromo, secreción de citocinas y proliferación de CFSE**

25 Se marcaron células diana con  $^{51}\text{Cr}$  (PerkinElmer) durante la noche, se lavaron y se incubaron por triplicado a  $1-2 \times 10^3$  células/pocillo con células T efectoras a diversas razones de efector con respecto a diana (E:T). Se recogieron los sobrenadantes para recuento y después de una incubación de 4 horas y se calculó la lisis específica usando la fórmula convencional. Para los análisis de la secreción de citocinas, se sembraron en placas células diana y efectoras en pocillos por triplicado a una razón de E:T de 2: 1 (Raji) o 4: 1 (K562/CD19 y K562), y se midieron INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 mediante inmunoensayo de citocinas multiplexado (Luminex) en sobrenadante retirado después de 30 una incubación de 24 horas.

Para el análisis de proliferación, se marcaron células T con éster succinimidílico de carboxifluoresceína 0,2  $\mu\text{M}$  (CFSE, Invitrogen), se lavaron y se sembraron en placas en pocillos por triplicado con células estimuladoras a una razón de 2:1 (Raji) o 4:1 (K562/CD19 y K562) en medio CTL sin citocinas exógenas. Después de 72 h de incubación, se 35 marcaron las células con AcM anti-CD3 y yoduro de propidio (PI) para excluir células muertas del análisis. Se analizaron las muestras mediante citometría de flujo y división celular de células T CD3 $^+$  vivas evaluadas mediante dilución de CFSE.

#### **Experimentos en ratones NOD/SCID y NOD/SCID/ $\gamma\text{c}^{-/-}$ (NSG)**

40 Todos los experimentos con ratones se aprobaron por el comité institucional de uso y receptores químéricos de animales FrCrC. Se obtuvieron ratones hembra NOD.CB17-Prkdc $^{scid}$ /J (NOD/SCID) y NOD.Cg-Prkdc $^{scid}$  II2rg $^{tm1Wjl}$ /SzJ (NSG) de seis a 8 semanas de edad del Jackson Laboratory o se criaron de manera interna (FRCRC). A los ratones se les inyectaron por vía intravenosa (i.v.)  $0,5 \times 10^6$  células tumorales Raji-ffluc mediante inyección en la vena de la cola y recibieron inyecciones de células T modificadas con receptor químérico, células T de control o PBS mediante inyección en la vena de la cola tal como se indica.

50 Para la obtención de imágenes por bioluminiscencia, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de sustrato de luciferina recién preparado (Caliper Life Sciences, MA) resuspendido en PBS (15  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal) y después se anestesiaron con isoflurano en una cámara de inducción. Después de la inducción de anestesia profunda, se obtuvieron imágenes de los ratones usando un sistema de obtención de imágenes *in vivo* Xenogen IVIS (Caliper Life Sciences, MA) a los 10, 12 y 14 minutos tras la inyección i.p. de luciferina a un tiempo de adquisición de 1 segundo a 1 minuto en modo de agrupaciones pequeñas para obtener imágenes no saturadas. Se analizó la actividad luciferasa usando el software Living Image (Caliper Life Sciences, MA) y se analizó el flujo de fotones dentro de regiones de interés que abarcaban todo el cuerpo de cada ratón individual.

#### **Análisis estadísticos**

60 Se realizaron análisis estadísticos usando el software Prism (GraphPad, CA). Se realizó la prueba de la t de Student como prueba bilateral con un intervalo de confianza del 95 % y los resultados se consideraron significativos con un valor de p de  $p < 0,05$ . Se realizaron análisis estadísticos de supervivencia mediante pruebas de los rangos logarítmicos y los resultados se consideraron significativos con un valor de p de  $p < 0,05$ .

#### **Resultados**

65 **Preparación de líneas celulares derivadas de  $T_{CM}$  CD8 $^+$  policlonales que expresan receptores químéricos de**

***CD19 con espaciadores extracelulares largos y cortos***

- Se construyeron vectores lentivirales individuales que codificaban para un panel de genes de receptor quimérico de CD19 con codones optimizados para examinar la influencia de la longitud de espaciador extracelular sobre la función *in vitro* y la actividad antitumoral *in vivo* de células T modificadas con receptor quimérico de CD19. Cada receptor quimérico estaba compuesto por un fragmento variable de cadena sencilla correspondiente a la secuencia del AcM específico de CD19 FMC63 (scFv: VL-VH), un espaciador derivado a partir de Fc de IgG4 incluyendo o bien el dominio de "bisagra-CH2-CH3" (229 AA, espaciador largo) o bien el sólo el dominio de "bisagra" (12 Aa, espaciador corto), y un módulo de señalización de CD3ζ con dominios coestimuladores de CD28 o 4-1BB proximales a la membrana, o bien solos o bien en tandem (figura 13A). El casete de transgén incluía un EGFR truncado (tEGFR) en el sentido de 3' desde el gen de receptor quimérico y separado por un elemento de T2A escindible, para servir como marcador de transducción, selección y seguimiento *in vivo* para células T modificadas con receptor quimérico.
- Se aisló una población celular de células T de memoria central ( $T_{CM}$ ) CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> mediante clasificación celular a partir de la sangre de donantes normales para su transducción y expansión, debido a la capacidad superior de  $T_{CM}$  para persistir *in vivo* después de la transferencia adoptiva. Se estimularon células T CD8<sup>+</sup> con perlas anti-CD3/28, se transdijeron con cada uno de los vectores lentivirales y se expandieron en cultivo durante 18 días antes de usarse para experimentos *in vitro* e *in vivo* (figura 13B). Se lograron eficiencias de transducción similares con cada uno de los vectores lentivirales (media del 25 %) y se enriquecieron células T positivas para transgén hasta una pureza uniforme mediante selección inmunomagnética usando un AcM anti-EGFR biotinilado y perlas de estreptavidina. Tras el enriquecimiento de tEGFR, se expandieron cada una de las líneas de células T de receptor quimérico de CD19 mediante una única estimulación con BLCL CD19<sup>+</sup>, sin diferencias aparentes en la cinética de crecimiento *in vitro* entre líneas de células T que expresaban los diversos constructos de receptor quimérico de CD19. Después de la expansión, el marcador de tEGFR se expresaba a niveles equivalentes en >90 % de las células T transducidas con cada uno de los vectores (figura 13C).

***Los receptores quiméricos de CD19 con dominio espaciador extracelular largo y corto confieren reactividad antitumoral *in vitro* específica***

- Se comparó la función efectora de líneas de células T derivadas de Tcm modificadas para expresar receptores químicos de CD19 con restos de señalización coestimuladores de CD28 y 4-1BB, y un dominio espaciador extracelular o bien corto ("corto/CD28"; "corto/4-1BB") o bien largo ("largo/CD28"; "largo/4-1BB") respectivamente. Las células T que expresaban cada uno de los 4 constructos de receptor quimérico de CD19 confirmaron actividad citolítica específica contra células de linfoma Raji y JeKo-1 CD19<sup>+</sup>, y contra células K562 que se habían transfectado de manera estable con CD19, pero no células K562 CD19 vírgenes (figura 14A). Los análisis cuantitativos de la producción de citocinas en respuesta a la estimulación con células tumorales K562/CD19 o Raji mediante ensayo de citocinas multiplexado (Luminex) mostraron la producción de IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 por células T que expresaban cada uno de los receptores químicos de CD19 (figura 14B). Las células T que expresaban receptores químicos de CD19 con un dominio coestimulador de CD28 produjeron niveles significativamente superiores de IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-10 en comparación con los constructos correspondientes con un dominio coestimulador de 4-1BB (figura 14B, C).

Hubo una producción de IFN-γ significativamente superior y significativamente menos producción de IL-4 por células T que expresaban el receptor químico "largo/CD28" de CD19 en comparación con aquellas que expresaban el receptor químico "corto/CD28". Entre los receptores químicos de CD19 con módulo de señalización coestimulador de 4-1BB, se detectaron niveles significativamente superiores de secreción de IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-10 en células T que expresaban el constructo con el dominio espaciador corto (figura 14B, C).

- Se usó dilución de colorante de CFSE para analizar la proliferación de células T modificadas con cada uno de los receptores químicos de CD19 después del acoplamiento de células tumorales CD19<sup>+</sup>. Se observó proliferación específica y vigorosa de cada una de las líneas de células T de receptor químico de CD19 72 horas después de la estimulación o bien con K562/CD19 o bien con Raji. El número promedio de divisiones celulares fue superior para las células T de receptor químico de CD19 con un dominio coestimulador de CD28 en comparación con aquellas con 4-1BB, de manera compatible con una mayor producción de IL-2 por células T que expresan un receptor químico que contiene CD28 (figura 14B-D). También se analizó la proporción de células T de receptor químico que experimentaron muerte celular inducida por activación después de la estimulación con células tumorales K562/CD19 y Raji al final de las 72 horas mediante tinción conjunta del cultivo con CD3<sup>+</sup> y PI. Se detectó una frecuencia superior de células T CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> PI<sup>+</sup> en la línea celular de receptor químico de CD19 "largo/4-1BB", pero se observaron pocas células PI<sup>+</sup> con los otros receptores químicos de CD19 (figura 14E).

- Este análisis de las funciones efectoras *in vitro* fue compatible con estudios anteriores que han comparado dominios coestimuladores de CD28 y 4-1BB y no reveló diferencias en la función de células T que sugerían que un constructo de receptor químico de CD19 particular de este panel carecería de eficacia antitumoral *in vivo*.

- Las células T que expresan receptores químicos de CD19 con dominios espaciadores extracelulares cortos pero no dominios espaciadores extracelulares largos erradican tumores de Raji en modelos de ratón inmunodeficiente***

A continuación se evaluó la eficacia antitumoral *in vivo* de células T modificadas con cada uno de los receptores químéricos de CD19 en ratones inmunodeficientes (NOD/SCID) con injerto de células Raji transfectadas con luciferasa de luciérnaga (Raji-ffluc), lo cual permite análisis cuantitativos secuenciales de carga y distribución tumoral usando obtención de imágenes por bioluminiscencia. Los ratones NOD/SCID en los que se inocularon  $0,5 \times 10^6$  células Raji-ffluc mediante inyección en la vena de la cola desarrollaron linfoma diseminado, que, si no se trata, conduce a parálisis de las patas traseras después de aproximadamente 3,5 semanas, necesitando eutanasia. Se trataron ratones que portaban tumor con 2 dosis de células T derivadas de Tcm CD8<sup>+</sup> modificadas con cada uno de los receptores químéricos de CD19 o con un vector de control de tEGFR administrado en el día 2 y día 9 después de la inoculación de tumor (figura 15A).

Sorprendentemente, sólo las células T modificadas para expresar receptores químéricos de CD19 con dominio espaciador extracelular corto ("corto/CD28" y "corto/4-1BB") erradicaron tumores de Raji en este modelo, mientras que ratones tratados con células T que expresaban receptores químéricos de CD19 con espaciador largo ("largo/CD28" y "largo/4-1BB") desarrollaron linfoma sistémico y parálisis de las patas traseras con cinética casi idéntica a ratones no tratados o ratones tratados con células T tEGFR<sup>+</sup> de control (figura 15B, C). La diferencia sorprendente en la actividad antitumoral entre receptores químéricos de CD19 con dominios espaciadores corto y largo fue altamente significativa y reproducible en múltiples experimentos con líneas de células T de receptor químérico generadas a partir de 3 donantes normales diferentes.

El modelo de linfoma de NOD/SCID puede ser inferior al óptimo para predecir la actividad antitumoral en un entorno clínico debido al corto intervalo entre inoculación de tumor y administración de células T y la mayor resistencia frente al injerto de células humanas en comparación con razas de ratón más inmunodeficientes tales como NOD/SCID/yc<sup>-/-</sup> (NSG). Por tanto, se evaluó la actividad antitumoral de terapia adoptiva en un modelo clínicamente más relevante en el que se estableció linfoma de Raji-ffluc en ratones NSG, y se administraron las células T de receptor químérico de CD19 después de 7 días cuando el tumor era fácilmente detectable en la médula ósea mediante obtención de imágenes por bioluminiscencia (figura 16A). Se realizaron experimentos de ajuste de las dosis iniciales para determinar la dosis mínima de células T transducidas con el receptor químérico "corto/4-1BB" de CD19 que se requería para la erradicación de tumores de Raji establecidos. Una única dosis de  $2,5 \times 10^6$  células T que expresaban receptor químérico de CD19 "corto/4-1BB" fomentó una regresión completa de tumores de Raji establecidos y dio como resultado supervivencia libre de tumor a largo plazo en el 100 % de los ratones (figura 16B,C). Al nivel de dosis de  $2,5 \times 10^6$ , las células T se detectaron fácilmente en la sangre periférica de ratones NSG durante al menos 3 semanas tras la transferencia adoptiva y la erradicación del tumor. Por tanto, este modelo permitió estudios comparativos tanto de actividad antitumoral como de persistencia de células T modificadas con cada uno de los receptores químéricos de CD19 en el presente panel (figura 16D).

Después, se trataron cohortes de ratones NSG en los que se injertó linfoma de Raji con PBS solo, con una única dosis de  $2,5 \times 10^6$  células T que expresaban cada uno de los receptores químéricos de CD19 o con células T modificadas con un vector de control que codificaba para tEGFR (figura 17A). En este modelo de linfoma establecido, células T que expresaban receptores químéricos de CD19 con un dominio espaciador extracelular corto y dominios coestimuladores o bien de 4-BB o bien de CD28 ("corto/CD28" y "corto/4-1BB") mediaron en la regresión tumoral completa a lo largo de 7-10 días y todos los ratones sobrevivieron libres de tumor durante >56 días. En cambio, los ratones tratados con células T modificadas para expresar receptores químéricos de CD19 con un dominio espaciador largo ("largo/CD28" y "largo/4-1BB") mostraron progresión tumoral y tuvieron que sacrificarse en un tiempo similar a los ratones que habían recibido células T de tEGFR de control (figura 17B, C). La falta de actividad antitumoral *in vivo* de los constructos de receptor químérico con espaciadores largos no se esperaba dada la capacidad de células T que expresaban estos constructos para someter a lisis células tumorales *in vitro*, y la producción de IL-2 y proliferación potenciadas tras el acoplamiento de células T que expresaban el receptor químérico de CD19 "largo/CD28" en comparación con los constructos de 4-1BB.

Para proporcionar conocimiento sobre la base para la falta de eficacia, se realizó citometría de flujo secuencial en muestras de sangre periférica de ratones a intervalos después de la infusión de células T. Todos los ratones tratados con células T que expresaban los receptores químicos de CD19 "corto/CD28" y "corto/4-1BB" tenían niveles significativamente superiores de células T transferidas en la sangre en todos los puntos de tiempo después de la transferencia adoptiva, en comparación con ratones tratados con células T que expresaban receptores químicos de CD19 correspondientes con espaciador extracelular largo ( $p<0,01$ ) (figura 17D). No se observaron diferencias significativas en la persistencia de células T en la sangre periférica de ratones que habían recibido células T que expresaban receptores químicos de CD19 con dominios coestimuladores de CD28 o 4-1BB y dominios espaciadores corto (figura 17D).

**La eficacia antitumoral *in vivo* de receptores químicos de CD19 con espaciadores largos no se mejora aumentando la dosis de células T o proporcionando un dominio coestimulador adicional**

La falta de eficacia antitumoral *in vivo* y el nivel inferior de células T de receptor químico persistentes en ratones tratados con células T modificadas con receptores químicos de CD19 con dominios espaciadores largo sugirieron que la eficacia podía mejorarse aumentando la dosis de células T de receptor químico o incluyendo dominios tanto

- de CD28 como de 4-1BB en el receptor quimérico para aumentar la señalización coestimuladora. Para evaluar esta posibilidad se modificaron  $T_{CM}$  CD8 $^{+}$  con vectores de receptor quimérico de CD19 "largo/CD28", "corto CD28" y "largo/CD28\_4-1 BB" y se confirmó que el receptor quimérico de CD19 "largo/CD28\_4-1 BB" confería lisis específica y producción de citocinas *in vitro* después del reconocimiento de células diana CD19 $^{+}$  (figura 18A-C). De manera compatible con estudios anteriores de receptores quiméricos de CD19, el nivel de producción de citocinas y proliferación *in vitro* en células T que expresaban el receptor quimérico de CD19 de "CD28\_4-1BB" fue inferior en comparación con el constructo idéntico con CD28 solo, y superior a células T que expresaban el receptor quimérico de CD19 "largo 4-1BB" (figura 18B, C).
- Después se trataron grupos de ratones NSG con tumores de Raji establecidos con una alta dosis de células T (10x106), células T que expresaban el receptor quimérico de CD19 "largo/CD28", el receptor quimérico de CD19 "largo/CD28\_4-1BB", el receptor quimérico de CD19 "corto/CD28" y tEGFR solo. Se midió la carga tumoral mediante obtención de imágenes por bioluminiscencia y análisis por citometría de flujo en serie de muestras de sangre periférica realizados para determinar la frecuencia de células T transferidas. De manera compatible con los resultados de los presentes experimentos anteriores usando dosis muy inferiores de células T, los tumores de Raji se erradicaron completamente en ratones tratados con células T que expresaban el receptor quimérico de CD19 "corto/CD28". Sin embargo, incluso con una dosis de células T 4 veces superior, el tratamiento con células T que expresaban el receptor quimérico de CD19 "largo/CD28" o el receptor quimérico de CD19 "largo/CD28\_4-1BB" no proporcionó un efecto antitumoral distinguible (figura 18D,E).
- Por tanto, aumentar la dosis de células T de receptor quimérico y añadir un dominio coestimulador de 4-1BB a receptores quiméricos de CD19 no logró superar el impacto negativo del dominio espaciador más largo sobre la actividad antitumoral *in vivo*. Por tanto, en este modelo, la reactividad antitumoral de receptores quiméricos de CD19 está dictada en gran medida por la longitud del dominio espaciador extracelular, y no por los módulos de señalización coestimuladores intracelulares.
- Las células T modificadas con receptores quiméricos de CD19 que presentan espaciadores extracelulares largos experimentan muerte celular inducida por activación *in vivo****
- Se buscó determinar posibles mecanismos subyacentes a la actividad antitumoral *in vivo* inferior de células T que expresaban receptores quiméricos de CD19 con dominios espaciadores largos. Dado que estaban presentes en la sangre números inferiores de células T transferidas modificadas para expresar receptores quiméricos de CD19 con dominios espaciadores largos, se consideró la posibilidad de que las células T no se activaran de manera eficiente por células tumorales *in vivo* o, a la inversa, de que experimentaran muerte de células T inducida por activación *in vivo*.
- Por tanto, se marcaron células T modificadas con receptor quimérico de CD19 y de control correspondientes con CFSE y se administraron estas células T a ratones NSG/Raji que portaban tumores para examinar la activación, proliferación y supervivencia de células T modificadas con cada uno de los constructos de receptor quimérico de CD19 en sitios tumorales *in vivo* (figura 19A). Al final de su expansión *in vitro* e inmediatamente antes del marcaje con CFSE y la infusión en ratones NSG que portaban tumores de Raji establecidos, las células T transducidas con cada uno de los receptores quiméricos de CD19 expresaron niveles bajos de los marcadores de activación CD69 y CD25 (figura 19B).
- Se obtuvo médula ósea a partir de subgrupos de ratones 24 y 72 horas después de la infusión de células T para examinar la frecuencia, activación y proliferación de células T transferidas. A las 24 horas, las células tumorales (CD45 $^{+}$  CD3 $^{+}$ ) estaban presentes en la médula ósea en todos los grupos de tratamiento y una gran fracción de células T de receptor quimérico, pero no células T de control, habían regulado por incremento CD69 y CD25. No hubo ninguna dilución medible de CFSE en las células T de receptor quimérico transferidas (figura 19C). Tanto CD69 como CD25 se expresaron en una proporción superior de células T modificadas con receptores quiméricos de CD19 de "espaciador largo", lo que sugiere que estas células pueden haber recibido un estímulo más fuerte en comparación con células T con receptores quiméricos de CD19 de "espaciador corto" (figura\_C). A pesar de la evidencia de activación de células T a las 24 horas, había números significativamente inferiores de células T de receptor quimérico en la médula ósea de ratones tratados con células T modificadas con los constructos de "espaciador largo" de CD28 y 4-1BB en comparación con aquellas modificadas con los constructos de "espaciador corto" de CD28 y 4-1BB, o con el vector de tEGFR de control (figura 19C, E).
- A las 72 horas después de la transferencia de células T, las células T que expresaban los receptores quiméricos de CD19 "corto/CD28" y "corto/4-1BB" habían aumentado de 3 a > 10 veces la frecuencia en la médula ósea y el bazo, y habían experimentado varias divisiones celulares (figura 19D,E). Las células T tEGFR $^{+}$  de control siguieron estando presentes en la médula ósea y el bazo a las 72 horas a un nivel similar al observado a las 24 horas, y no se habían dividido tal como se mide mediante dilución de CFSE. En cambio, los números de células T que expresaban los receptores quiméricos de CD19 "largo/CD28" y "largo/4-1BB" no habían aumentado en la médula ósea y el bazo (figura 19D, E). De manera compatible con números de células inferiores, el análisis de tinción de CFSE en células T de receptor quimérico de CD19 "largo/CD28" y "largo/4-1BB" PI $^{+}$  viables demostró que estas células habían experimentado un número muy inferior de divisiones celulares en comparación con células T de receptor quimérico de CD19 "corto/CD28" y "corto/4-1BB" (figura 19D). Cuando se analizaron los datos de flujo para incluir células T PI $^{+}$ , se detectó una frecuencia muy superior de células T CD3 $^{+}$  PI $^{+}$  en médula ósea y bazo de ratones que recibieron células T de receptor quimérico de CD19 con dominios de "espaciador largo", demostrando que una proporción significativa

de células T, a pesar de activarse mediante tumor *in vivo*, habían experimentado muerte celular (figura 19F). De manera compatible con la obtención de imágenes por bioluminiscencia, las células tumorales Raji CD45<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> estaban presentes en números mayores en la médula ósea de ratones tratados con células T que expresaban receptores químéricos de CD19 con dominios espaciadores largos o que expresaban sólo tEGFR en comparación con ratones tratados con receptores químéricos de CD19 con dominios espaciadores cortos (figura 19D, E, G).

5 De manera colectiva, los datos proporcionan evidencias de que los receptores químéricos de CD19 con dominio espaciador extracelular largo, a pesar de mediar en una función efectora equivalente o superior *in vitro* y reconocer tumor *in vivo*, inducen un alto nivel de muerte celular inducida por activación *in vivo* y no logran erradicar el linfoma establecido.

## Discusión

15 Los receptores químéricos son receptores artificiales que incluyen un scFv de unión a antígeno extracelular, un dominio espaciador que proporciona separación del scFv a partir de la membrana celular y un módulo de señalización intracelular que media en la activación de células T. Los receptores químéricos que contienen un scFv derivado a partir del AcM FMC63 específico de CD19 estudiados en este caso han avanzado a pruebas en ensayos clínicos en pacientes con neoplasias malignas de células B. La actividad antitumoral y la persistencia de células T han variado sustancialmente en diferentes ensayos. Cada uno de estos ensayos clínicos difirió en variables posiblemente críticas, 20 incluyendo diferentes vectores de transferencia génica, metodologías de cultivo celular y regímenes de acondicionamiento antes de la transferencia de células T de receptor químérico de CD19.

25 Se examinó la posibilidad de que el dominio espaciador extracelular de receptores químéricos de CD19 pueda ser un determinante importante de actividad antitumoral *in vivo*, independientemente de la señalización coestimuladora proporcionada por el receptor químérico. Se derivaron dominios espaciadores a partir de Fc de IgG4, lo cual permite altos niveles de expresión en superficie celular de receptor químérico y es menos probable que provoque reconocimiento por células inmunitarias innatas en comparación con otros isotipos de IgG. Se usó la "bisagra-CH2-CH3" de IgG4 en el diseño de los constructos de espaciador largo (229 AA) y el dominio de "bisagra" de IgG4 en los presentes receptores químéricos de espaciador corto (12 AA). Para comparar los constructos de receptor químérico individuales, se usaron células T derivadas de T<sub>CM</sub> cCD8<sup>+</sup> positivas para receptor químérico purificadas (>90 %) para eliminar diferencias en la composición celular y la frecuencia de transducción como posible fuente de sesgo en el análisis de la función *in vitro* e *in vivo*. Se ha mostrado que T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup> tiene rasgos superiores para inmunoterapia adoptiva, en comparación con otros subconjuntos de células T más prevalentes en sangre que persisten de manera escasa y son ineficaces en terapia tumoral. Las células T de receptor químérico de CD19 se generaron usando un protocolo de cultivo normalizado que es similar al usado para衍生 células T de receptor químérico para ensayos clínicos. Los presentes datos muestran que los receptores químéricos de CD19 con un espaciador de "bisagra" de IgG4 corto confirieron una potente reactividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*, mientras que los receptores químéricos de CD19 correspondientes con un espaciador largo de "bisagra-CH2-CH3" de IgG4, a pesar de una reactividad *in vitro* equivalente o superior, no lograron conferir efectos antitumorales significativos en modelos de linfoma murino. 30 40 Sorprendentemente, la longitud del dominio espaciador demostró ser un elemento decisivo para la actividad antitumoral *in vivo*, y la falta de eficacia del receptor químérico de "espaciador largo" no pudo superarse aumentando la dosis de células T.

45 También se observaron diferencias principales en la secreción de citocinas y proliferación *in vitro* entre células T que expresaban receptores químéricos de CD19 que contenían dominios coestimuladores de CD28 y 4-1BB, aumentando CD28 la secreción de IFN-γ, IL-2 y TNF-α en comparación con 4-1BB. Los receptores químéricos de CD19 que presentaban un tandem CD28\_4-1BB también produjeron niveles superiores de estas citocinas en comparación con receptores químéricos que codificaban sólo para 4-1BB. Sin embargo, los presentes datos muestran que estas diferencias en la función *in vitro* no eran predictivas de la eficacia antitumoral *in vivo*, dado que receptores químéricos 50 de CD19 con dominio coestimulador o bien de CD28 o bien de 4-1BB y un espaciador corto fueron eficaces de manera similar en la erradicación de tumores de Raji establecidos avanzados en ratones NSG. En cambio, los receptores químéricos de CD19 con longitud de espaciador inferior a la óptima y dominios coestimuladores de CD28, 4-1BB o ambos, a pesar de conferir una función *in vitro* similar al constructo de receptor químérico idéntico con un dominio espaciador corto, carecían de actividad antitumoral significativa *in vivo*, demostrando la contribución de la longitud de 55 espaciador a la función *in vivo* de células T de receptor químérico.

60 Los presentes estudios proporcionan conocimiento sobre el mecanismo responsable de la falta de eficacia *in vivo* de receptores químéricos de CD19 con dominios espaciadores largo. Las células T que expresan receptores químéricos de CD19 con dominios espaciadores tanto largo como corto pueden detectarse en la médula ósea y el bazo después de la transferencia adoptiva en ratones NSG que portan linfoma de Raji establecido, y la mayor parte se activaron tal como se demuestra mediante regulación por incremento de CD25 y CD69. Sin embargo, las células T modificadas para expresar un receptor químérico de CD19 con un dominio espaciador largo mostraron una disminución pronunciada del número de células, en contraposición a la marcada expansión *in vivo* de células T que expresan receptores químéricos de CD19 con un dominio espaciador corto. La disminución del número de células T fue consecuencia de niveles muy superiores de muerte celular en las primeras 72 horas después de la transferencia adoptiva en comparación con células T con dominios espaciadores corto, y células T de control que no expresaban 65

un receptor químérico de CD19. De manera colectiva, estos datos indican que el reconocimiento de células tumorales *in vivo* dio como resultado la muerte de células T que expresan receptores químéricos de CD19 con dominios espaciadores largo. Un mecanismo similar puede explicar la duración corta y los bajos niveles de persistencia de células T en los ensayos clínicos que emplearon receptores químéricos de CD19 de espaciador largo (14).

5 Los estudios notificados en este caso son los primeros en mostrar que los dominios espaciadores de receptores químéricos de CD19 que carecen de propiedades de señalización intrínsecas tienen efectos drásticos sobre la actividad antitumoral *in vivo* independientemente de la señalización coestimulador, e identificar la importancia de analizar la composición óptima de esta región en el diseño de receptores químéricos para aplicaciones clínicas.

Tabla 1

Secuencia de receptor químérico de espaciador corto anti-CD19

**GMCSFRss-CD19scFv-IgG4hinge-CD28tm-41BB-Zeta-T2A-EGFRt**

Atgttgttgtggtaccagccgttgtgtgcgagatgccccaaccccgcccttcgtgtatcccc  
**(GMCSFRss) (SEQ ID NO:2)**

Gacateccagatgacccagaccacetcagectgaggeccageectggcgcacgggtgaccatcagetgeggg  
ccageccaggacateageaagtacetgaacttgtatcageagaageccgaeggcaecgteaagetgetgatctac  
cacaccagccggtgeacagegggtgeccagegggttagggcageggctecccacactacageetgac  
catetccaaccttggAACAGGAAGATACTGECAGCAGGGAAACACACTGEECTACACCTTGG  
GGGGAAACAAAGCTGGAAATCACCGCAGCACCTEEGGCAGGGAAAGEETGGCAGEGGGAGGGCAGCACE  
AAGGGGGAGGTGAAGCTGCAGGAAGGGCCCTGGCTGGTGGECCCCAGCAGAGCCTGAGCCTGACCTGCA  
CTGAGGGGGTGAAGCTGCCGAETACGGGCTGAGCTGGATECCGGCAGCCCCCCCAGGAAGGGCTGGAAATG  
GETGGGGCTGATCTGGGGEAGCGAGACCACCTACAACAGCAGCCTGAAGAGCCTGGCAGGGTGAACCATCATAAG  
GACAACAGCAGAAGAGCAGGTGTCCTGAAGATGAAEAGCCTGAGACCGAAGACACCGECATCTAETGE  
CAAGCAGCTACTACGGGGCAGETACGCCATGGACTACTGGGGCAGGGCACCAGCCTGACCGTGA  
(CD19scFv) (SEQ ID NO:3)

(continuación)

Gatactaaatggaaaccccttcacccttgcct (bisagra de IgG4) (SEQ ID NO:4)

Aaacggggcagaagaaacttcgtatataattcaacaccatttatggatccaggatcaactcaaggaaatgcctttagctggcgatttcagaagaagaauaggaggatgtgaactg (41BB) (SEQ ID NO:6)

Cgggtgaagttcagcagaagegcgaaegeccccctgcctaccacgcaggccagaatacgctgtacaacgagtcga  
acetcggcagaagggaaagactacgaaegtctggataagcggagagccgggacectgagatggggggcaagc  
ctcggeggaaagaacccccaggaaggcctgtataacgaaactgcagaaagacaagatggcccgaggectacageg  
agatcgcatgasaggcggagcggagggggcaaggccacgacggcctgtatcaggcgttccacgcca  
ccaaaggataacetaegacgcccetgcacatgcaggccctgcccccaagg (CD3Zeta)- (SEQ ID NO:7)

**Ctcggggggggggagaggcagaggaagttttaacatgcggtgacgtggaggagaatccccccctagg  
(T2A) (SEQ ID NO:8)**

Tabla 2

GMCSFRss

ADN: ATGGCTCTGCTGTTGACCGCTCTCTCTTGCCAGGTGCGCGCGCGCGCGCGCG  
RNA: M I I L V T S L L C E L P H P A

CD19acFk

```

ADM: TTCTCTGCTGGCCCGCAGCATCCAGAGTGCCCCAGACGCCACGCCGAACTTGAACC
      P   L   L   A   P   D   I   Q   M   T   Q   R   S   S   S   L   S

```

ADN: GCGCGCTGCGCGCGGTGACCATGAGCTGCCGGCCAGGCCAGACAT  
 AA: R S L Q D R V \* I S C R A S Q D I

ADM: AGCCAGTACTGAACTGATACCGAAACGGCGACGCCGCCTGACGGCG  
 ARI: S K Y L N R Y Q Q K P D G T V K L

ADN: CTGATCTTACGCCCGGGCTGCACGCCGCGGCGCCGCGCGCTTTAGC  
AAI: L I V N T S R L H S Q V P G K P S

ADM: GAGATAGGGGAACTTACCTTTCCTCCACCAACCTGCGGCG

ADN: TTTGGCCCGGAGCTGAAATTCACCGGCGGACCTGGCG

ADONI: AACGGCTTCCGCGGTGCAACGGGAGCTTGATGCGGAA  
      A  G  C  G  G  G  G  G  G  G  G  G  G  G  G  G  G

ADM: CCCAAAGGAAGCCGCGCTGGAAATGCGCGCTGGCGCTGATCTGGCGAAGCGACCGCG  
AB: P R K S L S W F S V I E Q S D T T

ADN: TCTTCAGACGCGCCGCTGAAGGCCCGCTGNCATCATCAAGGACAAACG  
 ARI: Y X N S A L E S H Y T I I K O N S

AQN: AAGAGGCCAGGTTGTTTCCCTTGTAGATGAAACAGGCTTCAGACCCGACCGCAGCTTC  
 AA: K D Q V F L M H P S L O T C D R E A

ADN: ATCTTACTTACGCGGCGAAGCTACTTAACTGGCGCGCGCTAACGGCGCTTGAC  
DN: T X Y C A H L Y G C S Y A M D

#### Bisagra de IgG4

CD28m

ADN: GTGCTGGCCCTCTCTACGGCTCTCTGCTCAACCGTGGCTTCATCATTTTG  
 RA: V A A C T S A L Y T V A F I I F W

(continuación)

**41BB**

ADN: GTCGAAACCCGGCGAGAAGAACTCTGTATATATTCAAAACACCGTTATG  
 AA: V E R G R K N L L Y I F K Q P F F N

ADN: AGAACCTGATACAAACTCTCAAGAGGAAAGTGCTGTAGCTGCCGATTTCGA  
 AA: R P V Q T T Q S S D G C S C R F P

**CDD Zeta**

ADN: GAAGAAGAAGAAGCAGGATGTAACTTGGGGGTGAAG; TTTCAGGAGAAAGCCCC  
 AA: S E E E G G C E L R V K F S R S A

ADN: GACCCCGCTGGCTTACCGCCAGGGCGAGAAATCAGCTGTACACCGAGCTGAAC  
 AA: D A F A K Q Q G Q N Q L Y R E L N

ADN: CTGGGGCAGAACCGGAAAGAACTACACGCTGGCTGGATAACGGGAGAGGGGGGAC  
 AA: L C R R E S Y D V L D K R R G R D

ADN: CCTGAGATGGGGGGCGAGGCTGGGGGAGAGGACCCCCAGGAAGGCTGTAT  
 AA: P E M G C K P R B K N P Q R G L Y

ADN: AACGAAGCTGAGAAAGACAAGATGGGGAGGGCTTACACCGAGATGGCATG  
 AA: S E L Q K D E M A K A Y S E I Q N

ADN: AACGGGGAGGGGGAGGGGGGGCAAGGGGCAACGAGGGCTGTATGAGGGCTG  
 AA: K G E R R G K G H D G L Y Q G L

ADN: TCCACCGCCACCAAGGAATACCTACGACGGGGCTGACATGCGGGCTGCCC  
 AA: S T A T K D T Y D A L R N Q A L P

**TSA**

ADN: CCAGGGCTCGCGCGCGCGAGAGGCGAGGGAGGGAACTCTTGTACATCGCGT  
 AA: P R L E C G C E G R G S L L T C S

**EGFR**

ADN: GACCTGAGGAGAAATCCCGGGCTTACG; ATGCTTCTCTGGCTGACAAGGCTT  
 AA: D V E S N P G P R M L L L V T S L

ADN: CTGGCTCTGTGACTTACCAACACCCAGCATTCCTCTGATCCACAAAGTG  
 AA: L L C R L P H P A F L L I P R K V

ADN: TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTAAAGACTCACTCTCCATAATGCT  
 AA: C N G I G I G E F K D S L S I N A

ADN: ACCAATATTAACACTTCAAAAACTGGCGCTTCACTGCGGATCTCCAC  
 AA: T N I K H F K N C T S T S G D L R

ADN: ATGCTGGGGTGGCATTTAGGGCTGACTCTCTGACACATACTCTCTG  
 AA: I L F V A F R G D S F T R T P F L

(continuación)

ADN: GATCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTAANGAAATCACAGGGTTT  
 AA: D P Q E L D I L K T V K E I T T G F

ADN: TTGCTGATTCAAGGCTTGGCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCCTTGAG  
 AA: L L I Q A W P E N R T D L S A F S

ADN: AACCTAGRAAATCATACGCCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTCTCTT  
 AA: M L E I T R G R T K Q N G Q F S L

ADN: GCAGTCGTCAAGCCTGAACATAACATCCTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAG  
 AA: A V V S L N I T S L G L R S L K S

ADN: ATAACTGATCCAGATGTGATAATTCAAGCAAACAAAAATTCTGCTATGCA  
 AA: I S D G D V I I S G N K N L C Y A

ADN: AATACAATAAAACTGGAAAAACTGTTGGGACCTCGGSGTAGAAAAACCAA  
 AA: W T I N W K K L F G T S S G Q K T K

ADN: ATTATAAGCAACAGAGCTGAAACAGCTCCAAGGCCACAGGCCAGGTCTSC  
 AA: I I S N R G S N S C K A T G Q V C

ADN: CATGCCCTGTGCTCCCCCAGGGCTCCCTGCCCCCCCCAGCCCCACGGACTCC  
 AA: H A L C S P E G C W G P E P R D C

ADN: CTCTCTGCCCGGAATGTCAGCCCAGCCATGCGTGGACAACTGCCAAC  
 AA: V S C R N V S R G R E C V D K C N

ADN: CTTCTGGAGGGTGAGGCCAAGGGAGTTTGCGAGAACCTCTGAGTCATAACAG  
 AA: L L E G E P R S F V E N S E C I Q

ADN: TGCCACCCAGACTGCTGCCCTGCCCTGCCATGACATCACCTGCCACAGGACCG  
 AA: C S P E C L P Q A M N I T C T G R

ADN: GGACCAGACAACGTATCCAGTGTGCCACTACATTCAGCCGCCACTG  
 AA: G P D N C I Q C A H Y I D G P H C

ADN: GTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGAGAAAACAACACCCCTGGTCTGG  
 AA: V K T C P A G V M G S E W N T L V W

ADN: AAGTACCCAGACGCCGGCCATGTGTGCCCTGTGCCATCCAACTGCCACC  
 AA: K Y A D A S H V C H L C H F N C T

ADN: TACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCCTGCCAACGAACTGGCTAAG  
 AA: Y S C T G F G L E S C P T N G P K

ADN: ATCCCGTDCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGGCCCTCCCTCTTGTGCTGGTG  
 AA: I P S I A T G N V G A L L L L V

ADN: GTGGCCCTGGGATCGGCTCTCATGTC (SEQ ID NO:10)  
 AA: V A L G I G L F H \* (SEQ ID NO:11)

Tabla 3

(continuación)

CD28tm: nt2921-3004  
 41BB: nt3005-3130  
 Zeta: nt3131-3466  
 5 T2A: nt3467-3538  
 EGFRt: nt3539-4612

Cebadores para secuenciación:

Nombre de oligómero	Secuencia	Región
oJ02649	ATCAAAAGAACATAGACCGAGATAGGGT	pre-U5 (SEQ ID NO: 22)
oJ02648	CCGTACCTTAAG,ACCAATGACTTAC	delU3 (SEQ ID NO: 23)
oJ02650	TTGAGAGTTTCGCCCCG	mid-Ampr (SEQ ID NO: 24)
oJ02651	AATAGACAGATCGCTGAGATAGGT	post-Ampr (SEQ ID NO: 25)
oJ02652	CAGGTATCCGGTAAGCGG	CoE1 ori (SEQ ID NO: 26)
oJ02653	CGACCAGCAACCATAGTCC	SV40 (SEQ ID NO: 27)
oJ02654	TAGCGGTTGACTCACGG	CMV (SEQ ID NO: 28)
oJ02655	GCAGGGAGCTAGAACGATT	psi (SEQ ID NO: 29)
oJ02656	ATTGTCTGGTATAGTGCAGCAG	RRE (SEQ ID NO: 30)
oJ02657	TCGCAACGGGTTTGCC	EF1p (SEQ ID NO: 31)
oJ02658	AGGAAGATATGCCACCTACT	CD19Rop (SEQ ID NO: 32)
oJ02601	CGGGTGAAGTTCAAGCAGAAG	Zeta (SEQ ID NO: 33)
oJ02735	ACTGTGTTGCTGACGCAAC	WPRE (SEQ ID NO: 34)
oJ02715	ATGCTTCTCCTGGTGACAAG	EGFRt (SEQ ID NO: 35)

10

Tabla 4: Uniprot P0861 IgG4-Fc (SEQ ID NO: 13)

10 20 30 40 50 60  
 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

70 80 90 100 110 120  
 GLYSLSVVVT VPSSSLGKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV

130 140 150 160 170 180  
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK FREEQFNSTY

190 200 210 220 230 240  
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMIK

250 260 270 280 290 300  
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDs DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG

310 320  
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

- 1-98 CH1  
 99-110 Bisagra  
 111-220 CH2  
 221-327 CH3

Posición 108 S→P

15

# ES 3 015 267 T3

Tabla 5: Uniprot P10747 CD28 (SEQ ID NO: 14)

10	20	30	40	50	60
MLRLLLALNL FPSIQVTGNK IILVKQSPMLV AYDNAVNLS C KYSYNLFSRE FRASLHKGLD					
70	80	90	100	110	120
SAVEVCVVYG NYSQQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP					
130	140	150	160	170	180
PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR					
190	200	210	220		
SKRSR <b>LL</b> HSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS					

- 1-18 péptido señal
- 19-152 dominio extracelular
- 153-179 dominio transmembrana
- 180-220 dominio intracelular
- Posición 186-187 LL→GG

5

Tabla 6: Uniprot Q07011 4-1BB (SEQ ID NO: 15)

10	20	30	40	50	60
MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR					
70	80	90	100	110	120
TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC					
130	140	150	160	170	180
CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE					
190	200	210	220	230	240
PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG					
250					
CSCRFPEEEE GGCEL					

- 1-23 péptido señal
- 24-186 dominio extracelular
- 187-213 dominio transmembrana
- 214-255 dominio intracelular

10

# ES 3 015 267 T3

Tabla 7: Uniprot P20963 isoforma 3 de CD3 $\zeta$  humano (SEQ ID NO: 16)

10            20            30            40            50            60  
MKWKALFTAA ILQAQILPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTA LF LRVKF SRSAD  
70            80            90            100          110          120  
APAYQQGQNQ LYNELNLGRR E E YDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGL YNELOQDKMA  
130          140          150          160  
EAYSEIGMKG ERRRGKGDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR

- 1-21        péptido señal  
22-30        extracelular  
31-51        transmembrana  
52-164       dominio intracelular  
61-89        ITAM1  
100-128      ITAM2  
131-159      ITAM3

5

Tabla 8: secuencias de región bisagra a modo de ejemplo

- IgG1 humana EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 17)  
IgG2 humana ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 18)  
IgG3 humana ELKTPLGDTHTCP RCP (EPKSCDTPPPCPRCP)3 (SEQ ID NO: 19)  
IgG4 humana ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 20)  
IgG4 humana modificada ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 21)  
IgG4 humana modificada YGPPCPPCP (SEQ ID NO: 51)  
IgG4 humana modificada KYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 52)  
IgG4 humana modificada EVVKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 53)

Tabla 9

CAR de espaciador largo de R12: PJ\_R12-CH2-CH3-41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 37)

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGAGCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT  
 TAAGCCTCAATAAAAGCTTGCCTGAGTGCTCAAGTAGTAGTGTGCCCCGTGTTG  
 TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATC  
 TCTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGACTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAG  
 CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTGCTGAAGCGCGCACGCAAGAGGCAGGG  
 GCGCGACTGGTGAGTACGCCAAAATTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA  
 GAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAAGCGGGGAGAATTAGATCGATGGGA  
 AAAAATTGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATA  
 TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCAAGTAACTCTGGCCTGTTAGAAA  
 CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGACAGCTACAACCATCCCTCAGACA  
 GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAACAGTAGCAACCCCTATTGTGTG  
 CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGA  
 AGAGCAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA  
 CACAGCAATCAGGTCAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG  
 AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACCTTAAATGCATGGTAAAAGTAGT  
 AGAAGAGAAGGCTTCAGCCCAGAAGTGTACCCATGTTTCAGCATTATCAGA  
 AGGAGCCACCCCCACAAGATTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGACATC  
 AAGCAGCCATGCAAATGTTAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGAGGCAA  
 GAGAAGAGTGGTCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTGTCC  
 TTGGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCAACTATGGCGCAGCGTCAATGACGCTG  
 ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGCTGCTGTAGTCAGCAGCAGCAGAACATTG  
 CTGAGGGCTATTGAGGCGAACAGCATCTGTCGCAACTCACAGTCTGGGCATC  
 AAGCAGCTCAGGCAAGAACATCCTGGCTGTGAAAGATACTAAAGGATCAACA  
 GCTCCTGGGATTGGGGTTGCTCTGGAAAACACTCATTGCAACCAGTGTGCTC  
 TGGATCTACAAATGGCAGTATTCCACAATTAAAAGAAAAGGGGGGATTG  
 GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA  
 ACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTCGGGTTATTAC  
 AGGGACAGCAGAGATCCAGTTGGGATCAATTGCATGAAGAACATGCTTAGG  
 GTTAGGCCTTGCCTGCTCGCAGGGATCTCGATCGCTCCGGTCCCCGTCA  
 GTGGGCAGAGCGCACATGCCAACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGTCTG  
 GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGGGTAAACTGGAAAGTGAT  
 GTCGTGTACTGGCTCCGCCCTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT  
 GCAGTAGTCGCGTGAACGTTCTTTCGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACAG  
 CTGAAGCTCGAGGGGCTCGCATCTCCTTCAGCGCCCCGCCCTACCTGA  
 GGCGCCATCCACGCCGTTGAGTCGCGTTCTGCCCTCCGCTGTGGTGC  
 TCCTGAACTGCGTCCCGTCTAGGTAAGTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGC  
 CTTTGTCCGGCGCTCCCTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCCACGCTT  
 GCCTGACCTGCTGCTCAACTTACGTCCTTGTGTTCTGTTCTGCGCCGT  
 TACAGATCCAAGCTGTGACCGCGCCTACG  
 GCTAGC~~GAAITCCTCGAGGCC~~  
 ACC~~ATC~~CTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGCGAGCTGCCCCACCCGCC  
 TTTCTGCTGATCCCCCAGGAACAGCTCGTCGAAAGCGGGGGCAGACTGGTGACA  
 CCTGGCGGCAGCCTGACCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTCGACTTCAGCGCC

(continuación)

TA  
TACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGATGCC  
ACCATCTACCCAGCAGCGCAAGACCTACTACGCCACCTGGTGAAACGGACG  
GTTCACCATCTCCAGCACAACGCCAGAACACCGTGGACCTGCAGATGAACA  
GCCTGACAGCCGCCGACCGGGCCACCTACTTTGCGCCAGAGACAGCTACGCC  
ACGACGGGCCCTGTTCAACATCTGGGGCCCTGGCACCCCTGGTACAATCTTA  
GCGGCGGAGGCGGATCTGGTGGCGAGGAAGTGGCGCGGAGGATCTGAGCTG  
GTGCTGACCCAGAGCCCCTGTGCTGCTGCCCTGGAAAGCCCTGCCAAGATC  
ACCTGTACCCCTGAGCAGCGCCACAAGACCGACACCATCGACTGGTATCAGCA  
GCTGCAGGGCGAGGCCCCCAGATACTGTGAGGTGAGCGACGGCAGCT  
ACACCAAGAGGCCAGCGTGCAGGCCATGACGAGGCCATTACTAC  
GACCGCTACCTGATCATCCCCAGCGTGCAGGCCATGACGAGGCCATTACTAC  
TGTGGCGCCGACTACATCGCGGCTACGTGTTGGCGAGGCACCCAGCTGACC  
GTGACCGGCAGTCTAAG

Espaciador de IgG4

5

**TN** COGACCGCCCTGCCCTGCCCT**CH2**

GCCCCCGAOTTCTCTGGOCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGGCCAAG  
GACACCCCTGATGATGAGCCGGACCCCCCGAGGTGACCTGCCGTGGTGGTGGACGTG  
AGCCAGGAAGATCCCAGGOTCCAGTTCAATTGGTACGTGGACCGCGTGGAAAGT  
GCACAAACGCCAAGACCAAGGCCAGAGAGGAACAGTCAACAGCACCTACCGGG  
TGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGACCCAGGACTGGTGAACGGCAAAGAAATACA  
AGTACAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGC  
AAAGCCAAG

**CH3**

GGCCAGCCTCGCGAQCCTCAGGTGTACACCCCTGCCCTCCAGGAAGAGATG  
ACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGCCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAACCGAC  
ATCGCCCGTGGAGTGGAGAACCAACCGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCCAC  
CCCTCCCGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGT  
GGACAAGAGCCCGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTAACTOCAGCGTGTGACCG  
AGGCCCTGCACAAACCAACTACACCCAGGAAGAGGCCCTGAGCCTGTCCCTGGCAAG

**4-1BB**

ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGCGGGGGTGTGGCCTGCTACAGCCTGCTG  
GTGACACTGCGCTTCATCATCTTGGTGAACCGGGOCAGAAAGAAACTCCTG  
TATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT  
GGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACGT

**CD3 zeta**

CGGGTGAAGTTCAAGCAGAACGCGCCAGGCCCTGCCCTACCAAGCAGGGCCAGAA  
TCAGCTGTACAACGAGCTGAAACCTGGCGAGAACGGGAAGAGTACGACGTCTGG  
ATAAGCGGAGAGGCCGGACCCCTGAGATGGCGGCAAGCCTCGGCCAGAAC  
CCCCAGGAAGGCCGTATAACGAACGTGAGAACAGACAAGATGGCCGAGGCTA  
CAGCGAGATCGGATGAAGGGCGAGCGGAGGCCAGGGCAAGGGCCACGACGGC  
CTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATAACCTACGACGCCCTGCACATG  
CAGGCCCTGCCCTCAAGG

**T2A**

CTCGAGGGCGGCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA  
GGAGAAATCCCGGCCCTAGG

**tEGFR**

(continuación)

ATGCTTCTCCTGAGAAGCCTCTGCTCTGAGTTACCAACACCCAGCATTC  
 TCTGATCCCACGCAAAGTGTGAACCGAATAGGTATTGGTGAATTAAAGACT  
 CACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTCAAAAAACTGCACCTCCATCA  
 CTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTOGCATTAGGGGTGACTCCTCACACATA  
 CTCCCTCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA  
 CAGGGTTTTGCTGATTCAAGGCTTGGCTGAAAACAGGGACGGACCTCCATGCC  
 TTGAGAACCTAGAAATCATACGCOGCAGGACCAAGCAACATGGTCACTTTCTC  
 TTGCACTCGTCAGCTGAACATAACATCCTTGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA  
 TAAGTGATGGAGATGTGATAATTCAAGGAAACAAAAATTGCTATGCAAATA  
 CAATAAAACTGGAAAAAAACTGTTGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA  
 AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCC  
 GTGCTCCCCGAGGCGCTCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 GAATGTCAAGCCOAGGCAGGGAATGCGTGGACAAOTGCAACCTCTGGAGGCG  
 AGCCAAGGGAGTTGCGAGAACTCTGACTGACATACAGTOCCACCCAGAGTGC  
 CTGCCCTAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACGTATC  
 CAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCGGCAGGA  
 GTCATGGAGAAAACAACACCCCTGGCTGAGTACGGAGACGCCGGCCATGT  
 GTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACGGGGGGGGGGGG  
 AGGCTGTCCAACGAATGGGCTTAAGATCCCCTGCACTGGGACTGGGATGGTGG  
 GGCCCTCTCTTGTGCTGGTGGTGGCTGGGGATGGCCCTCTCATGGA  
 GCGGCCGCTCTAGACCCGGCTGCAGGAATTGATATCAAGCTTATCGATAATC  
 AACCTCTGGATTACAAAATTGTGAAAGATTGACTGGTATTCCTAACTATGTTGC  
 TCCTTTACGCTATGTGATACGCTGCTTAAATGCCCTGTATCATGCTATTGCT  
 CCCGTATGGCTTCACTTCTCCCTCTGTATAAAATCCGGTTOCTOTCTCTTAT  
 GAGGAGTTGTGGCCCGGTTGCAAGGCAACGCTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTGCT  
 GACGCAACCCCCACTGGTGGGGCATGGCCACCCACCTGCAAGCTCCCTGGGG  
 ACTTTGCTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGGGAACTCATGCCGCCCTGCCCTG  
 CCCGCTGGACAGGGCTGGCTGTTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 CGGGGAAATCATGGTCTTCTGGCTGCTGCTCCTGCTGTTGCCACCTGGATTCT  
 GCGCGGGACGTCCTCTGCTACGTCCTTCTGCCCTCAATCCAGGGACCTTCT  
 TCCCCTGGGCTGCTGCCGGCTCTGGGGCTCTTCCGGCTCTGCCCTTCCCCTC  
 AGACGAGTCGGATCTCCCTTGGGCCCTCCCCGATCGATAACCGTCACAG  
 CCGTACCTTAAGACCAATGACTTACAAGGCGACTGAGATCTAGCCACTTTT  
 AAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTGCCAAAGAAGACAAGATC  
 TGCTTTGCTGACTGGGCTCTGCTGGTAAAGCCAGATCTGAGGCTGGGAGCT  
 CTCTGGCTAACTAGGGAAACCAACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTTGCCTGAGT  
 CCTCAAGTAGTGTGCTGCCGCTGTTGTGTOACTCTGTTAACTAGAGATCCCTC  
 AGACCCCTTCTAGTCAGTGTGAAAATCTCAAGCAGAAATCGATAATCAAGCTTAT  
 CGATAACCGTCACCTCGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 CGTATTACAATTCACTGGCCGCTCTTACAACGTCGTGACTGGGGGGGGGGGGGG  
 CGGTTACCAACTTAATGCCCTTGCAAGCACATCCCCCTTCCGCCAGCTGGCGTAA  
 TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATGCCCTTCCCAACAGTGGCGCAGGCTGAATGG  
 CGAATGGAAATTGTAAGCGTTAAATTGGTAAATCGCGTAAATTGGTAAATTGGT  
 AAATCAAGCTCATTTTAAACCAATAGGCCGAATCGGCAAAATCCCTATAAAAT  
 CAAAAGAATAAGACCGAGATAGGGTTGAGTGGTGTCCAGTTGGAAACAAGAGT  
 CCACTATTAAAGAACGTCAGTGGACTCCAACCGTCAAAGGGGAAAAACCGTCTATCA

(continuación)

GGGCGATGGCCCACCTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTGGGTCGAG  
 GTGCCGTAAGCACTAAATCGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTG  
 ACGGGAAAGCCGCGAACGTGGCAGAAAGGAAGGGAAAGAAAGCGAAAGGA  
 GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACCGCTCGCGTAACCAC  
 ACCCGCCGCGCTTAATGCGCCCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACCTTCCGGG  
 AAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTATTTCCTAAATACATTCAAATATGTAT  
 CGCTCATGAGACAATAACCTGATAAAATGCTCAATAATATTGAAAAAGGAAG  
 AGTATGAGTATTCAACATTCCGTGCGCCCTATTCCCTTTTNGCGGCATTG  
 CCTTCCCTTTTGTCAACCCAGAAACGCTOGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA  
 TCAGTTGGOTOCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAOCGOTAAGAT  
 CCTTGAGAGTTTCCCGCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCACTTAAAGTT  
 CTGCTATGTCGCGCGTATTATCCGTTATTGACCCCGGGCAAGAGCAACTCGGT  
 CGCCGCATACACTATTCTCAGAACTGGTGGACTACTCACCAGTCACAGAA  
 AAGCATCTACGGATGGCATACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTOCCATAACC  
 ATGAGTGATAACACTOCGGCCAACCTACTTCTGACAACGATCGAGGGACCGAA  
 CGAGCTAACCGCTTTTGCACAACATGGGGATCATGTAACTCGCCGTGATCG  
 TTGGGACCOGAGCTOAATGAAGCCATACCAAACGACGGAGCOTGACACCCACGA  
 TOCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACACTATTAACTGGCGAACTACTTA  
 CTCTAGCTCCGCGAACAAATTAAAGACTGGATGGAGGGGGATAAAGTTGCG  
 GACCACTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGG  
 ACGCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGATGA  
 ACGAAATAGACAGATCGCTGAGTAGGTGGCTCACTGATTAAGCATTGTAAC  
 GTCAGACCAAGTTACTCATATAACTTTAGATTGATTAAAACCTCATTTAA  
 TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACAAAATCCCT  
 AACGTGAGTTTCCGTTCCACTGAGCGCTAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT  
 CTCTGAGATCCTTTCTGCGCTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAAAACC  
 ACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCCG  
 AAGGTAACTGGCTCAGCAAGCGCAGATAACAAATACTGTTCTAGTGTAG  
 CGTAGTTAGGCCACCACTICAAGAACTCTGTAOCACCGCTACATACCTCGT  
 CTOCTAATCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCG  
 GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCAGCGTGGCTGGCTGAACG  
 GGGCGTTCTGACACAGCCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAACGTOAG  
 ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGG  
 CGGACAGGTATCCGCTAAGCGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA  
 GCTTCAAGGGAAACGCGTGGTATCTTATAGTCCTGCGGTTTCCGACACCTC  
 TGACTTGAGCGTGGATTGTTGATGCTGCTGAGGGGGGGAGCTATGGAAA  
 AACCGCAGCAACCGGCTTACGGTCTGGCTTGTGCTGGCTTGTGCTGGCTT  
 ACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTTGATAACCGTATTACCGCTT  
 GAGTGAAGCTGATACCGCTCGCCCGACGCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT  
 GACCGAGGAAGGGAAAGAGCGCCCAATAACGCAAACCGCGCTCTCCCCCGCTT  
 GCCGATTCAATTAGCGCTGGCACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGGGCGCA  
 GTGAGCGCAACGCAATTAGTGAGTTAGCTACTCATTAGGCAACCCAGGCTT  
 TACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTTGAAATTGAGCGGATAACAATT  
 TCACACAGAAACAGCTATGACCATGATTACCGCAAGCTGAAATTAAACCTCA  
 CTAAGGGAAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCTCGAGGTGAGA  
 TCCGGTGCACCAACCATAGTCCCGCCCTAACCTCCGCCCCATCCCGCCCTA

(continuación)

ACTCCGCCAGTICCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTCCTTATTAA  
 TGCAGAGGCCAGGCCCTCGGCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGGAG  
 GCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTGCAAAAAGCTTCACCGTATCGATTGGCTCA  
 TGTCCAACATTACCGCCATGTGACATTGATTGACTAGTTATTAAAGTAAT  
 CAATTACGGGTCAATTAGTCATAGCCATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC  
 TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCCGCCCATTGACGT  
 CAATAATGACGTATGTTCCCATACTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC  
 AATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATC  
 ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC  
 ATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGCAGTACATCTACGT  
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAAGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCG  
 TGGATAAGCGGTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA  
 TGGAGTTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA  
 CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGC GTACGGAATT CGGAGTGGCG  
 AGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTGCCGTACTGGGTCTCTG

Tabla 10

5

Líder\_R12 - Bisagra-CH2-CH3-CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 38)

Líder

MLLVTSLLLCELPHPAFLIP

**R12 scFv**

QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMSWVRQAPGKGLEWIATIYPSSG  
 KTYYATWVNGRFTISSDNAQNTVDLQMNSLTAAADRATYFCARDSYADDGALFNI  
 WGPGLVTISSLGGGSGGGSGGGSELVLTQSPSVSAA LGSPA KITCTLSSAHKTD  
 TIDWYQQLQGEAPRYLMQVQSDGSYT KRPGVDRFGSSGADRYLIIPS VQADDE  
 ADYYCGADYIGGYVFGGGTQLTVTG

**Hinge Spacer**

ESKYGPPCPPCP

**CH2**

APEFLGGPSVFLPPPKDLMISRTPEVT C VVV DVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHN  
 AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK C KVS NKGLPSSIEKTISKAK

**CH3**

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT C LVKG FYP PSDIAVEWESNGOPENNYKTTPP  
 VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLLGK

10

(continuación)

**CD28**

MFWVLLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

**4-1BB**

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

**CD3 zeta**

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNP  
QEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ  
ALPPR

**T2A**

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR

**EGFR**

MLLVTSLLCLELPHAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHI  
LPVAFRGDSFTHPPLDPQELDILKTVEITGFLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT  
KQHQQPSLA VVSLNITSLGLRS LKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK.  
TKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCWGP EPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE  
GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNTCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM  
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIA TGMVGALL  
LLLVALGIGLFM

Tabla 11

CAR de espaciador intermedio de R12: PJ\_R12-CH3-41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 39)

GTTAGACCAAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAAACCCACTGCT  
 TAAGCCTCAATAAAACCTTGCCCTGAGTGTCAAGTAGTGTGTGCCCGCTGTGTTG  
 TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGAAAATC  
 TCTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAG  
 CTCTCTCGACCGCAAGGACTCGGCTTGAAAGGGCGCACCGOCAAGAGCGAGGG  
 CGCGCGACTGGTGAAGTACGCCAAAATTGACTAGCCGGAGGCTAGAAGGAGA  
 GAGATGGGTGAGAGACGCTCAGTATTAAAGGGGGGAGAATTAGATCGATGOGA  
 AAAAATTCCGTTAACGCCAGGGGAAAGAAAAAAATATAAATTAAAACATATAAG  
 TATGGGCAAGCAAGGAGCTAGAACGATTGGCAGTTAACCTGGCCTGTTAGAAA  
 CATCAGAAGGCTGTAAGACAAATACTGGACAGCTACAACCATCCCTCAGACA  
 GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCCTATTGTGTTG  
 CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAGATAAGAGGA  
 AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA  
 CACAGCAATCAGGTAGGCCAAAATTACCCATAGTCAGAACATCCAGGGCA  
 AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTAAATGCATGGTAAAAGTAGT  
 AGAAGAGAAGGCTTCAGCCCAGAAGTGAATACCCATGTTTCAGCATTATCAGA  
 AGGAGCCACCCACAAGATTAAACACCATGCTAACACAGTGGGGGACATC  
 AACGAGCCATGCAAATGTTAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTOCAGGCAA  
 GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGAAATAGGAAGCTTGTCC  
 TTGGGTTCCTGOGAGCAGCAGGAAGCACTATGGCGCAGGGTCAATGACGCTG  
 ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTCAGCAGCAGAACAAATTG  
 CTGAGGGCTATTGAGGGCGAACAGCATCTGTGCAACTCACAGTCTGGGCATC  
 AACGAGCTCCAAGCAAGAACCTGGCTGTGAAAGATAACCTAAAGGATCAACA  
 GCTCCTGGGATTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTGCAACCAACTGCTGTGCT  
 TGGATCTACAAATGGCAGTATTGATCCACAATTAAAAGAAAAGGGGGATTG  
 GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATAACAA  
 ACTAAAGAATTACAACAAATTACAACAAATTCAAAATTTCGGGTTTATTAC  
 AGGGACAGCAGAGATCCAGTTGGGATCAATTGCATGAAGAACATGCTTAGG  
 GTIAGGCCTTTCGCCTGCTTCGCAGGGATCTGCATCGCTCCGGTCCCCGTCA  
 GTGGGCAGAGCGCACATGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTG  
 GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGAAAGTOAT  
 GTCGTGTACTGGCTCCGCTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT  
 GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTCGCAACGGGTTGGCGCCAGAACACAG  
 CTGAAGCTTCAGGGGCTCGCATCTCCTTCACGCCCGCGCCCTACCTGA  
 GGCGCCATCCACGCCGTTGAGTCGGTCTGGCGCCCTCCGGCTGTGGTGC  
 TCCTGAACTGGTCCGGCTCCCTGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCACGCTT  
 GCCTGACCCCTGCTCAACTCTACGTTGTTGGTCTGTTCTGTTCTQCGCCGT  
 TACAGATCCAAGCTGTGACCGGGCGCTACG  
**GCTAGCGAATTCCCTCGAGGCC**

**R12 ScFv**

ACCATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGGAGCTGCCACCCGCC  
 TTTCTGCTGATCCCCAGGAACAGCTCGAAAGCGCGCGAGACTGGTGACA

(continuación)

CCTGGCGGCAGCCTGACCCCTGAGCTGCAAGGCCAGCCGGCTTCACTTCAGCGCC  
 TACTACATGAGCTCGTGGTCCCCAGGCCCTGACAAGGGACTGAAATGGATC  
 ACCATCTACCCCAGCAGGGCAAGACCTACACCCACCTGGGTGAACGGACG  
 GTTCACCATTCTCAACGACAACGCCAGAACACCCGGTGGACCTGCAAGATGAACA  
 GCCTGACAGCCGGGACCGGGCCACCTACTTTGCGCCAGAGACAGCTACGCCG  
 ACGACGGCCGGCTGTTCAACATCTGGGGCCCTGGCACCCCTGGTACAATCTCTA  
 GCGGCGGGAGGCAGGATCTGGTGGCGAGGAAGTGGCGGGAGGATCTGAGCTO  
 GTGCTGACCCAGAGCCCTCTGTGTCTGCTGCCCTGGGAAGGCCCTGCCAAGATC  
 ACCTGTACCCAGACCCCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
 GCTGAGGGCGAGGGGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
 ACACCAAGAGGCCAGGGCTGCCCCACCCGGTCAAGGGATCTAGCTCTGGCGCC  
 GACCGCTACCTGATCATCCCCAGCGTGCAGGCCGATGACGAGGCCGATTACTAC  
 TGTGGCGCCGACTACATCGCCGGCTACGTGTTGGCGAGGCACCCAGCTGACC  
 GTGACCGGGGAGTCTAAG

Espaciador de bisagra

5

**TACGGACCGCCCTGCCCTGCCCTGCCCT****CH3**

GGCCAGCCTCGAGGCCAGGTGTACACCCCTGCCCTCCCTCCAGGAAGAGATG  
 ACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGCCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAC  
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGCCAGGCTGAGAACAACTACAAGACCAC  
 CCCTCCCGTGTGGACAGCGACCGAGCTTCTCTGTACAGCCGGCTGACCGT  
 GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAOGCAACGTCTTAGCTOCAGCGTGTGCACO  
 AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCCTGAGCCTGTCCTGGCAAG

**4-1BB**

ATGTTCTGGTOCTGGTGGTGGTGGTGGGCGGGGGTGTGGCCTGCTACAGCCTGCTO  
 GTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTOGOTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG  
 TATAATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT  
 GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGAGTGTGAAGTG

**CD3zeta**

CGGGTGAAGTTCAAGAGAACGCCAGGCCAGGCCCTGCCCTACCAAGCAAGGCCAGAA  
 TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAGAAAGGGAGAGTACGACGCTCTGG  
 ATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCTGGCGGAAGAAC  
 CCCCAGGAAGGCCCTGATATAACGAACTGCAAGAAAGACAAGATGCCCOAGGCC  
 CAGCGAGATCGGCATGAGGGCGAQCQGAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGCC  
 CTGATCAGGGCTGTCCACGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATG  
 CAGGCCCTGCCCTGGCAAGG

**T2A**

**CTCGAGGGCGCCCGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGCTGGA**  
**GGAGAATCCCGGGCCTAGG**

**tEGFR**

ATGCTTCTCCTGGTACAAGCCTCTGCTGTGAGTTACCAACCCAGCATTCC  
 TCCTGATCCCAGCAAAGTGTGTAACGGAATAGTATTGGTGAATTAAAGACT  
 CACTCTCCATAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAAGTGCACCTCCATCA  
 GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGTGGCATTAGGGGTGACTCCTCACACATA  
 CTCCCTCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA  
 CAGGGTTTTGCTGATTAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCT  
 TTGAGAACCTAGAAATCATACGCCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTCTC

(continuación)

TTGCAGTCGTCAAGCTGAACATAACATCCTGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA  
 TAAGTGTGAGAGATGTGATAATTTCAGGAACAAAAATTGTGCTATGCAAATA  
 CAATAAACTGGAAAAACTGTTGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA  
 AGCAACAGAGGTGAAAACAAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCCT  
 GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGCCCGAGGCCAGGGACTGCCCTCTGCCG  
 GAATGTCAOCCGAGGCAGGAAATGCGTGGACAAGTGCACACCTCTGGAGGGTG  
 AGCCAAGGGAGTTGTGGAGAACCTGAGTGCATACAGTGCACCCAGAGTGC  
 CTGCCCTAGGCCATGAAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACGTATC  
 CAGTOTGCCACTACATTOACGGGCCACTGCGTCAAGACCTGCCGCCAGGA  
 GTCATGGAGAAAACAACACCCCTGGTCTGGAAAGTACGCCAGACOCGCCATGT  
 GTGCCACCTGTGCCATCCAACACTGCACCTACGGATGCACTGGCATGGCTTGA  
 AGGCTGTCCAACGAATGGGCCCTAAAGATCCCCTCCATGCCACTGGGATGGTGG  
 GGCCCTCTCTTGTGCTGGTGGTGGCCCTGGGATGCCCTTTCATGGA  
GCGGCCGCTCTAGACCCGGCTGCAGGAATTGATATCAAGCTTATGATAATC  
 AACCTCTGGATTACAAAATTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGC  
 TCCTTTACGCTATGTGATAACGCTGCTTAAATGCCCTTGTATCATGCTATTGCTT  
 CCCGTATGGCTTICATTTCCTCTTGTATAAAATCTGGTGTGCTGCTCTTAT  
 GAGGAGTTGTOGCCCGTTGCAAGCAACGTGGCTGGTGTGCACTGTGTTGCT  
 GACGCAACCCCCACTGGTGGGOCATTGCCACCCACTGCACTCTCTTCCGGG  
 ACTTTGCTTCCCTCCTCCTTGTGCACTGGGACCGGCCGAACTCATGCCGCCCTOCCCTG  
 CCCGCTGCTGGACAGGGCTCGGCTTGGGCACTGACAATTCCCTGGTGTGTTGCT  
 CGGGGAAATCATGTCCTTCCCTGCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
 GCGGGGAGCTCTCTGCTACGTCCTTCCGCTCAATCCAGGGACCTTCT  
 TCCCCTGGCCCTGCTGCCGGCTCTGCCGCCCTTCCGGCTTCCGCCCTTCCGCCCTC  
 AGACOAGTCGATCTCCCTTGGGCCCTTCCGGCATGATACCGTCACTAG  
 CCGTACCTTAAAGACCAATGACTTACAAGGCAAGCTGAGATCTTAGCCACTTTT  
 AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAAGGCTAATTCACTCCAAAGAAGACAAGATC  
 TOCTTTTQCCGTACTGGGCTCTCTGGTTAGGACAGATCTGAGGCTGGAGCT  
 CTCTGCTAACTAGGGAAACCACTGCTTAAAGCTCAATAAGCTTGCCTTGTGAGT  
 GCTTCAAGTAGTGTGTGCCCTGCTGTTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC  
 AGACCTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTACGAGAATTGATATCAAGCTTAT  
 CGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGTACCCAAATTGCCCTATAGTGAAT  
 CGTATTACAATTCACTGGCCCTGCTTACAACGTGCTGACTGGAAAACCTG  
 GCGTTACCCAACTTAACTGCCCTTCAOACACATCCCCCTTCCCAACACTGGCAGGCTAA  
 TAGCGAAGAGGCCCCGACCGATGCCCTTCCCAACACTGGCAGGCTGAATGG  
 CGAATGGAAATTGTAAGCCTTAATATTGTTAAATTCCGGTAAATTGTTGTT  
 AAATCAGCTCATTTTAAACCAATAGCGGAAATCGGAAAATCCCTTATAAAAT  
 CAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGACTGTTGCTCCAGTTGGAAACAAGAGT  
 CCACTTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGGAAAAACCGCTATCA  
 GGGCGATGGCCCACACGTCACCATCACCCCTAATCAAAGTTTGGGGTGGAG  
 GTGCCGTAAGCGACTAAATCGGAAACCTAAAGGGAGGCCCCGATTTAGAGCTTG  
 ACGGGGAAAGCCGCGAACGCTGGCAGAAAGGAAGGGAGAAAGCGAAAGGA  
 GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCTAACCCAC  
 ACCCCCGCCCTTAATGCCCOCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTGCCGG  
 AAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTATTCTAAATACATTCAAATATGTAT  
 CCCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAAATGCTCAATAATATTGAAAAGGAAG  
 AGTATGAGTATTCAACATTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTTGGCGCGATTG

(continuación)

ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC  
 ATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT  
 ATTAATCATCCTATTACCATGGTATGCCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCG  
 TGGATAGCGGTTTGACTCACCGGGATTCCAAGTCTCCACCCCATTGACOTCAA  
 TOOGAGTTGTTTGGCACC AAAATCAACCGGACTTTCCAAAATGTCGTAAACAA  
 CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGGTGTACCGAATTGGAGTGGCG  
 AGCCCTCAGATCCTOCATATAAGCAGCTGCTTTTGCTGTACTGGTCTCTCG

**Tabla 12**

5

Líder\_R12 - Bisagra-CH3-CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 40)

Líder

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

**R12 seFV**

QEQLVESGGRLVTPGSLTLSCKASGFDFSAYYMSWVRQAPGKGLEWIATIYPSSG  
 KTYYATWVNQRFTISSDNAQNTVDLQMNNSLTAAADRATYFCARDSYADDGALFNI  
 WGPCTLVTISSGGGSGGGSGGGSELVLTQSPSVSAALQSPAKITCTLSSAHKTD  
 TIDWYQQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFGSSSGADRYLIHPSVQADDE  
 ADYYCGADYIGGYVFEGGQTQLTVTG

10

Espaciador de bisagra

ESKYGPPCPPCP

**CH3**

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT<sup>13</sup>VKGFYPSDIAVEWESNOQPENNYKTTPP  
 VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS<sup>18</sup>CSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

**CD28tm**

MFWVLVVVGGLACYSLLTVAFIFWV

**4-1BB**

KRGRKRLLYIFKQPFMRPVQTTQREDGCSCRFPEEEEGCCL

**CD3 zeta**

RVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELNLGRREYDVLOKRRGRDPREMGGKPRRKNP  
 QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKQHDGLYQQLSTATKDTYDALHMQ  
 ALPPR

**T2A**

LEGGEGEGROSLLTCGDVEENPGPR

**tEGFR**

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGICIGEFKDLSINATNIKHFKNCTSISODLHI  
 LPVAFRQDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGPLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT  
 KQHQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK  
 TKHSNRQENSCKATQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRORECVDKCNLLE  
 GEPREFVENSECIOCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDOPHCVKTCPAGVM  
 GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTOPGLEGCPTNOKPISIATGMVGALL  
 LLLVVALGIGLFM

15

Tabla 13

CAR de espaciador corto de R12: PJ\_R12-bisagra-41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 41)

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGAGCTCTCGCTGCTAACTAGGGAAACCCACTGCT  
 TAAGCCTCAATAAAGCTTCCTTGAGTGTGCTCAAGTAGTGTGTGCCGTCTGTTG  
 TGTGACTCTGTTAAGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTAAGTCAGTGTGAAAGAAAATC  
 TCTAOGCAGTGGCGCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGGAG  
 CTCTCTCGACOCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCAGAGGG  
 CGCGCAGCTGGTGTAGTACGCCAAAAATTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGA  
 GAGATGGTGTGAGAGCGTCAGTATTAAAGCGGGAGAATTAGATCGATGGGA  
 AAAAATTCCGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAATAAAATTAAACATATAAG  
 TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCCGAGTTAATCCCTGGCTGTTAGAAA  
 CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTCAOACA  
 GGATCAGAAGAACCTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCCTTATTGTGTG  
 CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAGATAGAGGA  
 AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA  
 CACAGCAATCAGGTCAAGCCAAAATTACCCCTATAGTGTGAGAACATCCAGGGCA  
 AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCACTGGTAAAAGTAGT  
 AGAAGAGAAGGCTTCAGGCCAGAAGTGTGATAACCCATGTTTICACCTATTACAGA  
 AGAGGCCACOCCACAAGATTAAACACCAGTAAACACACAGTGGGGGGACATC  
 AAOGCAOCCATGCAAATGTTAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAOGCAAA  
 GAGAAGAGTGTGAGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAAATAGGAGCTTGTCC  
 TTGGGTTCTGGGAGCGAGCAGGAAGCAGTATGGCGCAAGCGTCAATGACGCTG  
 ACGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGTGCAAGCAOGCAAGAACAAATTG  
 CTGAGGGCTATTGAGGCCAACAGCATCTGTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC  
 AAGCAGCTCCAOGCAAGAACCTGGCTGTGGAAAAGATACCTAAAGGATCAACA  
 GCTCCIGGGATTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTGCAACACTGCTGTGCCT  
 TGGATCTACAAATGGCAGTATTCCACAATTAAAGAAAAGGGGGATTG  
 GGGGGTACAGTGTGAGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA  
 ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTCGGGTTTATTAC  
 AGGGACACGAGAGATCCAGTTGGGGATCAATTGCAAGAACATCTGCTTGTG  
 GTTGGCGTITTCGCTGCTGCTGGCGAGGGATCTGGATCGCTGGCGTGGGGGTG  
 GCAATTGAAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAAACTGGAAAGTGAT  
 GTCTGTACTGGCTCCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGGAGAACCGTATATAAGT  
 GCAGTAGTCGCCGTOAACGTTCTTTCGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACAG  
 CTGAAGCTCGAGGGGCTCGCATCTCTCTTACGGGCCCGCCCTACCTGA  
 GCGGCCATCCACGCCGGTGTGAGTCGGCTCTGCCGCCCTGGCGTGGCG  
 TCCCTGAACCTGGCTCCCGCTCAAGGTAAAGTTAAAGCTCAGGTGAGACCGG  
 CCTTGTCCGGCGCTCCCTGGAGCTACCTAGACTCAGCCGGCTCCACOCTT  
 GCGTGGACCCCTOCTGCTCAACTCTACGTTGTTGTTCTGTTCTGCGGCCG  
 TACAGATCCAAGCTGTGACCGGCCCTACG  
**GCTAGF**  
**R12 scFV**  
 ACCATGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCAACCCGCC  
 TTCTGCTGATCCCCCAGGAACAGCTCGTCGAAAGCGGCCAGACTGGTACA  
 CCTGGCGCAOCCCTAACCCCTGAGCTCAAGGCCAGCGGCTTGACTTCAOCC

(continuación)

TAATACATGAGCTGGTCCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGATC  
 ACCATCTACCCCAAGCAGCGCGAACAGACCTACTACGCCACCTGGTGAACGGACG  
 GTTCACCATCTCCAGCGACAACGCCAGAACACCGTGACCTGCAGATGAAACA  
 GCCTGACAGCCGCCGACCGGGCACCTACTTTGCGCCAGAGACAGCTACGCC  
 ACCGACGGGCCCTGTTCAACATCTGGGCCCCCTGGCACCCCTGGTACAATCTCTA  
 GCGCGGGAGGGCGATCTGGTGGCGAGGAAGTGGGGCGAGGGATCTGAGCTG  
 GTGCTGACCCAGAGCCCCCTCTGTCCTGCTGCCCTGGAAOCCCTGCCAAGATC  
 ACCTGTACCCCTGAGCAGCAGCAGCACAAAGACCOACACCCTGACTGCTATCAGCA  
 GCTGCAGGGCGAOGCCCCAGATACTGATGCAGGTGCAAGACGACCGCAGCT  
 ACACCAAAGAGGCCAGGGCGTCCCCAACCGGTTCAAGCGGATCTAGCTCTGGCGCC  
 GACCGCTACCTGATCATCCCCAGCGTGCAGGCCGATGACGAGGGGATTACTAC  
 TGTGGCGCCGACTACATCGGCCGCTACGTGTTGGCGAGGGACCCAGCTGACC  
 GTGACCGGGAGTCTAAAG

Bisagra/Espaciador

5

**TACCGACCGGCCCTGCCCCCTTGCCCT****4-IBB**

ATGTTCTGGTGTGGTGGTGGTGGGCGGGGCTGGCTGGCTGCTACAGCCTGCTG  
 GTGACAGTGGCCTTCATCATCTTGGGTGAAACCGGGCAGAAAGAAAGAAACTCCTG  
 TATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT  
 GGCTGTAGCTGCCGATTICCAGAAGAAGAAGGAAGGAGGATGTGAAGTQ

**CD3 zeta**

CGGGTAAAGTTCAOCAGAAACCCCGACGCCCTGGCTACCAAGCAAGGGCCAGAA  
 TCAAGCTGATACAACGAGCTGAAACCTGGGCAAGAAGGGAAAGAOTACGACGTCTG  
 ATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCCTGAGATGGCGGGCAAGCCTGGCGGAAGAAC  
 CCCAGGAAGGCCCTGATATAACGAACTGCAAAAAGACAAGATGCCGAGGCGTA  
 CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGACCGGGAGGGCAAGGCCACGACCGC  
 CTGTTATCAAGGGCTGTCACCGCCACCAAGGATACTACGACCCCCCTGCACATG  
 CAGGCCCTCCCCCAAGG

**T2A**

**CTCGAGGGCGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCCGTGACGTGGA  
 GGAGAATCCCCGGCCCTAGG**

**EGFR**

ATGTTCTCTGGTACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACACACCCAGCATTCC  
 TCCGTATCCCACGCCAAAGTGTGAAACCGAACAGGTATTGGTGAATTAAAGACT  
 CACTCTCCATAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCA  
 GTGGCGATCTCCACATCTGCCGGTGGCATTTAGGGTGAETCTTCACACATA  
 CTCCCTCTGATCCACAGGAACTOGATATTCTGAAAACCCTAAAGGAAATCA  
 CAGGGTTTGTGATTCAAGGCTTGAAACACAGGACGGACCTCCATGCC  
 TTGAGAACCTAGAAATCATACCGGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTCTC  
 TTGCACTGTCAGCCTGAAACATAACATCTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA  
 TAAGTGTGAGATGTGATAATTCTAGGAAACAAAAATTGTGCTATGCAAATA  
 CAATAAAACTGGAAAAAAACTGTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA  
 ACCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGGCAGGTCTGCCATGCC  
 GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCGGAGGCCAGGGACTGCGTCTCTGCC  
 GAATGTCAOCCCGAOGCAOGGAATGCGTGGACAAGTGCACACCTCTGGAGGGT  
 AGCCAAGGGAGTTGTGGAGAACACTGTGAGTGACATACAGTGCACCCAGAGTGC  
 CTGCCCTCAOGCCATGAACATCACCTGACACAGGACCGGGGACCAACTGTATC

(continuación)

CAGTGTCCCCACTACATTGACGGCCCCCACTGCCTAAGACCTGCCCGCAGGA  
 GTCATGGAGAAAACAACACCCCTGGCTGGAAGTACCCAGACGCCGCATGT  
 GTGCCACCTGTGCCATCAAACCTGCACCTACGGATGCCTGGGCCAGGTCTTGA  
 AGGCTGTCCAACGAATGGGCTAAGATCCCCTCCATGCCACTGGGATGGTGG  
 GCGGCCGCTAGACCCGGCTGCAAGAATTGATATCAAGCTTATCGATAATC  
 AACCTCTGGATTACAAAATTGTGAAAGATTGACTGTTATCTTAACCTATGTC  
 TCCTTTAACGCTATGTGGATACGCTGCTTAATGCCCTGTATCATGCTATTGCT  
 CCCGTATGGCTTICATTTCCTCCCTTGATAAAATCCTGGTTCTGTCTCTTAT  
 GAGGAGTGTGGCCCTTGTCAAGGAACGTGGCTGTTGTGACTGTGTTGCT  
 GACGCAACCCCCACTGGTGGGGATTGCCACCACTGTCAAGCTTTCGG  
 ACTTTGCTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGAACTCATGCCGCCCTGCCCTG  
 CCCGCTOCTGGACAGGGGCTGGCTTGGGCACTGACAATTCCGTGTTGTTGCT  
 CGGGAAATCATGTCCTTCTGGCTCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCT  
 GCAGGGACGTCTTCTGCTACGTCCTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCC  
 TCCCGCCTGCTGCCCTGCTGCCCTCTCCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCT  
 AGACGAGTCGGATCTCCCTTGGGCCCTCCCCGATCGATAACCGTGTGACTAG  
 CCGTACCTTAAGACCAATGACTTACAAGGCACTGAGATCTAGCCACTTTT  
 AAAAGAAAAGGGGGACTGAAAGGGCTAATTCACTCCAAAGAAGACAAGATC  
 TGCTTTTGCTGTACTGGCTCTCTGTTAGACCAAGATCTGAGGCTGGAGCT  
 CTCTGGCTAACTAGGAAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTTGGCTGAGT  
 GCTTCAAGTAGTGTGCTGCTGACTCTGTTAACTAGAGATCCCTC  
 AGACCCCTTAAAGTCACTGTTGGAAAATCTCTAGCAGAATTGATATCAAGCTT  
 CGATAACCGTCAGCTCGAGGGGGCCCCGGTACCCAAATTGCCCTATAGTGAGT  
 CGTATTACAATTCACTGCCCTGTTTACAACGTCCTGACTGGAAAACCTG  
 CGGTACCCAACTTAATGCCCTGCAAGCACATCCCCCTTCCGCCAGCTGGCTAA  
 TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATGCCCTTCCCAACAGTGGCGCAGGCTGAATGG  
 CGAATGAAAATTGTAAGCGTTAATATTGGTAAATTGCGTTAAATTGTTGTT  
 AAATCAGCTCATTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGAAATGCCCTTATAAAT  
 CAAAAGAATAGACCGAGATAAGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAACAAAGAGT  
 CCACTTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGCGAAAACCGCTATCA  
 GGGCGATGCCCTACGCGAACCATCACCTTAATCAAGTTTGGGGCGAG  
 GTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTG  
 ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTOGGAGAAAGGAAGGGAAGAAAOCGAAAGGA  
 CGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGGGCTACGCTGCCGTAACCAC  
 ACCCGCCGCOCTTAATGCCCGCTACAGGGCGCTCACGGTGGCACTTTGCCGG  
 AAATGTOCGCGAAACCCCTATTGTTATTCTAAATACATTCAAATATGTAT  
 CGCTCATGAGACAATAACCTGATAAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG  
 AGTATGAGTATTCAACATTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTGCCGATTTG  
 CCTTCCCTGTTTGTCACTGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACACCGG  
 TAAGTGGGTOCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACACCGG  
 CCTTGGAGAGTTTCCCGGCTGCTGCTGCTGAAAGTAAAGATGCTGAAGA  
 TCAGTTGGGTOCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACACCGG  
 CCTTGGAGAGTTTCCCGGCTGCTGCTGCTGAAAGTAAAGATGCTGAAGA  
 CTGCTATGTCGCCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGG  
 CGCCOCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAA  
 AAGCATTTACOGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGAGTGGAGG  
 ATGAGTGATAACACTGGGCCAACTTACTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA  
 GGAGCTAACCGCTTTTGCAACAACATGGGGATCATGTAACCTGCCCTGATCG

(continuación)

TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAAAACGACGAGCGTGTACACCACGA  
 TGCCTGTAGCAATGGCAACAACAGTTGCCAAACTATTAACTGGCGAAGTACTTA  
 CTCTAGCTCCCGOCAACAATTAAATAGACTGGATGGAGGGCGGATAAAGTGCAG  
 GACCACTTCCTCGCTCGGCCCTCCCOCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAATCTGG  
 AGCCGGTGACCGTGGCTCOCGGTATCATTCAGCACTGGGGCAAGATGGTAA  
 GCCCTCCCCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGACTCAAGCAACTATGGATGA  
 ACGAAATAGACAGATCGTGGAGATAAGTGCCTCACTGATTAAACGATTGGTAAC  
 GTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAAACCTTCACTTTAA  
 TTAAAAAGGATCTAAGGTGAAGATCTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT  
 AACGTGAAGTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCTAGAAAAGATCAAAGGAT  
 CTCTTGAGATCTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTGCAAACAAAAAACC  
 ACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCG  
 AAGGTAACGGCTTCAGCAAGCGCAGATACCAAAATACTGTTCTCTAGTGTAG  
 CCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCT  
 CTGCTAATCTGTTACCAACTGGCTGCGGATAAGTCGTGTCTTACCG  
 GTTGGACTCAAGACGATAAGTACCGGATAAAGGCGCAAGCGGTGGGCTGAAACG  
 GGGGTTCTGTGACACAGCCCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGA  
 ATACCTACAGCGTGAAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAACGGGAGAAAAGG  
 CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAAGAGCGCACGGGAA  
 GCTTCCAGGGGAAACCGCTGGTATCTTATAGTCTGTCGGGTTTCCGACACCTC  
 TGACTTGAGCGTGGATTGGTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGAAA  
 AACCGCAACGAAACCGGGCTTTTACGGTTCTGGCTTTGCTOGCTTTGCTC  
 ACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGATAACCGTATTACCGCTTT  
 GAGTGACCTGATAACCGCTGCCGCAACCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT  
 GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGAAACCGCTCTCCCGCGCGTT  
 CGCCGATTCAATTAAATGCAAGCTGGCACGGACAGGTTCCGACTGGAAGAACCGGGCA  
 GTOAGCGCAACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTT  
 TACACTTATGCTCCGGCTCGTATGGTGTGGAAATTGTGAGCGGATAACAAATT  
 TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCAAGCTCGAAATTAAACCTCA  
 CTAAAGGGAAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCTCGAGGTGAGA  
 TCCGGTCAACCAGCAACCATAGTCCGCCCTAACTCCGCCATCCGCCCTA  
 ACTCCGCCAGTCCGCCATTCTCCGCCATGGCTGACTAATTCTTATT  
 TOCAGAGGCCAGGGCGCCCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG  
 CCTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTGCAAAAAGCTTCGACGGTATCGATTGGCTCA  
 TGTCCAACATTACCGCCATTTGACATTGATTGACTAGTATTAAATAAGTAAT  
 CAATTACGGGTCTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCACCGACCCCCCGCCATTGACGT  
 CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACCGCAATAGGGACTTTCCATGACGTC  
 AATGGGTGGAGTATTGACGTAAACTGCCACTTGGCACTACATCAAGTGTATC  
 ATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGTAATGGCTGCGCTGCG  
 ATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCACTACATCTACGT  
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTGGCACTACATCAATGGCG  
 TGGATAGCGGTTTGGCACTACCGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAA  
 TGGGAGTTGTTTGGCACTACCGGGACTTTCCAAGTGTGCAACAA  
 CTCCGCCATTGACGCAAAATGGCCGGTAGGCCTGTACCGGAATTGGAGTGGCG  
 AGCCCTCAGATCTGATATAAGCAAGCTGCTTTGCGCTGTACTGGCTCTCTG

Tabla 14

Líder\_R12 -CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR(SEQ ID NO: 42)

5 Líder

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPI

**scFv R12**

QEQLVESGGRLVTPGGSLTLSCKASGFDFSAYYMSWVRQAPGKGLEWIATIYPSSG  
 KTYYATWVNNGRFTISSDNAQNTVDLQMNSLTAAADRATYFCARDSYADDGALFNI  
 WGPGLTVTISSGGGGSGGGGGSELVLTQSPSVSAAAGSPAKITCTLSSAHKTD  
 TIDWYQQQLQGEAPRYLMQVQSDGSYTKRPGVPDRFSGSSSGADRYLIIPSVQADDE  
 ADYYCGADYIGGYVFQGGTQLTVTG

Bisagra/espaciador

10

ESKYGPPCPPCP

**CD28tm**

MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

**4-IBB**

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

**CD3zeta**

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP  
 QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ  
 ALPPR

**T2A**

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR

**tEGFR**

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPIRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKFKNCTSISGDLHI  
 LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLIQAWPENRTDLHAFENLEIURGRT  
 KQHGQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK  
 TKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNSRGRECVDKCNLLE  
 GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM  
 GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIAATGMVGALL  
 LLLVVALGIGLFM

Tabla 15

CAR de espaciador largo de R11: PJ\_R11 -CH2-CH3-41 BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 43)

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT  
 TAAGCCTCAATAAAAGCTTGCTTGAAGTOCTTCAGTAACTAGTGTGTGCCCGTCTGTTG  
 TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATC  
 TCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGGAG  
 CTCTCTGACOCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGGCACGGCAAGAGGGAGGG  
 GCGGGCACTGGTGAAGTACGCCAAAAATTGACTAGCGAGGGCTAGAAGGAGA  
 GAGATGGGTGAGAGCGTCACTATTAAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA  
 AAAAATTCCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAAATATAAATTAAAACATATA  
 TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAATCTGGCCTGTTAGAAA  
 CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACCTGGACAGCTACAACCCTCATTGTGTG  
 CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAGATAGAGGA  
 AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGA  
 CACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA  
 AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGTAAAAGTAGT  
 AGAAGAGAAGGCTTCAGCCCAGAAGTGTACCCATGTTTCTAGCATTATCAGA  
 AGGAGCCACCCACAAGATTAAACACCATGCTAACACACAGTGGGGGGACATC  
 AAGCAGCCATGCAAATGTTAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGGCAAA  
 GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCACTGGGATAGGAGCTTGTCC  
 TTGGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG  
 ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTG  
 CTGAAGGGCTATTGAGGCCAGCAACAGCATCTGTGCAACTCACAGTCTGGGGCATC  
 AAGCAGCTCCAGGCAAGAACATCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA  
 GCTCTGGGATTGGGGTTGCTCTGGAAAGACTCATTTGCAACCACTGCTGTGCCT  
 TGGATCTACAAATGGCAGTATTGATCCACAATTAAAAGAAAAGGGGGGATTG  
 GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA  
 ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTCTGGGTTATTAC  
 AOGGACAGCAGAGATCCAGTTGGGATCAATTGATGAAAGAATCTCTTAA  
 GTTAGGGCTTTCGCTGCTTCGCGAGGGATCTGCATCCTCCGGTGCCTCA  
 GTGGCGAGAGCCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTGTGGGGGGAGGGGTG  
 GCAATTGAAACCGGTGCCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGT  
 GTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT  
 GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTCGCAACGGGTTGCGCCAGAACACAG  
 CTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTCACGCCGCCGCCCTACCTGA  
 GCCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCCCTCTGCCGCCCTCCGGTGTGGTGC  
 TCCTGAACCTGGTCCGCCGTAGGTAAAGTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGC  
 CTTTGTCCGGCGCTCCCTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGCTCTCACCGCTT  
 GCCTGACCCCTGCTQCTCAACTCTACGTCTTGTTCGTTCTGTTCTGCGCGT  
 TACAGATCCAAGCTGTGACCGGGCGCTACG

**OCTAGC**

(continuación)

**scFv R12**

GAATTGCCACCATGCTGCTGCTGGTACAAAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCC  
 CACCCCGCTTCTGCTGATCCCCAAGAGCGTGAAGAGTCCGAGGGCGACCTG  
 GTCACACCAGCCGGAACCTGACCTGACCTGTACCGCCAGCCAGCGACATC  
 AACGACTACCCCATCTCTGGTCCGCCAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAATGG  
 ATCGGCTTCATCAACAGCGCGGCAGCACTGGTACGCCAGCTGGTCAAAGGC  
 CGGTTACCATCAGCCGGACCAGCACCCGTGGACCTGAAGAGTACAAAGCCT  
 GACCACCGACGACACCGCCACCTACTTTGCCAGAGGCTACAGCACCTACTA  
 CGGCGACTTCAACATCTGGGCCCCGTGGCACCCGTGGTACAATCTCTAGCGCGG  
 AGGCAGGCAGCCGGAGGTGGAGGAAGTGGCGCGGAGGATCCGAGCTGGTCAATGA  
 CCCAGACCCCCAGCAGCACATCTGGGCCCGTGGGCCGACCGTGACCATCAATT  
 GCCAGGCCAGCACAGCATCGACAGCAACCTGGCTGGTCCAGCAGAAGCCC  
 GGCCAGCCCCCACCCTGCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTGGCAGCGCGTG  
 CCAAGCAGATTCAAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGAGTACACCCGTACCATCTCC  
 GGCCTGCAGAGAGAGGACGCCGCTACCTATTACTGCCCTGGCGCGTGGCAA  
 CGTGTCTACAGAACCTCGGCCGGAGGTACTGAGGTGGTGTCAA

Bisagra/espaciador

5

TA CGGACCGCCCTGCCCTGCCCT

**CH2**

GCCCCCGAGTTCCCTGGCGGACCCAGCGTGTCCCTGTTCCCCCAAGCCCCAAG  
 GACACCCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTG  
 AGCCAGGAAGATCCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGT  
 GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGAGGAACAGTCAACAGCACCTACCGGG  
 TGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA  
 AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGC  
 AAGGCCAAG

**CH3**

GGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCCTGCCCTCCCAGGAAGAGATG  
 ACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGCGCTGGTAAGGGCTTCTACCCAGCGAC  
 ATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAACGCCAGCCTGAGAAACAACATACAAGACCCAC  
 CCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTCTCTGTACAGCCGGCTGACCGT  
 GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTACGCTGCAAGCGTGTGACCG  
 AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGCAAG

**4-IBB**

ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGCGGGGTGCTGCCCTGCTACAGCCTGCTG  
 GTGACAGTGCCCTCATCATCTTGGTGAACCGGGCAGAAAGAAAACCTCCTG  
 TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAAGAGGAAGAT  
 GGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGT

(continuación)

**CD3zeta**

CGGGTGAAGTTCAAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAA  
 TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGCAGAAGGGAAAGAGTACGACGTCTGG  
 ATAAGCGGAGAGGCCCCGGACCCCTGAGATGGCGGGCAAGCCTCGGCCGAAGAAC  
 CCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTA  
 CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCAGGGCAAGGGCACGACCGC  
 CTGTATCAGGGCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATG  
 CAGGCCCTGCCCTCAAGG

**T2A**

CTCGAGGGCGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTCTAACATGCGGTGACGTGGA  
GGAGAATCCCCGGCCCTAGG

**tEGFR**

ATGCTTCTCTGGTACAAGCCTCTGCTCTGTAGTTACCAACACCCAGCATTCC  
 TCCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTAAAGACT  
 CACTCTCCATAAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCA  
 GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCTTCACACATA  
CTCCTCTCTGGATCCACAGGAACGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAATCA  
CAGGGTTTGCTGATTCAAGGCTGGGCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCC  
TTGAGAACCTAGAAATCATACCGCGGAGGACCAAGCAACATGGTAGTTCTC  
TTGCAGTCGTCAAGCCTGAACATAACATCCTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA  
TAAGTGTGGAGATGTGATAATTCAAGGAAACAAAAATTGTGCTATOCAAATA  
CAATAAAACTGGAAAAACTGTTGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAAATTATA  
AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCC  
GTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGAGGCCAGGGACTGCGTCTCTGCCG  
GAATGTCAAGCCAGGGAAATGCGTGGACAACTGCAACCTCTGGAGGGTG  
AGCCAAGGGAGTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGC  
CTGCCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGACCCAGACAACTGTATC  
CAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCGGCAGGA  
GTCATGGGAGAAAACAACACCCCTGGTCTGGAAAGTACGCGAGACGCCGGCATGT  
GTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGCCAGGTCTTGA  
AGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCTCCATGCCACTGGGATGGTGGG  
GGCCCTCCCTTGCTGCTGGTGGGCCCTGGGATGGCCCTCTTCAATGTGA

(continuación)

GCGGCCGCTCTAGACCCGGGCTGCAGGAATTGATATCAAGCTTATCGATAATC  
AACCTCTGGATTACAAAATTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGC  
TCCTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAAATGCCCTTGTATCATGCTATTGCTT  
CCCGTATGGCTTTCATTTCTCCTCCTTGTATAAAATCTGGTGTGCTGCTCTCTTAT  
GAGGAGTTGTGGCCCCGTTGTCAGGCAACGTCGGCGTGGTGTGCACTGTGTTGCT  
GACGCAACCCCCACTGGTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAAGCTCTTCCGGG  
ACTTTGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGCCGGAACTCATGCCGCCCTGCCCTTG  
CCCGCTGCTGGACAGGGGCTGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTTGT  
CGGGGAAATCATCGTCCTTCTTGGCTGCTGCCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT  
GCCGGGGACGTCTCTGCTACGTCCCTCGGCCCTCAATCCAGGGACCTTCC  
TCCC CGGGCTGCTGCCGGCTCTGCCGGCTCTCCQCGTCTCGCCCTCGCCCTC  
AGACGAGTCGGATCTCCCTTGGGCCCTCCCCGATCGATAACCGTCGACTAG  
CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTT  
AAAAGAAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAACAGAACAGATC  
TGCTTTTGCTGTACTGGGTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCT  
CTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTTGCCTTGAGT  
GCTTCAAGTAGTGTGTGCOCGTCTGTTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC  
AGACCCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGAATTGATATCAAGCTTAT  
CGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCGCGTACCCAAATTGCCCTATAGTGA  
CGTATTACAATTCACTGGCGCTGTTTACAACGTCGTGACTGGAAAACCGT  
GCCTTACCCAACTTAATGCCCTGCAAGCACATCCCCCTTGCCTGAAGCTGGCGTAA  
TAGCGAAGAGGCCGACCGATGCCCTCCAAACAGTGTGCGCAGCCTGAATGG  
CGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTGTAAAATTGCCGTTAAATTGTT  
AAATCAAGCTCATTTTAACCAATAGGCCGAAATGCCAAAATCCCTATAAAAT  
CAAAAGAACAGACCGAGATAGGGTTGACTGTTCCAGTTGGAACAAAGAGT

(continuación)

CCACTATAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGCGAAAAACCGTCTATCA  
 GGGCGATGCCCAACTACGTGAACCATCACCCATAATCAAGTTTTGGGCGAG  
 GTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTG  
 ACGGGGAAAGCCCGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGA  
 CGCGCGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACCGCTGGCGTAACCAAC  
 ACCCGCCCGCGCTTAATGCCCGCTACAGGGCGCGTAGGGTGGCATTTCGGGG  
 AAATGTGCCCGGAACCCCTATTTGTTATTTCTAAATACATICAATATGTAT  
 CGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTCAATAATATTGAAAAGGAAG  
 AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTGCGGCATTG  
 CCTTCCTTGTGCTACCCAGAAACGCTGTTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA  
 TCAGTTGGGTGACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGTAAGAT  
 CCTTGAGAAGTTTGCCTGGAGAACGTTTCAATGATGAGCATTAAAGTT  
 CTGCTATGTGCCCGGTATTATCCCGTATTGACCGGGCGCAAGAGCAACTCGG  
 CGCCGCATACACTATTCTAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAA  
 AACGATCTTACGGATOGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACC  
 ATGAGTGATAACACTCGGCCAACCTACTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA  
 GGAGCTAACCGCTTTTGCAACAACATGGGGATCATGTAACTCCTTGATCG  
 TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA  
 TGCCCTGTAGCAATGOCACAAACGTTGCCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTA  
 CTCTAGCTTCCCGCAACAATTAAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGAG  
 GACCACTCTGGCTCGGCCCTTCCCGCTGCTGTTATTGCTGATAAAATCTGG  
 AGCCCGGTGAGCGTGGGTCTCCCGTATCATTGCAAGCAGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA  
 ACCGAAATAGACAGATCGCTGAGTAGGTGCCCACTGATTAAGCATTGGTAACT  
 GTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAAACCTTCATTTTAA  
 TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATOACCAAAATCCCT  
 AACGTGAGTTTCTGTTCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGAT  
 CTTCCTGAGATCCTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCTGCAACACAAAAACC  
 ACCCGTACCGCGTGGTTGCTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTCCG  
 AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAAAATACTGTTCTCTAGTGTAG  
 CGCTAGTTAGGCCACCACTCAAGAAACTCTGCTAGCACCCTACATACCTCGCT  
 CTGCTAATCCGTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCG  
 GGTGAACTCAAQACGATAGTACCGGATAAGGCOCAGCGCGTGGCGTGAACO  
 GGGGGTTCTGCAACACAGGCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG  
 ATACCTACACCGTGAAGCTATGAGAAAGCOCACCGCTTCCGAACGGAGAAAGG  
 CGGACAGGTATCCCGTAAGCGGCAGGGTGGAACAGGGAGAGCCACGAGGGA  
 CCTTCCAGGGGAAACGCCGTTATCTTATAGTCCTGCTGGGTTTCCCGACCTC  
 TGACTTGAGCGTGGATTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAA  
 AACGCCAGCAACCGCCGCTTACCGGTTCTGCCCTTCTGCTGCTGCTTCTGCTC  
 ACATGTTCTTCTCGCTGTTATCCCGTGAATCTGTOGATAACCGTATTACCGCTT  
 GAGTGAGCTGATAACCGCTCGCCGCAACCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT  
 GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCCTCTCCCGCGCGTT  
 GCGCGATTCAATAATGCACTGCGACAGACAGGTTCCCGACTGGAAAGGAAAGCGGGCA  
 GTGAOCGCAACGCAATTAAATGTAAGTTAAGCTCACTCATAGGCACCCCAAGCGTT  
 TACACTTATGCTTCCCGCTGATGTTGTTGAGGAAATTGAGCGGAGATAACAATT  
 TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAACGCTGAAATTAAACCCCTCA  
 CTAAAGGGAACAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCGCTCGAGGTGAGA

(continuación)

TCCGGTCGACCAGCAACCATACTCCCCCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTA  
 ACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTATTAA  
 TGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG  
 GCTTTTGGAGGCCTAGGCTTTGCAAAAAGCTTCACGGTATCGATTGGCTCA  
 TGTCCAACATTACGCCATGTTGACATTGATTGACTAGTTATTAAATAGTAAT  
 CAATTACGGGTCATTAGTCATAGCCATATATGGAGTTCCGCGTACATAAAC  
 TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGT  
 CAATAATGACGTATGTTCCCATACTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC  
 AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATC  
 ATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGTAAATGGCCGCTGGC  
 ATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCACTTGGCAGTACATCTACGT  
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAATGGGTTTGGCAGTACATCAATGGCG  
 TGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA  
 TGGGAGTTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA  
 CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCGTGTACCGAATTGGAGTGGCG  
 AGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTGCCTGTACTGGGCTCTCTG

Tabla 16

5

Líder\_R11-Bisagra-CH2-CH3-CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 44)

Líder

**MLLVTSLLLCELPHPAFLLUP****R11 scFv**

QSVKESEGDLVTPAGNLTLCCTASGSDINDYPISWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTW  
 YASWVKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYSTYYGDFNIWGPGLVT  
 ISSGGGGSGGGSGGGSELVMTQTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAWFQQ  
 KPGQPPTLUIYRASNLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISGVQREDAATYYCLGGVGNV  
 SYRTSEGGGETVVVK

10

Bisagra/espaciador

**ESKYGPPCPPCP****CH2**

APEFLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVIVVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN  
 AKTKPREEQFNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

15

(continuación)

**CH3**

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT**Q**LVKGFYPNSDIAVEWESNOQOPENNYKTTPP  
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGRVFS**S**VMHEALHNHYTQKSLSLSGK

**CD28tm**

MFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFLFWV

**4-1BB**

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

**CD3zeta**

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP  
QEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQQLSTATKDTYDALHMQ  
ALPPR

**T2A**

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR

**teGFR**

MLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHI  
LPVAFRGDSFTHPPLDPQELDILKTVKEITGFLIQAWPENRTDLHAFENLEIHRGRT  
KQHGQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSQK  
TKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNSRGRECVDKCNLLE  
GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTQRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGYM  
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKJPSIATGMVGALL  
LLLVALGIGLEM

Tabla 17

CAR de espaciador intermedio de R11: PJ\_R11-CH3-41 BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 45)

5

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTGCGTAACTAGGGAACCCACTGCT  
 TAAAGCCTCAATAAAAGCTTGCTTGAAGTGTCAAGTAGTGTGTGCCGCTGTGTTG  
 TGTGACTCTGCTTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTAAGTCAGTGTGGAAAATC  
 TCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGAAACCAGAGGAG  
 CTCTCTGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCCAGGG  
 GCCGGCACTGGTGAAGTACGCCAAAAATTTCAGTACAGCCGAGGCTAGAAGGGAGA  
 GAGATGGGTGCGAGAGCOTCAOTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA  
 AAAAATTCCGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAAATATAAATTAAAACATATAAG  
 TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAATCCTGCCCTGTTAGAAA  
 CATCAGAAGGCTGAGACAAATACTGGACAGCTACAACCCTCAGACA  
 GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATAATACAGTAGCAACCCCTATTGTGTO  
 CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAGATAGAGGA  
 AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAAGCTGACACAGGA  
 CACAGCAATCAAGCTCAGCCAAAATTACCCATAGTGCAGAACATCCAGGGCA  
 AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTAAATGCATGGTAAAAGTAGT  
 AGAAGAGAAGGCTTCAGCCCAGAAGTGTACCCATGTTTCAGCATTATCAGA  
 AGGAGCCACCCACAAGATTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATC  
 AACCGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAAGGCAA  
 GAGAAGAGTOOTOCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTGTIC  
 TTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCOCAAGCOTCAATGACGCTG  
 ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTG  
 CTGAGGGCTATTGAGGGCGAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGCATC  
 AACCGCTCCAGGCAAGAACCTGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA  
 GCTCTGGGGATTGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTGCAACCACTGCTGTGCT  
 TGATCTACAAATGGCAGTATTGATCCACAATTAAAAGAAAAGGGGGATTG  
 GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATAACAA  
 ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTCGGGTTATTAC  
 AGGGACAGCAGAGATCCAGTTGGGATCAATTGCAAGAACATCTGCTTAGG  
 GTTAGGGCTTTCGGCTGCTCGCAGGGATCTGCGATCGCTCCGGTCCCGTCA  
 GTGGGCAAGGCCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCG  
 GCAATTGAACCGGTGCTAGAGAAAGTGGCGCGGGTAAACTGGAAAGTGT  
 GTCGTGACTOCTCCOCCTTTTCCCGAGGGTGGGGAGAACCGTATATAAGT  
 GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTCGCAACGGGTTGCCAGAACACAG  
 CTGAAGCTCGAGGGCTCGCATCTCTCTCACGCCGCCGCCCTACCTGA  
 GGCCGCCATCCACCCCCGGTTGAGTCGCTTCTGCCOCCTCCCCCTGTGGTGC  
 TCTGAACTGCGTCCGGTCTAGGTAAAGTTAAAGCTCAGGTGAGACCGGGC  
 CTTTGTCCGGCTCCCTTGAGGCTACCTAGACTCACCCGGCTCTCCACGCTT  
 GCCTGACCCCTGCTTGTCAACTCTACGTTCTTGTGTTCTGTTCTGCGCCGT  
 TACAGATCCAAGCTGTGACCGGCCCTACG  
**GCTAGC**  
**R11 scFV**  
 GAATTCCGCCACCACTGCTGCTGCTGGTACAAGCCTGCTGCTGCGAGCTGCC  
 CACCCCGCCCTTCTGCTGATCCCCCAGAGCOTGAAAAGTCCGAGGGCAGCTG

(continuación)

GTCACACCAGCCGGAACCTGACCTGTACCGCCAGCGGCAGCGACATC  
 AACGACTACCCCATTCTTGGGTCCGCCAGGTCTTGCAAGGGACTGGAATGG  
 ATCCGCTTCATCAACAGCGGCCAGCAACGACCTTGGTACGCCAGCTGGTCAAAGGC  
 CGGTTCAACCATCAGCCGGACCAACGACCCAGCTGGACCTGAAGATGACAAGCCT  
 GACCACCGACGACACCCACCTACTTTGCCGCCAGAGGGCTACAGCACCTACTA  
 CGGGGACTTCACATCTGGGCCCTGGCACCCCTGGTACAATCTCTAGCGGCCG  
 AGGCCGGAGCGGGAGGGAGGAAGTGGCGGCCAGGGATCCGAGCTGGTCAATG  
 CCCAGACCCCCAACGACACATCTGGGCCCTGGGCCGACCGTACCCATCAATT  
 OCCAAGGCCAACCCAGAGACATCGACAACCAACCTOCCCTGGTCAACGCAAAAGCCC  
 OGCCAOGCCCCCACCCTGCTGATCTACAGAGGCTCCAACCTOCCCAACCGCGT  
 CCAAGCAGATTCAAGCGGCCAGCAGATCTGGCACCCAGTACACCCCTGACCATCTCC  
 GGCGTGCAGAGAGAGGGACGCCGCTACCTATTACTGCTGGGCCGTTGGGCAA  
 CGTGTCTACAGAACCAACGCTTCGGGAGGTAACGAGGTGAACTGAAAGTGGTGTCAA

Bisagra/espaciador

5

**TAGGACCCCTGCCCTTGTGCCCT**

CCCCCGAGTTCTGGGCCGGACCCAGCGTGTCTGTTCCCGGAAAGCCCAAAG  
 GACACCCCTGATGATGATCAGCCGGACCCCGAGGGTGAACCTGGCTGGTGGTGGACGTG  
 AGCCAGGAAGATCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGACCCGGTGGAAAGT  
 GCACAACGCCAACGACCAAGGCCAGAGAGGAACAGTTCAACACGACACCTACCGGG  
 TGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCAACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAAATACA  
 AGTCAAAAGTGTCCAACAAGGGCTGCCAACGACATCGAAAAGACCATCAGC  
 AAGGCCAAG

**CH3**

GGCCAGCCTCOCGAGCCCCAGGTGTACACCCCTCCCTCCCTCCAGGAAGAGATG  
 ACCAAGAACGAGGTGTCCCTGACCTGCCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAACCGAC  
 ATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGCCAGGCTGAGAACAACTACAAGACCAC  
 CCTCCCGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGT  
 GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTAGCTGCAGCGTGTGACGACG  
 AGGCCCTGCACAACCAACTACACCCAGAAGAGGCTGTGGCTGTCCCTGGGCAAG

**4-1BB**

ATGTTCTGGGTOCTGGTGGTGGGCGGGGTOCTGGCTGCTACAGCCTGCTG  
 GTGACAGTGGCTTCATCATCTTGGTGAACCGGGCAGAAAGAAACTCCTG  
 TATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT  
 GGCTGTAGCTGCCATTCCAGAAGAAGAAGGAGGGATGTGAACGT

**CD3zeta**

CGGGTGAAGTTCAAGCAGAACGCCAGGCCCTGCCCTACCAAGCAGGCCAGAA  
 TCAAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGCAAGAAGGGAAAGAGTACGACGTCTGG  
 ATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCCTGAGATGGCGGCCAGCCTGGCGGAAGAAC  
 CCCCCAGGAAGGCCGTATAACGAACCTCAGAAAGACAAAGATGGCGAACGCC  
 CAGCGAGATCGGATGAAAGGGCGAGCGGAGGCCGGGCAAGGGCCACGACGCC  
 CTGTATCAGGGCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGACATG  
 CAGGCCCTGCCCTAACGG

**T2A**

**CTCGAAGGGCGGCCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGAA  
 GGAGAATCCCGGCCCTAGG**

(continuación)

**EGFR**

ATGCTTCTCTGGTACAAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCAACACCCAGCATTCC  
 TCTTGATCCCACCAAAGTGTGAACGGAATAGGTATTGGTAATTAAAGACT  
 CACTCTCCATAAAATGCTACCGAATATTAAACACTTCAAAACACTGCACCTCCATCA  
 GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTCACACATA  
 CTCCCCCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAATCA  
 CAAGGTTTCTGATTCAAGGCTTOGCCGAAAACAGGACGGACCTCCATGCC  
 TTGAGAACCTAGAAAATCATACGGGGAGGACCAAGCAACATGGTAGTTTCTC  
 TTGCACTCGTCAGGCTGAACATAACATCCTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGA  
 TAAGTGTGGAGATGTGATAATTCTAGGAAACAAAAATTGTGCTATGCAAATA  
 CAATAAACTGGAAAAAAACTGTTGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA  
 ACGAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGCTGCCCCATGCC  
 GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGGCCGGAGGCCAGGGACTGCCCTCTGGCG  
 GAATGTAGCCGAGGCAGGGAAATGCGTGGACAAGTGCACACCTCTGGAGGGTG  
 AGCCAAGGGAGTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGC  
 CTGCCCTAGGCCATGAACATCACCTOCACAGGACGGGGACCAGACAACCTGTATC  
 CAGTGTGCCACTACATTGACGCCCTACTGCCGTCAGACCTGCCGGCAAGGA  
 GTCATGGAGAAAACAACACCCCTGGTCTGGAAAGTACCGAGACGCCGGCATGT  
 GTGCCACCTGTGCCATCAAACCTGGATGCGGACTGGGCCAGGTCTTGA  
 AGGCTGTCCAACGAAATGGGCCCTAAGATCCCCTCATGCCACTGGGATGGTGG  
 GGGCCCTCTCTTGTGCTGGTGGGGCTGGGGATGCCCTCTTGTGCTGGA  
 GCGGCCGCTCTAGACCCGGCTGCAAGGAATTGATATCAAACCTATGATAATC  
 AACCTCTGGATTACAAAATTGTGAAAGATTGACTGGTATCTTAACATATGTTGC  
 TCTTTTACGCTATGCGATACGCTGCTTAAATGCCCTTGTATCATGCTATTGCTT  
 CCCGTATGGCTTCTATTTCTCCCTCTGTTATAAAATCCGGTGTGCTGTCTCTTAT  
 GAGGACTTGTGGCCCTGGTCAAGGCAACGTGGCTGGTGTGCGACTGTTGCT  
 GACGCAACCCCCACTGGTGGGGCATTGCCACCCACTGCACTCTCTCCGG  
 ACTTTCCCTTCCCCCTCCATTGCCACGGCGAACCTCATGCCGCTGCC  
 CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGGCACTGACAATTCCGTGGTGTG  
 CGGGGAAATCATCGTCTTCTCTGGCTGCTGCCCTGTTGCCACCTGGATTCT  
 GCCCGGGACGTCTCTGCTACGTCCTTCCGGCTCAATCCAGCGGACCTCT  
 TCCCCGGCCCTGCTGCCGCTCTGCCGCTCTCCCGCATCGATAACCGTCGACTAG  
 CGTACCTTAAAGACCAATGACTTACAAGGCAAGCTGTAAGATCTAGCCACTTTT  
 AAAAGAAAAGGGGGACTGGAAAGGCTAACTCACTCCAAAGAAGACAAAGATC  
 TGCTTTTGTGCTGACTGGGCTCTCTGGTAAAGCAGATCTGAGGCTGGAGCT  
 CTCTGCTAACTAGGGAAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTTGGTAACTAGAGATCCTC  
 AGACCCCTTAAAGTCACTGGGAAATCTCTAGCAGAATTGCGATATCAAGCTTAT  
 CGATACCGTCACTCGAGGGGGGGCGTACCCAAATTGCCCTATAGTGAGT  
 CGTATTACAATTCACTGCCGTCGTTTACAACGTCGTAACCTGGAAAACCC  
 CGCTTACCAACTTAATGCCCTGCAAGCACATCCCCCTTCCGCACTGGCGTAA  
 TAGCGAAGAGGCCGACCGATGCCCTTCCAAACAGTTGCCAGGCTGAATGG  
 CGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTGTTAAAATTGCCGTTAAATTGTT  
 AAATCAGCTCATTTTAAACCAATAGGCCAAATCGCAAAATCCCTATAAAAT  
 AAAAGAATAGACCGAGATAGGGTGGAGTGTGTTCCAGTTGGAAACAAAGT

(continuación)

CCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA  
 GGGCGATGGGCCACTACGTGAACCATAACCCCTAATCAAGTTTTGGGGTCGAG  
 GTGGCGTAAAGCACTAAATCGAACCCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTG  
 ACGGGGAAAGCCGCGAACGOTOGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGA  
 GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAACTGTAGCGGTACCGTGCCTGTAACCAC  
 ACCCGCCGCGCTTAATCGCCGCTACAGGGCGCTCAAGGTGGCATTTCGGG  
 AAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTATTCTAAATACATTCAAATATGTAT  
 CCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAAATGCTCAATAATATTGAAAAGGAAG  
 AGTATGAGTATTCAACATTCCGTGTCGCCCTATTCCCTTTTGCGCGCATTG  
 CCTTCTGTTTTOCTCACCCAGAACCGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGA  
 TCAGTTGGGTGACGGAGTGGGTTACATCGAACCTGGATCTCAACACCGTAAGAT  
 CCTTGAGAGTTTGCCTGGGAAGAACGTTTCAATGATGAGCACTTTAAAGTT  
 CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGT  
 CGCCOCATACACTATTCTAGAATGACTTGGTTAGTACTCACCAGTCACAGAA  
 AAQCATCTAACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGAGTGTGCCATAACC  
 ATGAGTQATAACACTCGGCCAACCTACTCTGACAAACGATCGGAGGACCGAA  
 GGAGCTAACCGCTTTTGCACAACATGGGATCATGTAACTCGCCCTOATCG  
 TTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGA  
 TGCGTGAAGCAATGGCAACAACGTTGCCAAACTATTAACTGCGAACACTACTA  
 CTCTAGCTTCCGCGCAACAATTAAAGACTGGATGGAGGCGGATAAGTTGAG  
 GACCACTCTCGCTCGCCCTCCGGCTGGCTGTTATTGCTGATAAAATCTGG  
 AGCCGGTGGCGTGGCTCGCGGTATCTACACGACGGGGAGTCAGGAACTATGGATGA  
 ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAAGGTGCTCACTGATTAAGGATTGGTAACT  
 GTCAGACCAAGTTACTCATATACTTAGATTGATTTAAACTTCATTAA  
 TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT  
 AACGTGAGTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAAGAAAAGATCAAAGGAT  
 CTTCTGAGATCTTTCTGCGCTTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAAAACC  
 ACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTGCCGGAATCAAGAGCTACCAACTCTTCCG  
 AAGGTAACCTGCGCTAACGAGCGGAGATACCAAAACTGTTCTAGTGTAG  
 CGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACACTCTGAGCACCCTACATACCTCGCT  
 CTGCTAATCTGTTACCAAGTGGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCG  
 GGTGGACTCAAGACGATAGTTACGGGATAAGGCCAGCGGTGGCTGAACG  
 GGGGGTCTGTCACACAGCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG  
 ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTCCGAAGGGAGAAAGG  
 CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTGGAAACAGGAGAGCGCACCGAGGA  
 GCTTCCAGGGGGAAACGCCGGTATCTTATAGCTGCTGCCCTTCCGACCTC  
 TGACTTGAGCGTCGATTTTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAA  
 AACGCCAGCAACGCGGCCCTTACGGTTCTGGCTTTGCTGGCTTTGCTC  
 ACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCCTGAGATAACCGTATTACCGCTT  
 GAGTGAGCTGATAACCGCTGCCCGAACCGAACGCGAACGAGCTAGT  
 GACCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCCCTCTCCCGCGCCCT  
 GCGCGATTCTTAAATGAGCTGGCACGACAGGTTCCGACTGAGAAAGCGCGCA  
 GTGAGCGCAACGCAATTAAATGAGTTAGCTCACTCATTAGGACCCCCAGGCTT  
 TACACTTATGCTCCGGCTGTATGTTGTTGAGGAAATTGAGCCGGATAACAATT  
 TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTGAAATTAAACCTCA  
 CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCCCGTGGCGGCTCGAGGTGAGA

(continuación)

TCCGGTCGACCAOCAACCATAGTCCCCCCCCCTAACCTCCGCCCATTCCCCCCCCCTA  
 ACTCCGCCAGTTCCGCCCATTCCTCCGCCCATGGCTGACTAAATTITTTTATTTA  
 TGCGAGGGCGAGGCCGCTCGGCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG  
 GCTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTGCAAAAAAOCTTCQACOCTATCGATTGGCTCA  
 TGTCCAACATTACGCCATGGACATTGATTGACTAGTTATTAAATAGTAAT  
 CAATTACGGGGTCATTAGTCATAGCCATATATGGAGTCCCGCTACATAAC  
 TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGT  
 CAATAATGACGTATGTCCTAGTAACGCCAATAAGGGACTTTCCATTGACGTC  
 AATGGGTGGAGTATTAAOGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAACTGTATC  
 ATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGTAATGGCCCTGGCTGGC  
 ATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCACTTGGCAGTACATCTACGT  
 ATTAGTCATCOCTATTACCATGGTATGTCGGGTTTGGCAGTACATCAATGGCG  
 TOGATAOGCOGTTTGAUTCACOGGGATTCCAAAGTCTCACCCCATTGACGTCAA  
 TGGGAGTTGTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAAACAA  
 CTCCGCCCCATTGACOCAAATGGGCGGTAGOCGTGTACCGAATTGGAGTGGCG  
 AGCCCTCAAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTGCTGTACTGGGTCTCTCG

Tabla 18

5

Líder\_R11-Bisagra-CH3-CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 46)

Líder

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

**scFV RII**

QSVKESEGDLVTPAGNLTLTCTASGSDINDYPISWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTW  
 YASWVKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTDDTATYFCARGYSTYYGDFNIWGPGLVT  
 ISSGGGGSGGGGSGGGSELVMTQTPSSTSGAVGGTVINQASQSIDSNLAWFQQ  
 KPGQPPTLLIYRASNLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISGVQREDAATYYCLGGVGNV  
 10 SYRTSFQGGTEVVVK

10

Bisagra/espaciador

ESKYGP~~PCPPCP~~**CH3**

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT~~CL~~VKGFP~~S~~DIAVEWESNGQOPENNYKTTPP  
 VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC~~S~~V~~M~~HEALHNHYTQKSLSLSLGK

15

(continuación)

**CD28tm**

MFWVLVVGGVLACYSLVTVAIFIIFWV

**4-1BB**

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPBEEEGGCEL

**CD3zeta**

RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNP

QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ

ALPPR

**T2A**

LEGGGEGRGOSLLTCGDVEENPGPRM

**EGFR**

LLLVTSLLCLELPHAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKFKNCTSISGDLHIL

PVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTK

QHGQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKT

KIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG

EPRFENVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDCIQCAYIDGPHCVKTCPAGVMG

ENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIAATGMVGALLL

LLVVALGIGLFM

Tabla 19

CAR de espaciador corto de R11: PJ\_R11-41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 47)

5

GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT  
 TAAGCCTCAATAAACTTGCCTTGAGTCTCAAGTACTGTGTGCCGTCTGTTG  
 TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTITAGTCAGTGTGGAAAATC  
 TCTAGCAGTGGCGCCCGAACACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAG  
 CTCTCTCGACOCAGGGACTCGGCTTGCTGAACGCCACGCCAACAGGGAGCGAGGG  
 GCGGCCACTGGTGAAGTACGCCAAAAATTGACTAOGCGAGGCTAGAAGGAGA  
 GAGATGGGTGCGAGAAGCGTCAGTTAGCAGGGGGAGAATTAGATCGATGGGA  
 AAAAATTCCGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAAATATAAATTAAAACATATAG  
 TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAACCTGGCCTGTTAGAAA  
 CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATTCCCTCAGACA  
 GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATAATACAGTAGCAACCCCTATTGTGTG  
 CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTACAGAACATCGACACAGGA  
 AGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAAGCTGACACAGGA  
 CACAGCAATCAAGTCAGCCAAAATTACCCCTATAGTGCAGAACATCGACAGGGCA  
 AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATCGATGGTAAAGTAGT  
 AGAAGAGAAGGCTTCAGCCCAGAAGTGAACCCATGTTTACCGATTATCAGA  
 AGGAAGCCACCCACAAAGATTAAACACCATGCTAACACACAGTGGGGGACATC  
 AACGAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAAGGCAAA  
 GAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCACTGGGAATAGGAGCTTGTCC  
 TTGGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGCGCAGCGTCAATGACGCTG  
 ACCGTACAGGCCAGACAATTATGCTGGTATAGTOCAGCAGCAGAACAAATTG  
 CTGAGGGCTATTGAGGCCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGCATC  
 AAACAGCTCCAGGCAAGAACCTGGCTGTGGAAAAGATACCTAAAGGATCAACA  
 GCTCCTGGGATTGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTGCAACCACTGCTGTGCC  
 TGGATCTACAAATGGCAGTATTICATCCACAATTAAAAGAAAAGGGGGATTG  
 GGGGGTACAGTCCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA  
 ACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTCGGGTTATTAC  
 AGGGACAGCAGAGATCCAGTTGGGATCAATTGCAAGAACCTGCTTCTAGG  
 GTTAGGCCTTTCGCTGCTCGAGGGATCTGCGATCGCTCCGGTCCCCGTCA  
 GTGGGCAGAGCOCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTGGGGGGAGGGGTG  
 GCAATTGAAACGGTCCCTAGAGAACGGTGGCCGGGGTAAACTGGAAAGTGA  
 GTCGTGTACTGGCTCCGCCCTTTCGGAGGGTGGGGAGAACCGTATATAAGT  
 GCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTCGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACAG  
 CTGAAGCTCGAGGGGCTCGCATCTCCTCACGCGCCGCCCTACCTGA  
 GGCGCCATCCACGCCCGTGAAGTGTGCTGCCGCCCTCCCGCTGTGGTGC  
 TCCGTGAACTGGTCCGCCGTCTAGGTAAAGTTAAAGCTCAGGTGAGAACCGG  
 CTGGTCCGGCGCTCCCTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGCTCTCACGCTT  
 GCCTGACCTGCTGCTCAACTCTACGTCTTGTGTTCTGTTCTGCTGCCGT  
 TACAGATCCAAGCTGTGACCCGGCGCTACG

**GCTAGC****scFV R11**

GAATTGGCCACCGATGCTGCTGCTGGTGAACAGCCTGCTGCTGCGAGCTGCC  
 CACCCCGCCCTTCTGCTGATCCCCCAAGAGCGTGAAGAGTCCGAGGGCGACCTG

(continuación)

GTCACACCAGCCGGCAACCTGACCTGTACCGCCAGCGGAGCGACATC  
 AACGACTACCCATCTTGGGTCCGCCAGGCTCTGGCAAGGGACTGGAATGG  
 ATCGGCTTCATCAACAGCGCCGGCAGCACTTGGTACGCCAGCTGGTCAAAGGC  
 CGGTTCAACCATTAGCCGGACCAGCACCCGTGGACCTGAAGAGTACAAGCCT  
 GACCACCGACGACACCGCCACCTACTTTGCGCCAGAGGCTACAGCACCTACTA  
 CGGGCACTTCAACATCTGGGGCCCTGGCACCCCTGGTACAATCTAGCGCGG  
 AGGCAGCGAGCGGAGGTGGAGGAAGTGGCGGCCAGGATCCGAGCTGGTCAATG  
 CCCAGACCCCCAGCACATCTGGCGCCGTGGCGGCCACCGTACCATCAATT  
 GCCAGGCCAACCCAGAGCATCGACAGCAACCTGGCCTGGTCCAAGCAGAACG  
 GGCCAGCCCCCACCCTGCTGATCTACAGAGCCTCAACCTGGCCAGCGCGTG  
 CCAAGCAGATTCAAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGAGTACACCCGACCATCTCC  
 CGCGTGCAGAGAGAGGACGCCCGTACCTATTACTGCCTGGCGGCCGTGGCAA  
 CGTGTCTACAGAACCGAGCTCGGCAGGTAAGGTGAGGTGGTCAAA

Bisagra/espaciador

5

TACGGACCGCCCTGCCCTTGGCCCT

GGCCAGCCTCGCGAGCCCCAGGTGTACACCCCTGCCCTCCCTCCAGGAAGAGATG  
 ACCAAGAACCAAGGTGTCCCTGACCTGCCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAC  
 ATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAACGCCAGCCTGAGAACAAACTACAAGACCAC  
 CCTCCCGTGGACAGCGACGCCAGCTCTCCCTGTACAGCCGGCTGACCGT  
 GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTAGCTGAGCGTGAACG  
 AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAACCTGAGCCTGTCCCTGGCAAG

**4-IBB**

ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGGGGTGTGGCCTGCTACAGCCTGCTG  
 GTGACAGTGGCCTTCATCATCTTGGTGAACACGGGGCAGAAAGAAACTCCTG  
 TATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT  
 GGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACCTG

**CD3zeta**

CGGGTGAAGTTCAAGCAGAACGCCAGGCCCTGCCCTACCAAGCAGGGCCAGAA  
 TCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGAACGGGAAGAGTACGACGTCCCTGG  
 ATAAGCGGAGAGGCCCGGACCCCTGAGATGGGCAGCAAGCCTGCCGGAAAGAAC  
 CCCCCAGGAAGGCCGTATAACGAACCTGAGAACAGAACAGATGCCGAGGCCTA  
 CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGGAGGCAGGGCAAGGCCACGACGGC  
 CTGTATCAAGGCCCTGTCACCGCCACCAAGGATAACCTACGACGCCCTGCACATG  
 CAGGCCCTGCCCTCAAGG

**T2A**

CTCGAGGGCGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGA  
GGAGAATCCCCGCCCTAGG

(continuación)

**tEGFR**

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCC  
TCCTGATCCCACCGCAAAGTGTGTAACCGAATAGGTATTGGTGAATTAAAGACT  
CACTCTCCATAAAATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCCATCA  
GTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATA  
CTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCA  
CAGGGTTTTTGCTGATTCAAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCC  
TTGAGAACCTAGAAATCATACGCCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTCTC

(continuación)

TTGCAGTCGTAGCCTGAACATAACATCCCTGGGATTACCGTCCCTCAAGGAGA  
 TAAGTGATGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTGTGCTATGCAAATA  
 CAATAAAACTGGAAAAAAACTGTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATTATA  
 AGCAACAGAGGTGAAAACAGCTOCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCCT  
 GTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGCCAGGGACTGCGTCTCTGCCG  
 GAATGTAGCCGAGGGAAATOCGTGGACAAGTGAACCTCTGGAAAGGGTGA  
 AGCCAAGGGAGTTGTGAGAACACTCTGAGTGCATAACAGTGCCACCCAGAAGTGC  
 CTGCCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGACCAAGACAACGTATC  
 CAGTGCCACTACATTGACGCCCTGCTGCAAGACCTGCCGCGCAGGA  
 GTCATGGGAAGAAAACAACACCCCTGGTCTGAAAGTACOCAGACGCCGGCATGT  
 GTGCCACCTGTGCCATCCAACCTGACCTACGGGATGCACTGGGCTTGA  
 AGGCTGTCCAACGAATGGGCTAAGATCCCCTCCATGCCACTGGGATGGTGGG  
 GGCCCTCTCTTGTGCTGCTGGTGGGATGCCCTCTCATGEGG  
GCGGCCGCTCTAGACCCGGCTGCAAGGAATTGGATATCAAGCTTATCGATAATC  
 AACCTCTGGATTACAAAATTGTGAAAGATTGACTGGTATTCCTTAACCTATGTTGC  
 TCCCTTTACGCTATGTGGATAACGCTGCTTTAATGCCCTTGTATCATGCTATTGCTT  
 CCCGATGCTTTCATTTCCTCTGTATAAAATCTGGTGTGCTGACTGTGTTGCT  
 GAGGAGTTGTGGCCCGTGTCAAGGAAACGTGGCTGGTGTGCACTGTGTTGCT  
 GACGCAACCCCCACTGGTGGGGCATTOCCACCCACCTGTCAGCTCCCTGGG  
 ACCTTCGCTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGGGAACTCATGCCGCCCTGCCCTG  
 CCCGCTGCTGGACAGGGGCTGGCTGTTGGCACTGACAATTGGTGGTGTGTTG  
 CGGGGAAATCATGCTCTTCTCTGCTACGTCCCTGCCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT  
 GCGGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTGCCCTCAATCCAGCGAACCTTCC  
 TCCCGCGGCCCTGCTGCCGCTCTGCCGCTCCCGCATGATAACCGTCGACTAG  
 CGTACCTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAAGCTGTAGATCTAACCCACTTTT  
 AAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGCTAATTCACTCCAAAGAAAGAACAGATC  
 TGCTTTTGCCGTACTGGGCTCTCTGTTGGTAAACCAGATCTGAACTGGGAGCT  
 CTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAACCTCAATAAGCTTGGCTTGAGT  
 GCTTCAAGTAGTGCTGCTGGGACTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC  
 AGACCCCTTAAGTCACTGGGAAACCTGCTTAAACCTCAATAAGCTTGGCTTGAGT  
 CGTATTACAATTCACTGGCCGCTGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTG  
 GCCTTACCCAACTTAATGCCCTGCAAGCACATCCCCCTTCCGCAAGCTGGCTAA  
 TAGCGAAGAGGCCGACCGATGCCCTGCCAACAGTGGCGAACCTGAATGG  
 CGAACGAAATTGTAAGCGTTAATTTTGTTAAAATTGGCTTAAATTGGTT  
 AAATCAGCTCATTTTAACCAATAGGGGAAATGGGAAATCCCTTATAAAAT  
 CAAAAGAATAGACCGAGATAGGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTGGAAACAAGAGT  
 CCACTATTAAAGAACGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA  
 GGGCGATGCCGACTACGTGAAACCATCACCTTAATCAAGTTTGGCTGAG  
 GTGCCGTAAGCAGTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGGCCCGATTAGAAGCTTG  
 ACGGGGAAAGCCGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAGAACGCGAAAGGA  
 GCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGAGCGGTACGCGTGGCTAACCAAC  
 ACCCGCCGCGCTTAATGCCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTGGGG  
 AAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTATTCTAAATACATTCAAATATGTAT  
 CCCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG  
 AGTATGAGTATTCAACATTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTGGCATTG

(continuación)

CCTTCCCTGTTTGCTCACCCAGAAACGGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGA  
 TCAGTTGGGTGACCGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACACGGTAAGAT  
 CCTTGAGAGTTTCGCCCGAAGAACGTTTCAATGATGAGCATTAAAGTT  
 CTGCTATGTGGCQCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGT  
 CGCCGCATAACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGAAGTACTCACCAGTCACAGAA  
 AAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATTATGCACTGCTGCCATAACC  
 ATGAGTGTATAACACTGCOGCCAACTTACTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA  
 GGAGCTAACCGCTTTTGACAAACATGGGGATCATGTAACTCGCCATGATCG  
 TTGGGAACCGGAOCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTACACCCAGA  
 TOCCCTGTAGCAATGCAACAACGTTGCCAAACTATTAACTGOCGAACACTTA  
 CTCTAGCTTCCCGCAACAATTAAATAGACTGATGGAOGCGGATAAAAGTTGCA  
 GACCACTCTOCQCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATGCTGATAAAATCTGG  
 AGCCGOTGAGCGTGGGTCTCCCGTATCATTGCAACGACTGGGCCAGATGGTAA  
 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACCGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA  
 ACGAAATAGACAGATCQCTGAGATAAGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA  
 ACTGTCAGACCAAGTTACTCATATACTTTAGATGATTAAACTTCATTITAA  
 TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTT  
 AACGTGAGTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAAGATCAAAGGAT  
 CTTCCTTOAGATCCTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAAAACC  
 ACCGCTACCAGCGTGGTTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTCCG  
 AAAGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACAAATCTGTTCTAGTGTAG  
 CCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAAACTCTGTAQCACCGCCTACACCTCQCT  
 CTQCTAATCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTOGGATAAGTCGTTCTTACCG  
 GGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCCAGCGCGTGGCTGAACG  
 GGGGGTTCTGTCACACACGCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG  
 ATACCTACACGCTGAGCTATGAGAAAACGCCACCGTCCCGAAGGGAGAAAGG  
 CGGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACCGAGGG  
 GCTTCCAOGGGAAACGCCCTGATCTTATACTGCTGCGGTTGCCACCTC  
 TGACTTGAAGCGTCAAGTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAA  
 AACGCCACGCAACGCCGCTTTTACGGTCTGGCTTTGCTGCGCTTGTCTC  
 ACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTTGATAACCGTATTACCGCTT  
 GACTGAGCTGATAACGCTGCCGAGCCGACCGAGCGCAGCGACTCAGT  
 GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCCTTCAACGCCAAACCCCTCTCCCGCGGTT  
 GCGGATTCATTAATGCAQCTGGCACGACAGTTCCCGACTGGAAACCGGCGA  
 GTGAGCGCAACGCAATTAAATGAGTTAGCTACTCATTAGOCACCCAGGCTT  
 TACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTTGAAATTGTGAGCGGATAACAATT  
 TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGCTGAAATTAAACCGCTA  
 CTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCCGGTGGGGGCTCGAGGTGAGA  
 TCCGGTGGACCGAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCTGCCCATCCGCCCTA  
 ACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCATGGCTGACTAATTTTTTATTAA  
 TGGAGAAGGCCAGGGCCCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG  
 GCTTTTGGAGGCTAGGCTTTOCAAAAAGCTTCGACGGTATGATTGGCTCA  
 TGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTGACTAGTATTAAATAGTAAT  
 CAATTACGGGGTCAATTAGTCTAGGCCATATATGGAGTTCCGGCTTACATAAC  
 TTACGGTAAATGGCCCGCCCTGGCTGACCGCCCACGACCCCCGCCATTGACGT  
 CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGT  
 AATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTGGAGTACATCAAGTGTATC

(continuación)

ATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC  
 ATTATGCCCAAGTACATGACCTTATGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGT  
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGAATGCAGGTTTGGCAGTACATCAATGGCG  
 TGGATAGCOGTTTGACTCACGGGATTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAA  
 TGGGAGTTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA AAAATGTCGTAACAA  
 CTCCGCCCTATTGACOCAAATGGGCGGTAGGCCTGTACOGAATTGGAGTGGCG  
 AGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTGCCTGTACTGGGTCTCTG

Tabla 20

5 Líder \_R11- Bisagra-CD28tm/41BB-Z-T2A-tEGFR (SEQ ID NO: 48)

Líder

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

**ScFv R11**

QSVKESEGDLVT PAGNLTLTCTASGSDINDYPI SWVRQAPGKGLEWIGFINSGGSTW  
 YASWVKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTIDDTATYFCARGYSTYYGDFNIWGPGLVT  
 ISSGGGGSGGGSGGGSELVMTQTPSSTSGAVGGTVTINCQASQSIDSNLAWFQQ  
 KPGQPPTLLIYRASNLA SGVPSRFSGRS GTEYTLTISGVQREDAATYYCLGGVG NV  
 SYRTSFGGGTEVVVK.

10 Espaciador/bisagra

ESKYGP~~PC~~PPCP**CD28tm**

MFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

**4-1BB**

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL

**CD3zeta**

RVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNP  
 QEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGD GLYQGLSTATKDTYDALHMQ

ALPPR

**T2A**

LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR

15

(continuación)

**tEGFR**

MLLLVTSLLLCELPHAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHI  
 LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRT  
 KQHQQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK  
 TKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLE  
 GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM  
 GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIAATGMVGALL  
 LLLVVALGIGLFM

**Tabla 21**

5

Espaciador intermedio (SEQ ID NO: 49)

Bisagra/espaciador

ESKYGPPCPPCP**CH3**

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTQLVKGFYPSDI AVEWESNGOPENNYKTTPP  
 VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

10

Espaciador largo (SEQ ID NO: 50)

Bisagra

15

ESKYGPPCPPCP**CH2**

APEFLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTQVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN  
 AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKQKVSNKGLPSSIEKTISKAK

**CH3**

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTQLVKGFYPSDI AVEWESNGOPENNYKTTPP  
 VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Tabla 22: Constructo de Her2 - espaciador corto (SEQ ID NO: 54)

GMCSFss-Her2scFv-bisagra de IgG4-CD28tm-41BB-Zeta-T2A-EGFRt

5 Líder

Her2scFV

10

## Espaciador de bisagra

Gagagcua~~gttac~~gaccggccctgc~~cccccc~~ttggccct

CD28tm

卷之三

CDR zeta

124

TECHNIQUE

**Tabla 23**

## Constructo de Her2 - espaciador intermedio (SEQ ID NO: 55)

5

## Líder

Her2scFv

## 10 Espaciador de bisagra

GagagcaagfacggaecgcctgcccccttgcctGccagcclagaguaccccagggtfacaccctgcctcccgccagga  
agagatgaccaagaaccaggiglccctgacelgcctggtaaaggcttcatacccccagcgatafegccgtggaafigggagagcaac  
ggccagcccgagaacaactacaagaccaccccccrttgtggacagcgcacggcagcttcctgtaciicggctgaccgtgg  
acaagagcengtggcagguaggcaacgtttcsgctgcagegtgtatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtcce  
tgagccctgagccctggcgaug

CD2810

A *targeted effect* or *targeted effect modifier* is a covariate that changes the effect size of a specific treatment.

LITER

ANSWER

Cgggtaaaggttcagcagaaggccgcacgccttgcaccaggcaggccatcgatgtacaacgagctgaaccggcagg  
aaggaaaggatcgacgttcgtataagcggagggccggaccctgagatggcggcaagcctcggcggaaagaaccccc  
gaaggccgtataaactgcagaaaacauagatggcggaggccatcageyagatcgatgtcaagggcgagcggagg  
gcaaggccacgacggccgtatcaggccgttcaccgccaccaaggatacc tacgacgcctgcacatgcaggccctgc  
caagg

三

*Ctenomys rionegrensis* was first described as a subspecies of *Ctenomys apereoides* by a German naturalist, Johann Christian Daniel von Schreber, in 1776.

(continuación)

DEGER

Tabla 24

5

### Constructo de Her2 - espaciador largo (SEQ ID NO: 56)

Líder

Atgttttcctggtgacaaggcccttgcgttgtgatttaccacaccca

Her2scFV

19

### Espaciador largo

(continuación)

CD28tm

4133

aaacggggca gaaagaaaactctgtatataatccaaacaaccatttatgagaccaggatcaaactactcaagaggaa gatggctgtatc  
ggc gatttccca gaa gaa gaa gaa gggatgt gaa actcg

### CD3zeta

Cgggtgaaggttcagcagaagcgccgacgcccctgtctaccagcaggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctggcagg  
aaggaaaggtacgacgttcgtataaggcggagggcggaccctgagatggccggcaagccctggcggaaagaaccccccag  
gaaggccgtgtataacguactgcagaagacaagaatggccgaggcciacagcggatcggtatgaaaggccgagcggaggcgg  
gcaaggccacgacggccgtatcaggccgttccaccgccaccaaggataacctacgacgccccgtcacatgcaggccctgcccc  
caagg

734

Ctcgaggcccccggcaagggcaaaatggatcgtttctaaatgcgggtacgtggggagaatccccggcccttgg

REGFR

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de receptor químérico que comprende:

- 5 a) un dominio de unión a ligando, en el que el dominio de unión a ligando se une a un ligando, en el que el dominio de unión a ligando es un fragmento variable de cadena sencilla que se une específicamente a CD19 y en el que el dominio de unión a ligando comprende la secuencia de aminoácidos:  
 DIQMTQTTSSLASALGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS  
 NLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG  
 10 VSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYG  
 GSYAMDYWGQGTSTVSS;  
 b) un espaciador de una longitud que es específica para el ligando, en el que el espaciador proporciona proliferación de células T y/o producción de citocinas aumentadas en respuesta al ligando cuando se compara con un receptor químérico de referencia, en el que el espaciador tiene una longitud de 15 aminoácidos o menos y comprende la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPCP;  
 15 c) un dominio transmembrana, en el que el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos: MFWVLLVVVGGLACYSLLVTVAFHFWV de un dominio transmembrana de CD28; y  
 d) un dominio de señalización intracelular, en el que el dominio de señalización intracelular comprende el dominio de señalización de CD3 zeta y el dominio de señalización de 4-1BB, en el que el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos:

KRGRKKLLYIFKQPMPRVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ  
 NQLYNELNLGRREEYDVLKDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  
 GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR.

2. El receptor químérico de la reivindicación 1, en el que el espaciador tiene una longitud de 12 aminoácidos.

- 25 3. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de receptor químérico aislado que codifica para un polipéptido de receptor químérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el vector de expresión es un vector de virus del simio 40, un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado (VAA), un vector lentiviral o un vector retroviral.

- 30 4. El vector de expresión de la reivindicación 3, que comprende además un polinucleótido que codifica para una secuencia marcadora; opcionalmente en el que la secuencia marcadora es un receptor de factor de crecimiento epidérmico truncado que tiene la secuencia de aminoácidos:

MLLLVTSLLLCELPHAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSISGDLHILPV  
 AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEHRGRTKQHGQF  
 SLAVVSLNITSGLRSLKEISGDVIBSGNKNL CYANTINWKLLFGTSGQKTKIISNRGENS  
 CKATOQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQ  
 CHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGH  
 VCHLCHPNCTYGCTGPGCLEGCPTNGPKIPSIA TGMVGALLLLVVALGIGLFM.

- 35 5. El vector de expresión de la reivindicación 4, en el que el polinucleótido que codifica para la secuencia marcadora está operativamente unido a un polinucleótido que codifica para una secuencia de ligador; opcionalmente en el que la secuencia de ligador es una secuencia de ligador escindible T2A que comprende la secuencia de aminoácidos LEGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR.

- 40 6. El vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que el vector de expresión codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos:

MLLLVTSLLLCELPHAFLLIPDIQMKTQTTSSLSASLGDRVТИSCRASQDISKYLNWYQQK  
 PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG  
 GTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVS  
 WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC  
 AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKEYGPPCPPCMFWVLVVVGVLACYSLLVT  
 VAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA  
 PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKDERRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDM  
 AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLT  
 CGDVEENPGPRMILLVTSLLLCELPHAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKN  
 TSISGDLHILPVAFRGDSFTHPPLDPQELDILKTVEITGFLIQAWPENRTDLHAFENLEI  
 IRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQ  
 KTKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGE  
 PREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNT  
 LVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIAATGMVGALLL.LVVALGI  
 GLFM.

7. Una célula huésped que comprende un polipéptido de receptor quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o un vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6.

5 8. La célula huésped de la reivindicación 7, en la que la célula huésped es una célula T autóloga o alogénica.

9. La célula huésped de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que la célula huésped es una célula T expandida, opcionalmente en la que la célula T es expandida *in vitro*.

10 10. La célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que la célula huésped es un linfocito transformado o transducido.

15 11. La célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en la que la célula huésped es una célula de linfocito T citotóxico CD8+.

12. La célula huésped de la reivindicación 11, en la que la célula de linfocito T citotóxico CD8+ se selecciona del grupo que consiste en células T CD8+ vírgenes, células T CD8+ de memoria central, células T CD8+ de memoria efectora y células T CD8+ a granel.

20 13. La célula huésped de la reivindicación 12, en la que la célula T de memoria central es positiva para CD45RO+, CD62L+ y CD8+.

25 14. La célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en la que la célula huésped es una célula de linfocito T cooperador CD4+.

15. La célula huésped de la reivindicación 14, en la que la célula de linfocito T cooperador CD4+ se selecciona del grupo que consiste en células T CD4+ vírgenes, células T CD4+ de memoria central, células T CD4+ de memoria efectora y células T CD4+ a granel.

30 16. La célula huésped de la reivindicación 15, en la que la célula T CD4+ virgen es positiva para CD45RA+, CD62L+ y CD4+ y negativa para CD45RO.

35 17. Una composición que comprende una célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 7-16 en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

18. La composición de la reivindicación 17, que comprende una célula huésped de célula T CD4+ y/o una célula huésped de célula T CD8+.

40 19. La composición de la reivindicación 17, que comprende la célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones

11-13 y la célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16.

20. La composición de la reivindicación 17, que comprende una preparación celular que tiene la célula de linfocito T citotóxico CD8+ de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13 y/o una preparación celular que tiene la célula de linfocito T cooperador CD4+ de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16.
- 5      21. Una célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 7-16 o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 17-20 para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 10     22. La célula huésped o la composición para su uso según la reivindicación 21, en la que el cáncer es un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica.
- 15     23. La célula huésped o la composición para su uso según la reivindicación 21 o la reivindicación 22, que comprende administrar una preparación celular que comprende la célula de linfocito T citotóxico CD8+ de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13 y administrar una preparación celular que comprende la célula de linfocito T cooperador CD4+ de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16.
- 20     24. La célula huésped o la composición para su uso según la reivindicación 23, en la que se coadministran la preparación celular que comprende la célula de linfocito T citotóxico CD8+ de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13 y la preparación celular que comprende la célula de linfocito T cooperador CD4+ de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16.

Figura 1

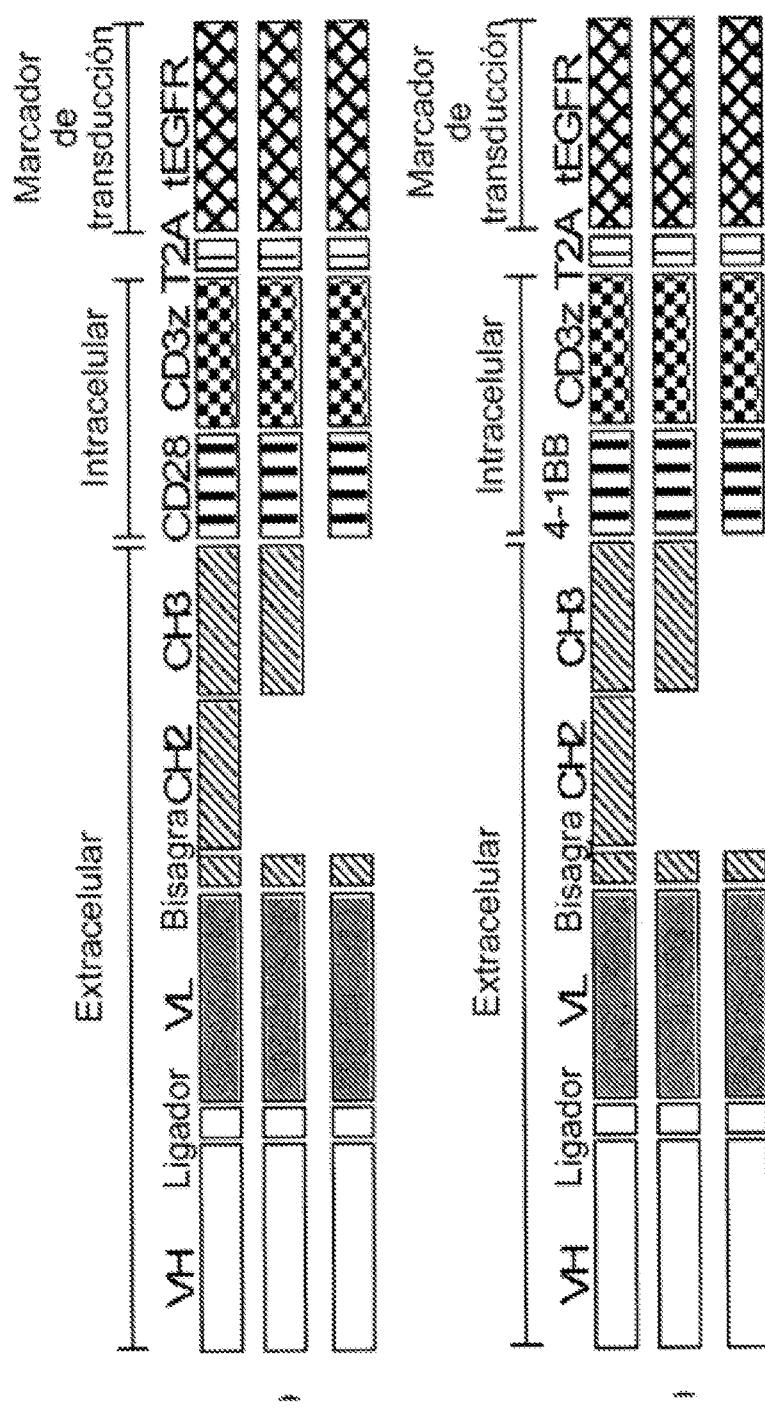


Figura 2

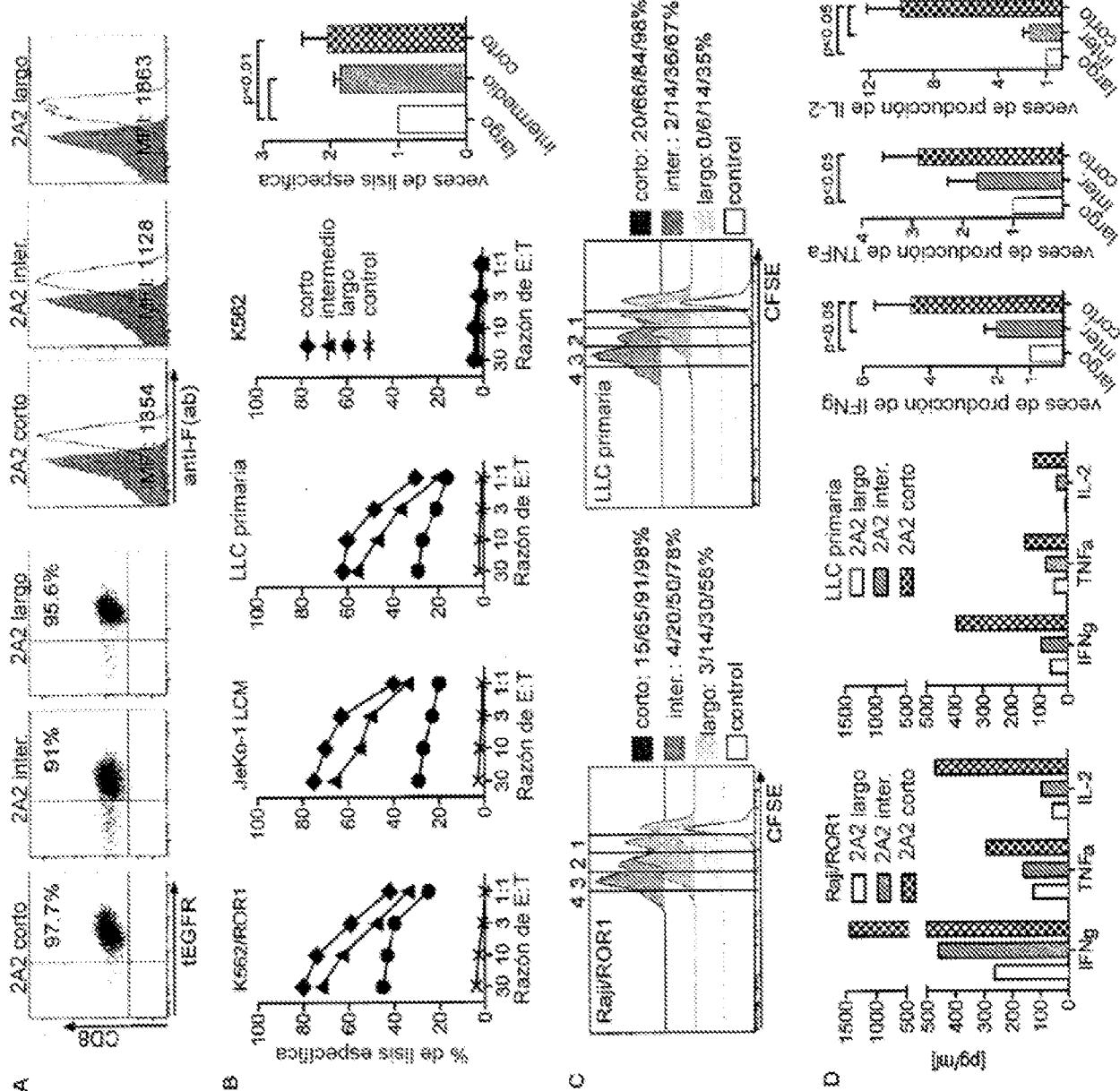


Figura 3

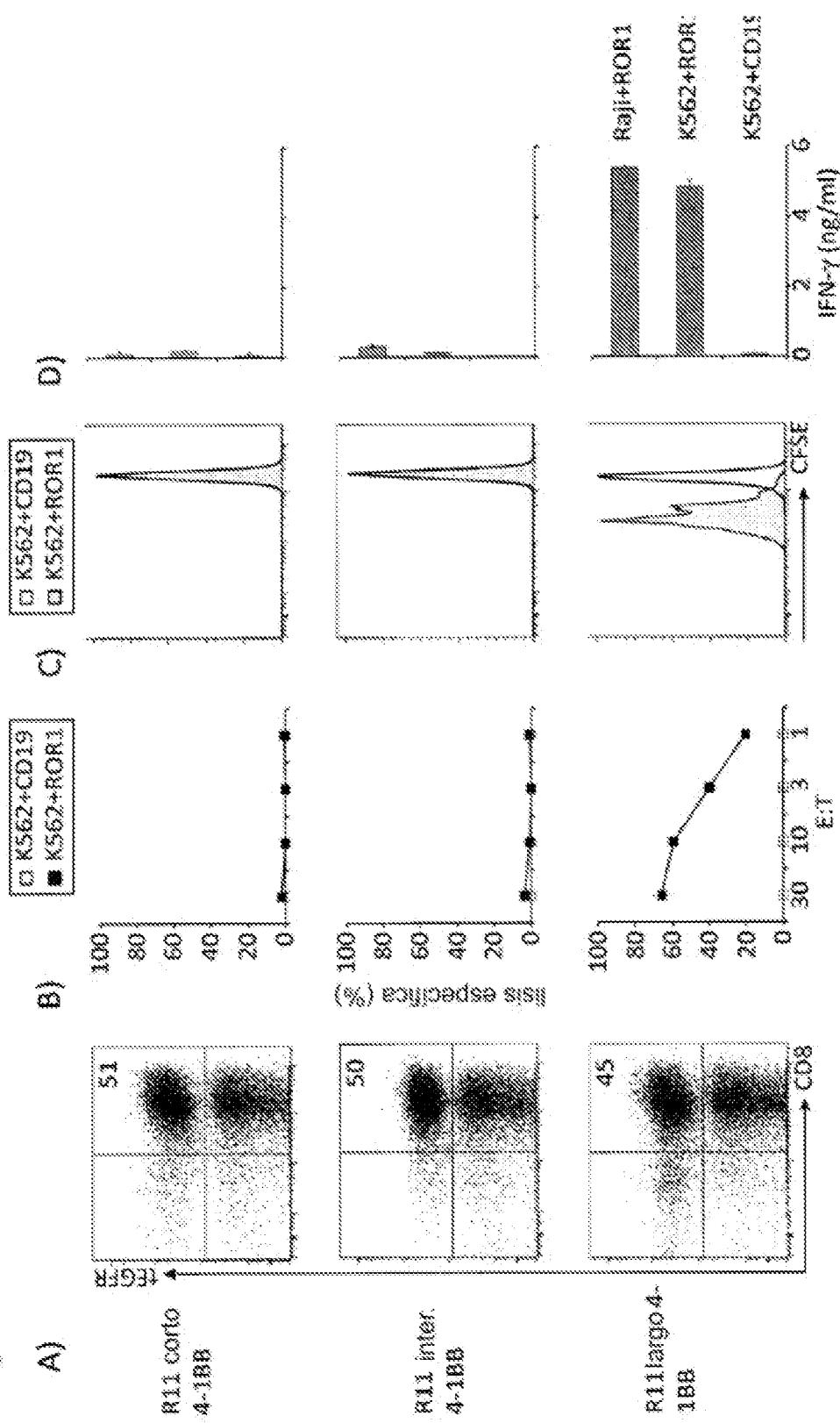


Figura 4

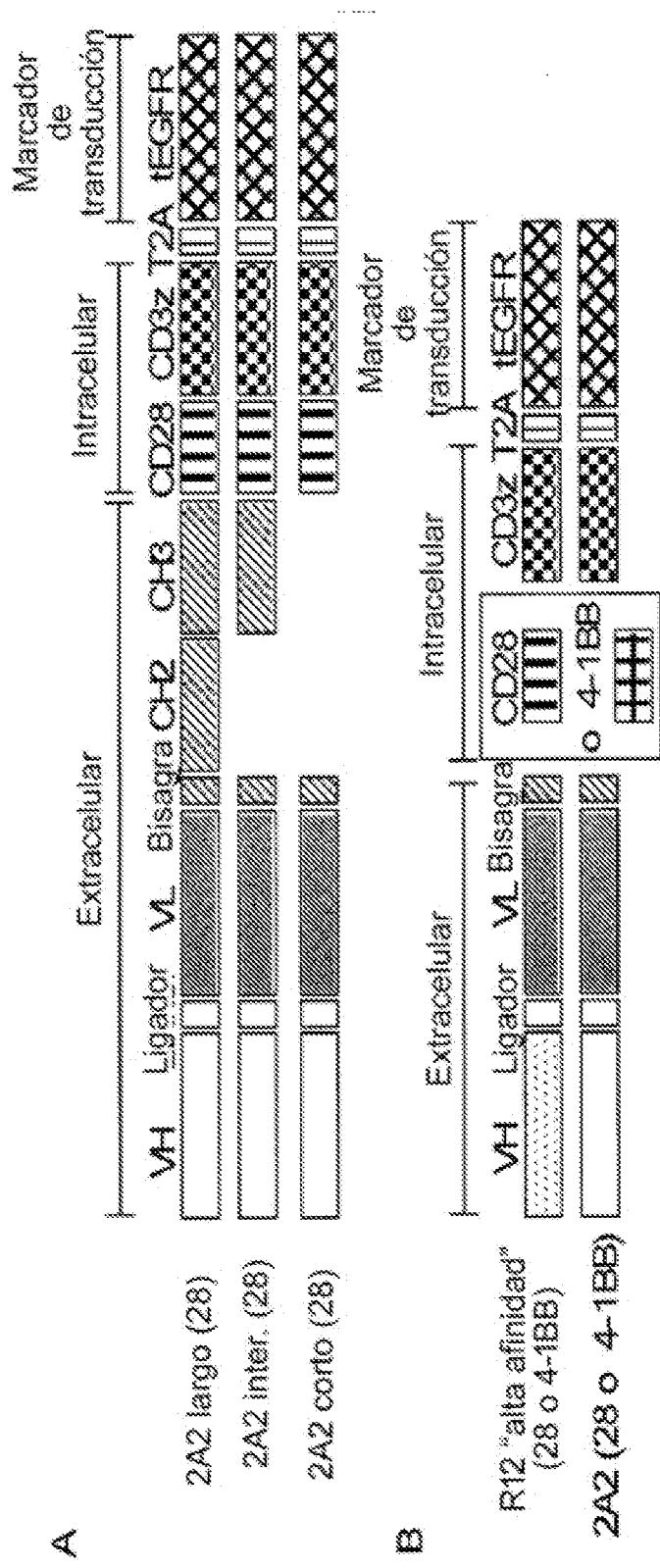


Figura 5

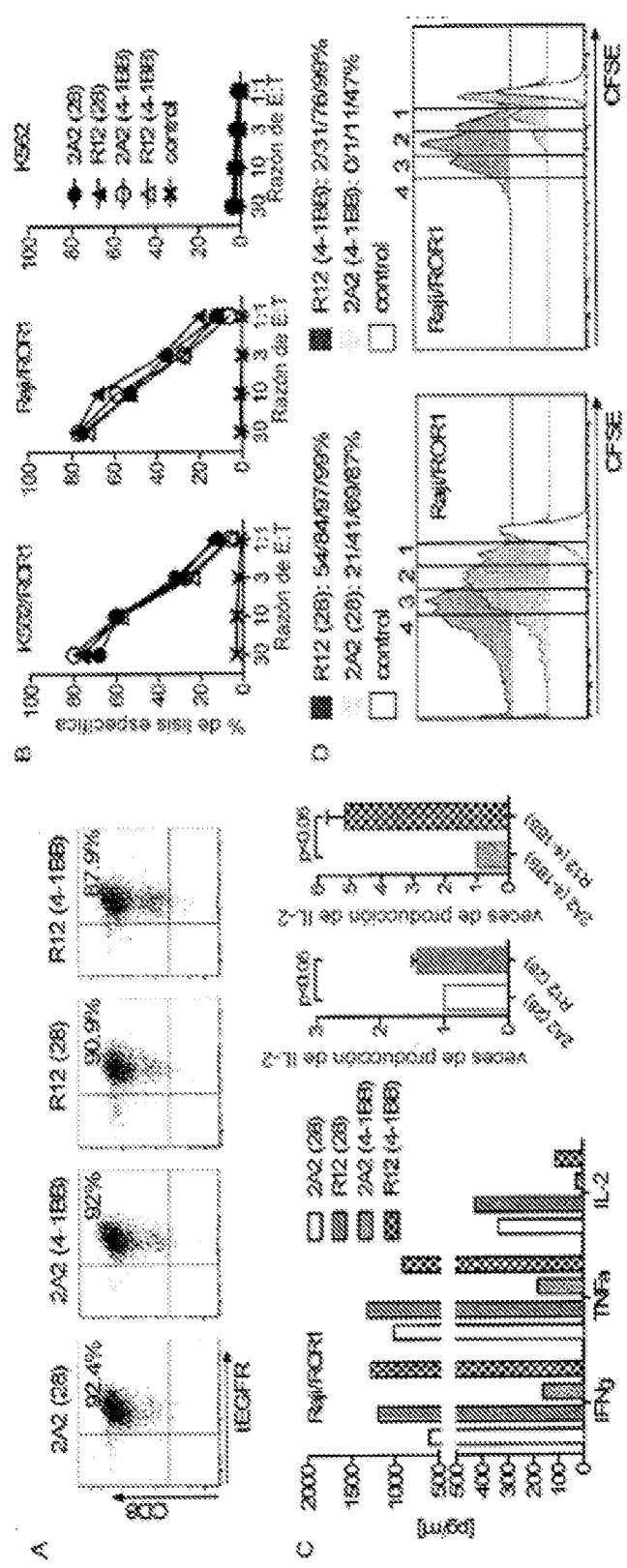
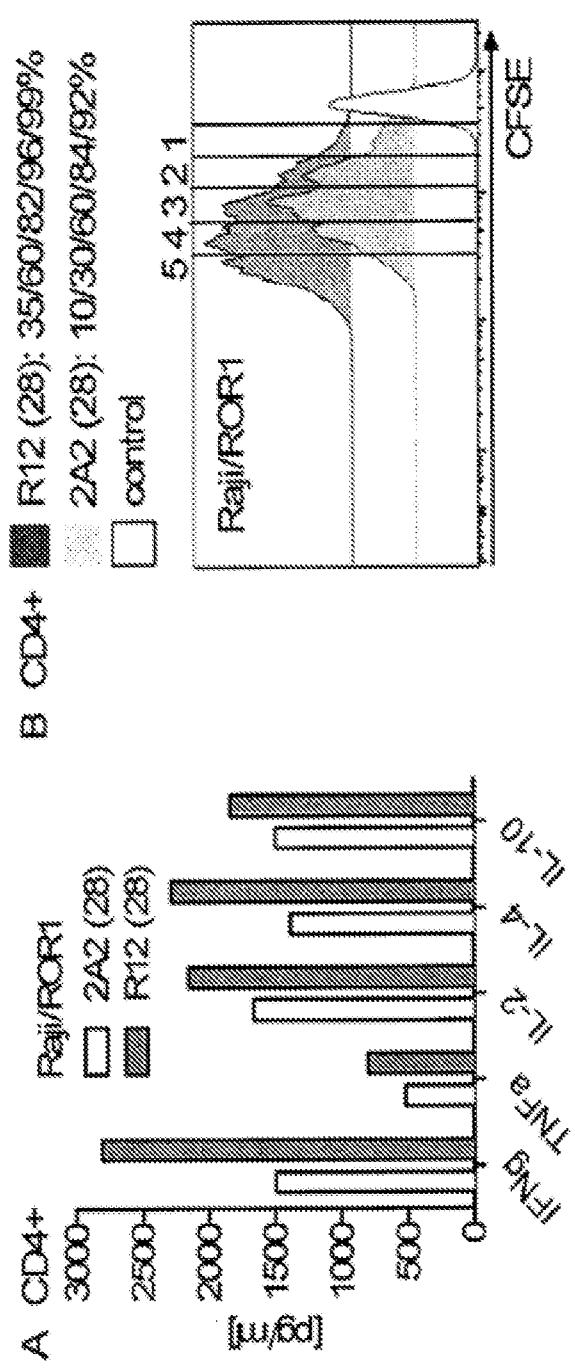


Figura 6



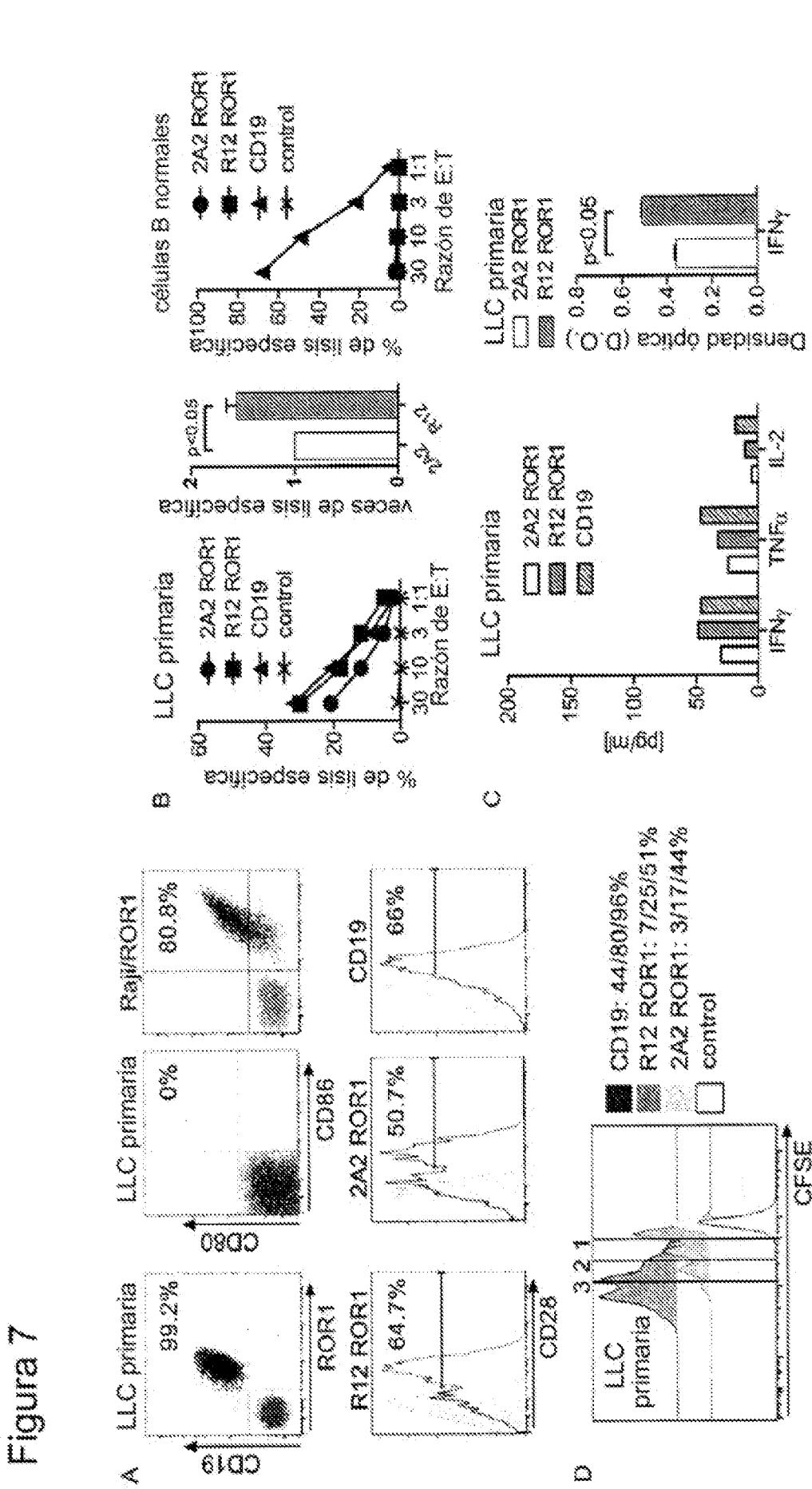


Figure 8

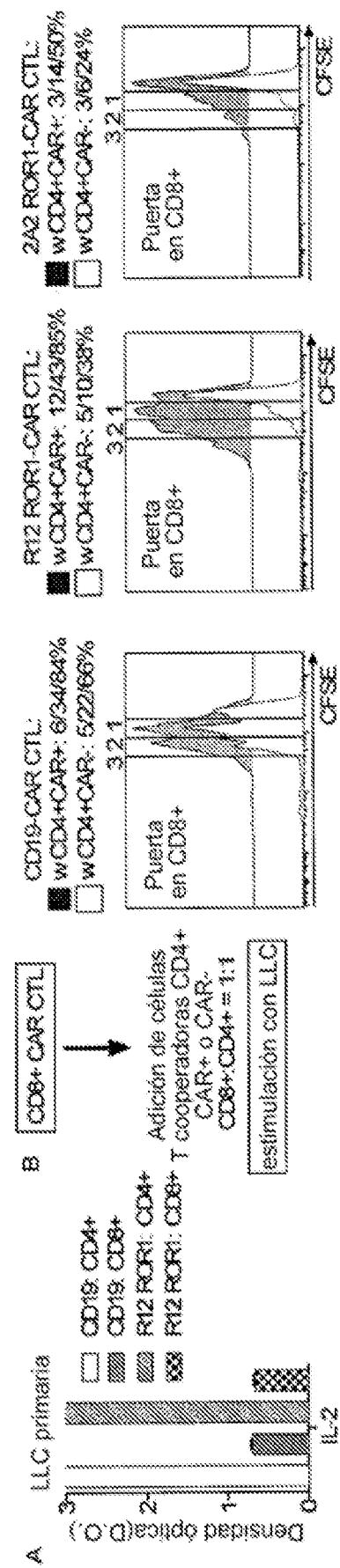


Figura 9

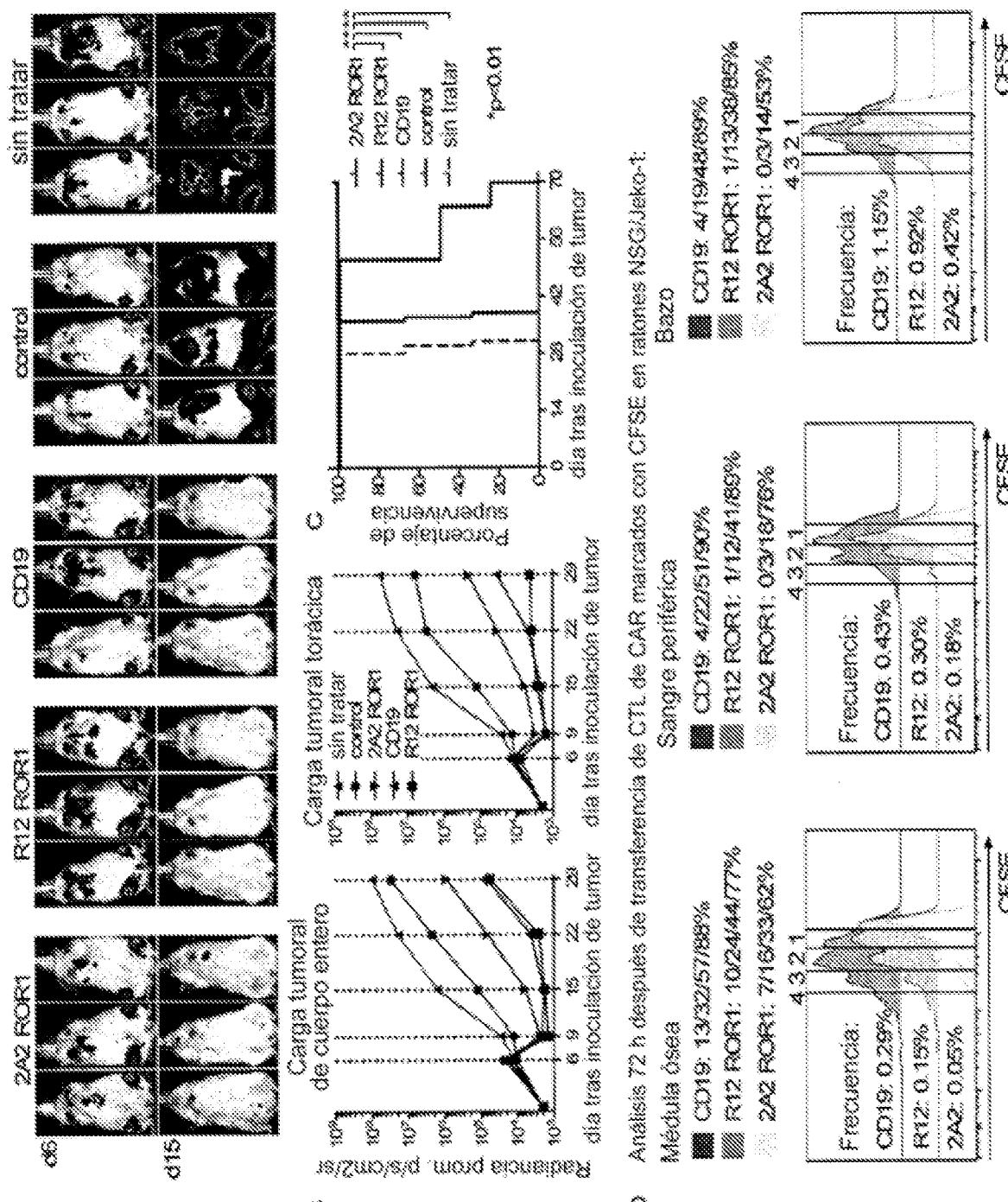
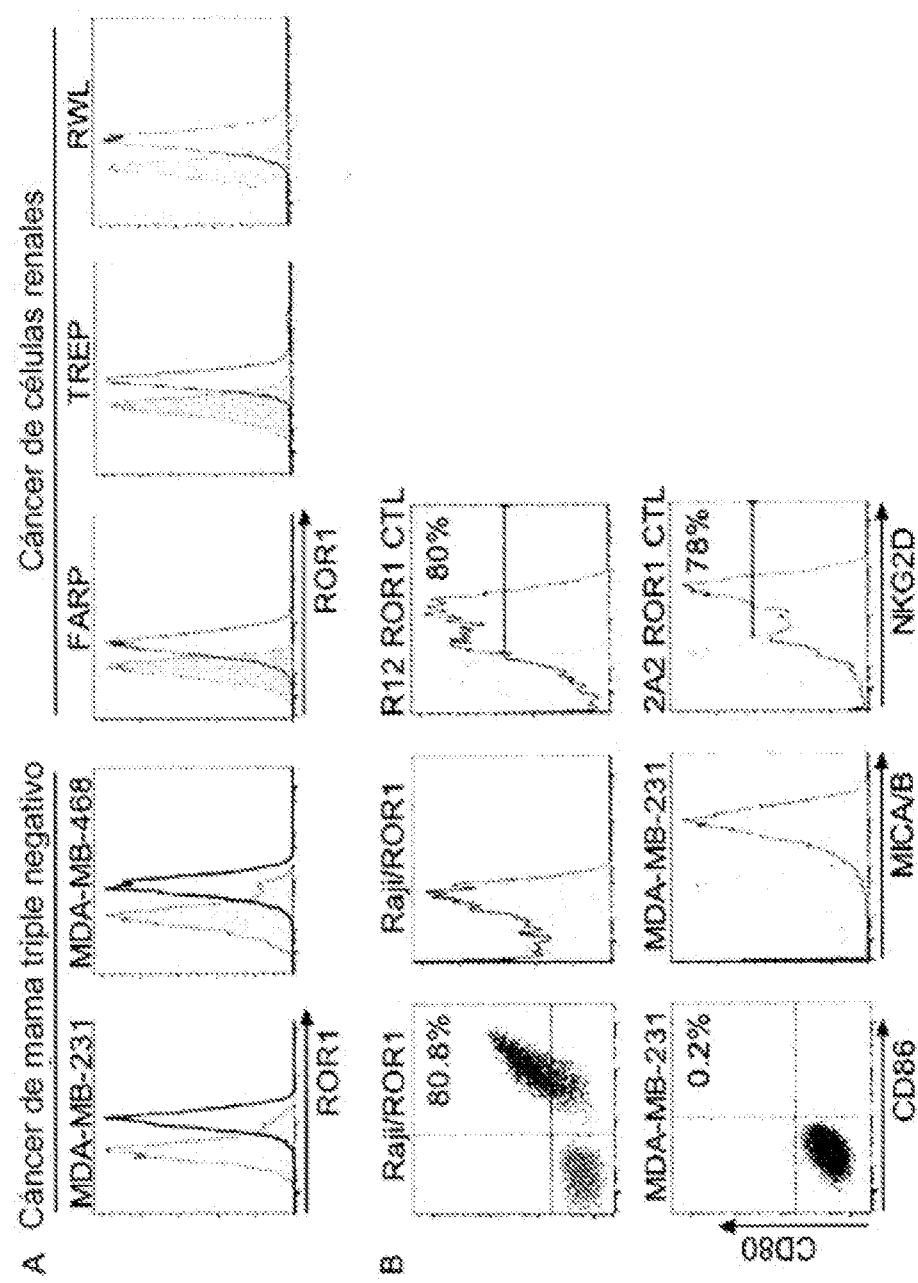


Figura 10



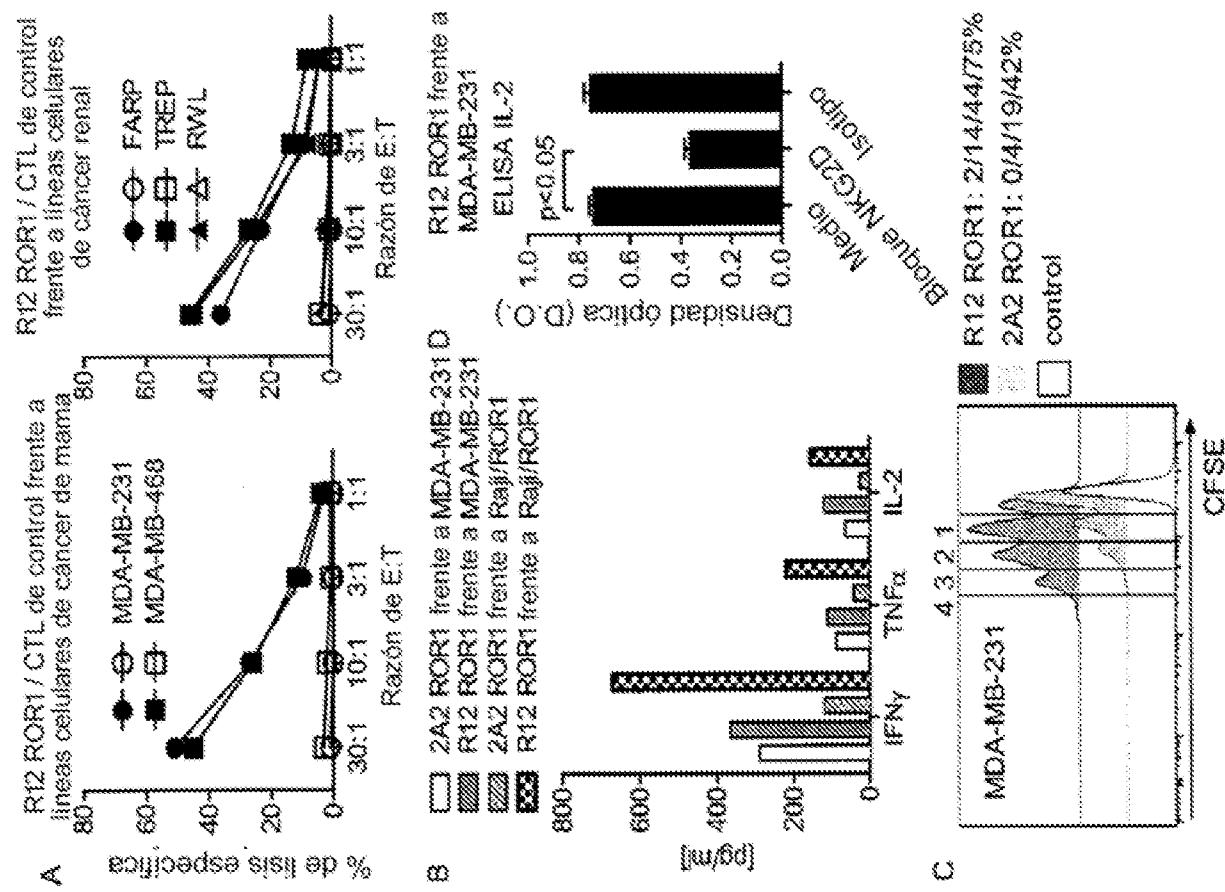
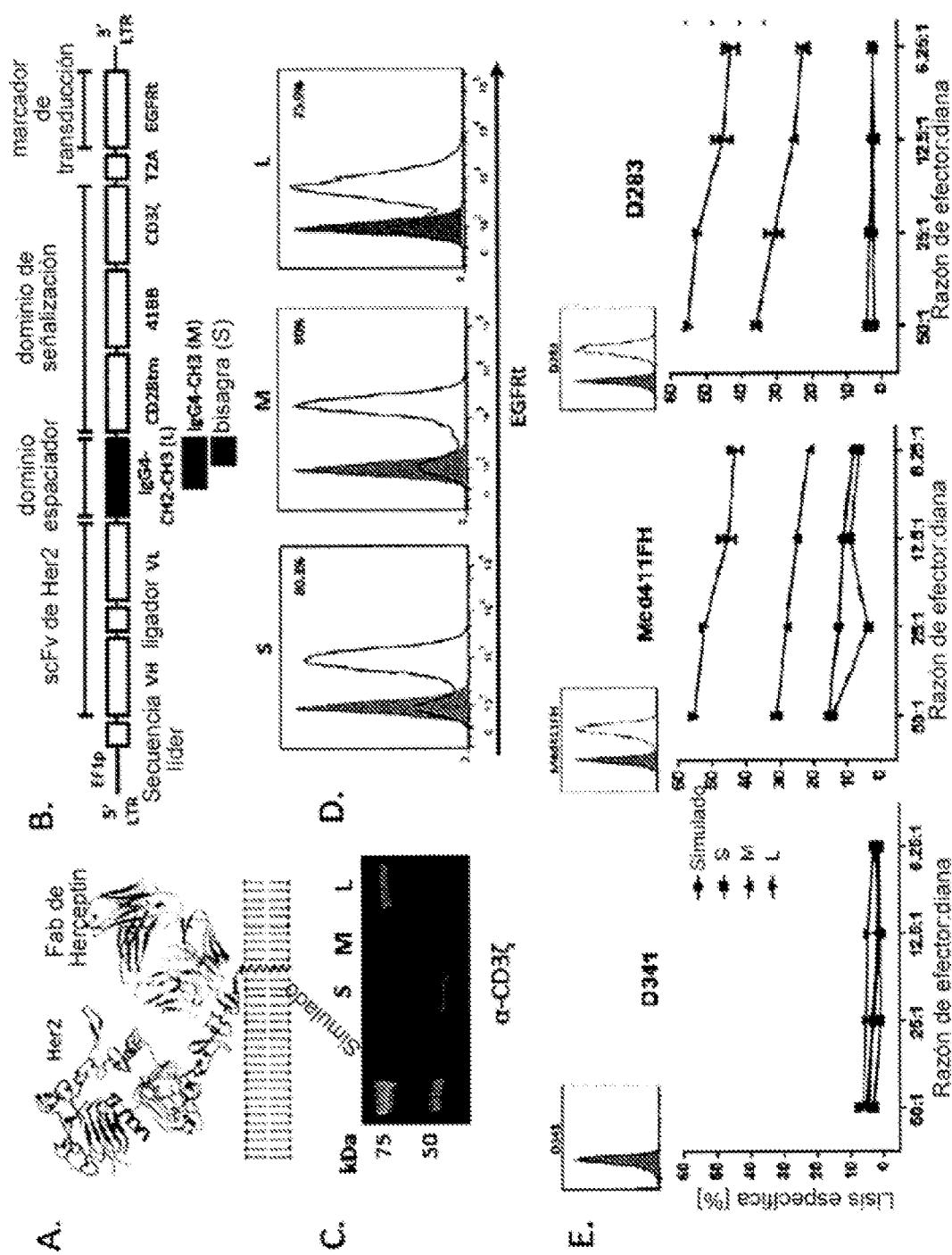
**Figura 11**

Figura 12



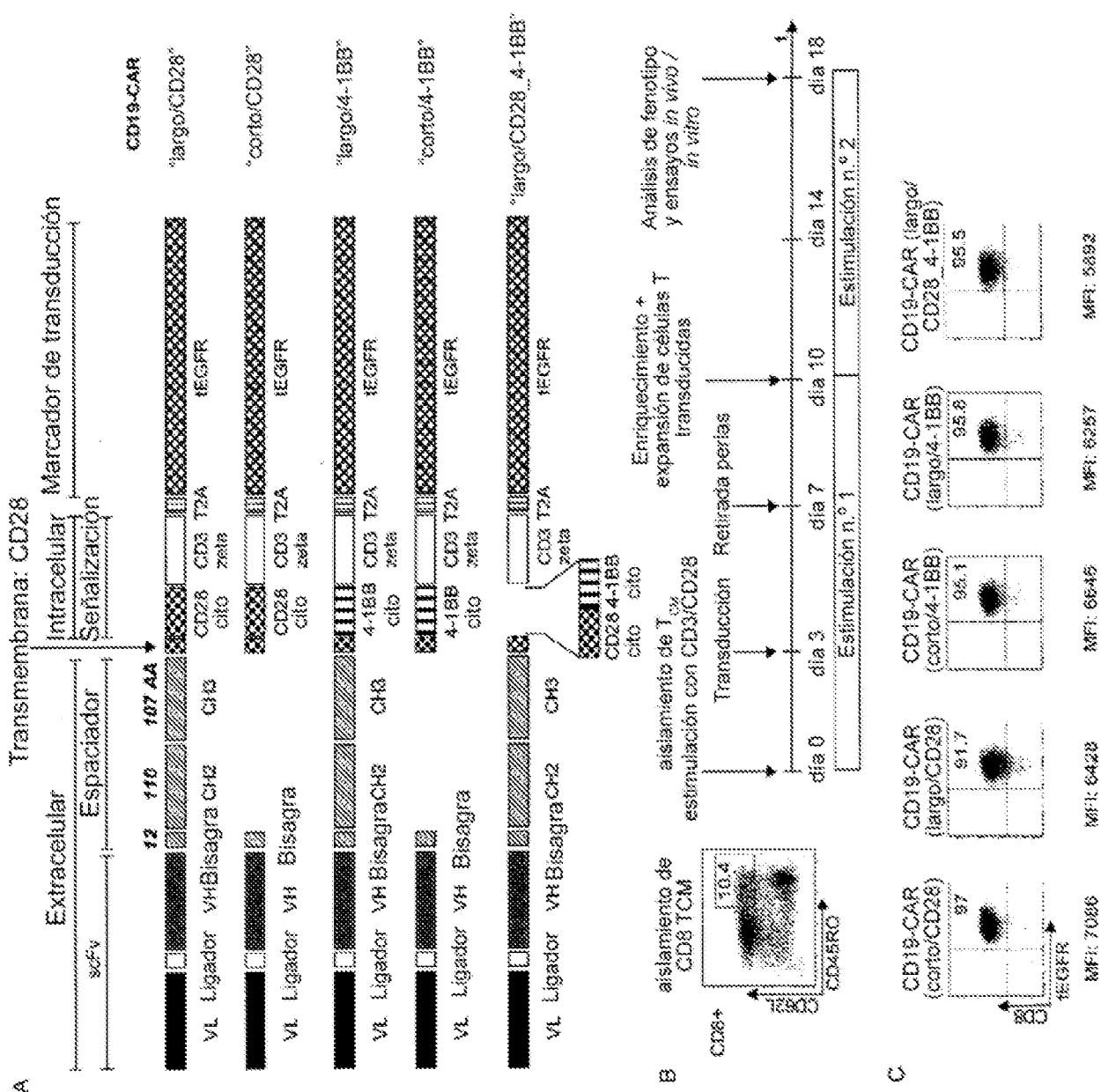
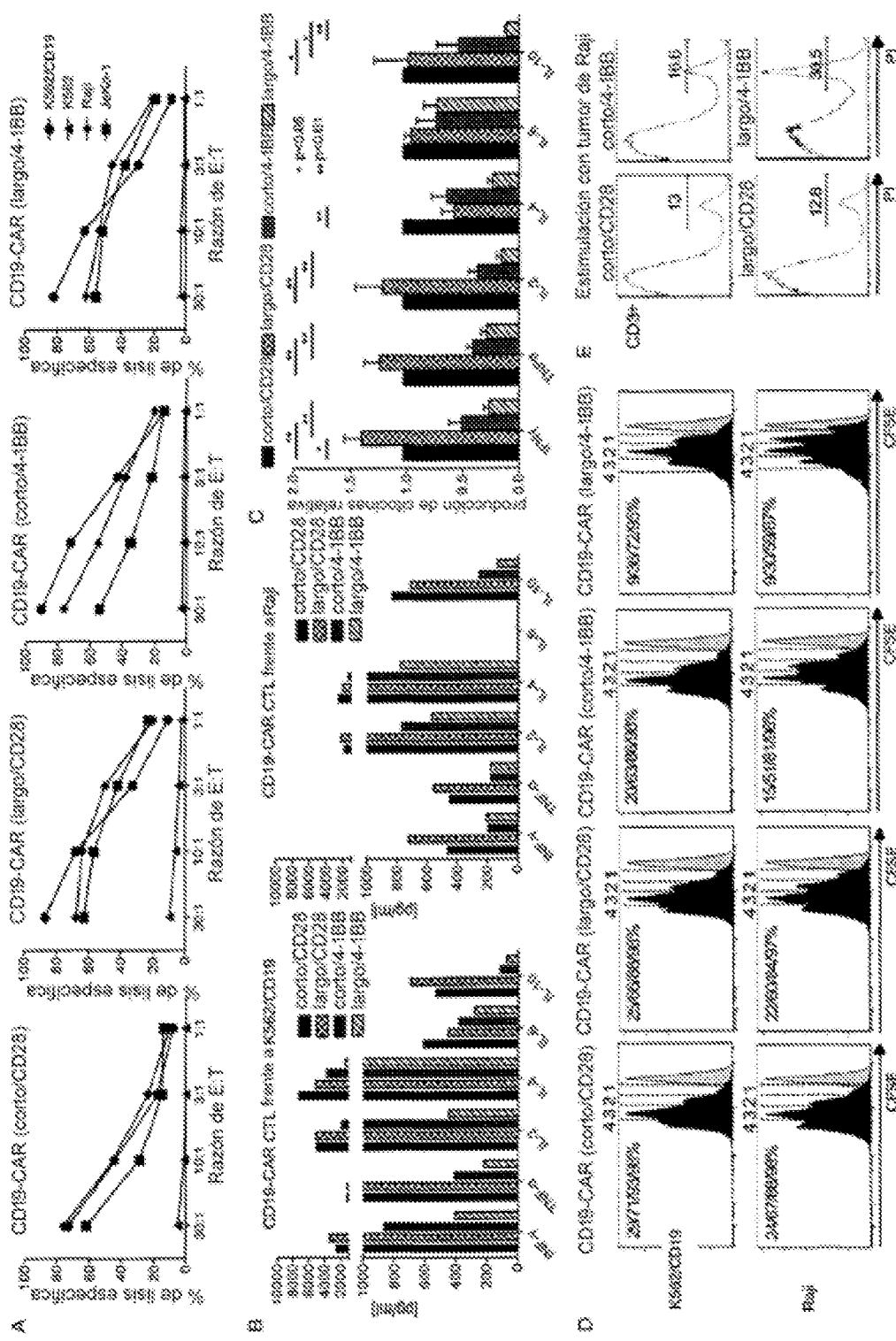
**Figura 13**

Figura 14



ES 3 015 267 T3

Figura 15

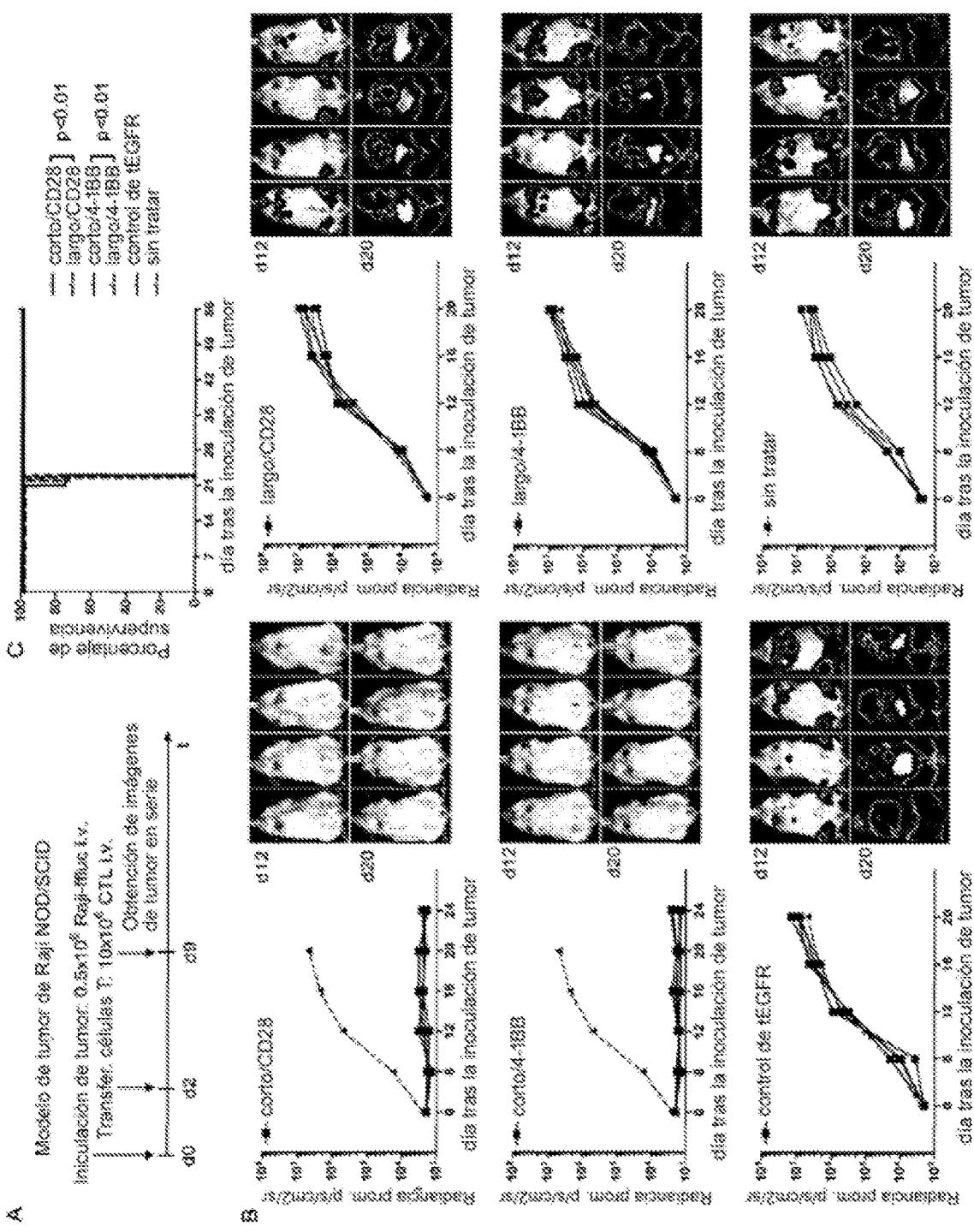


Figura 16

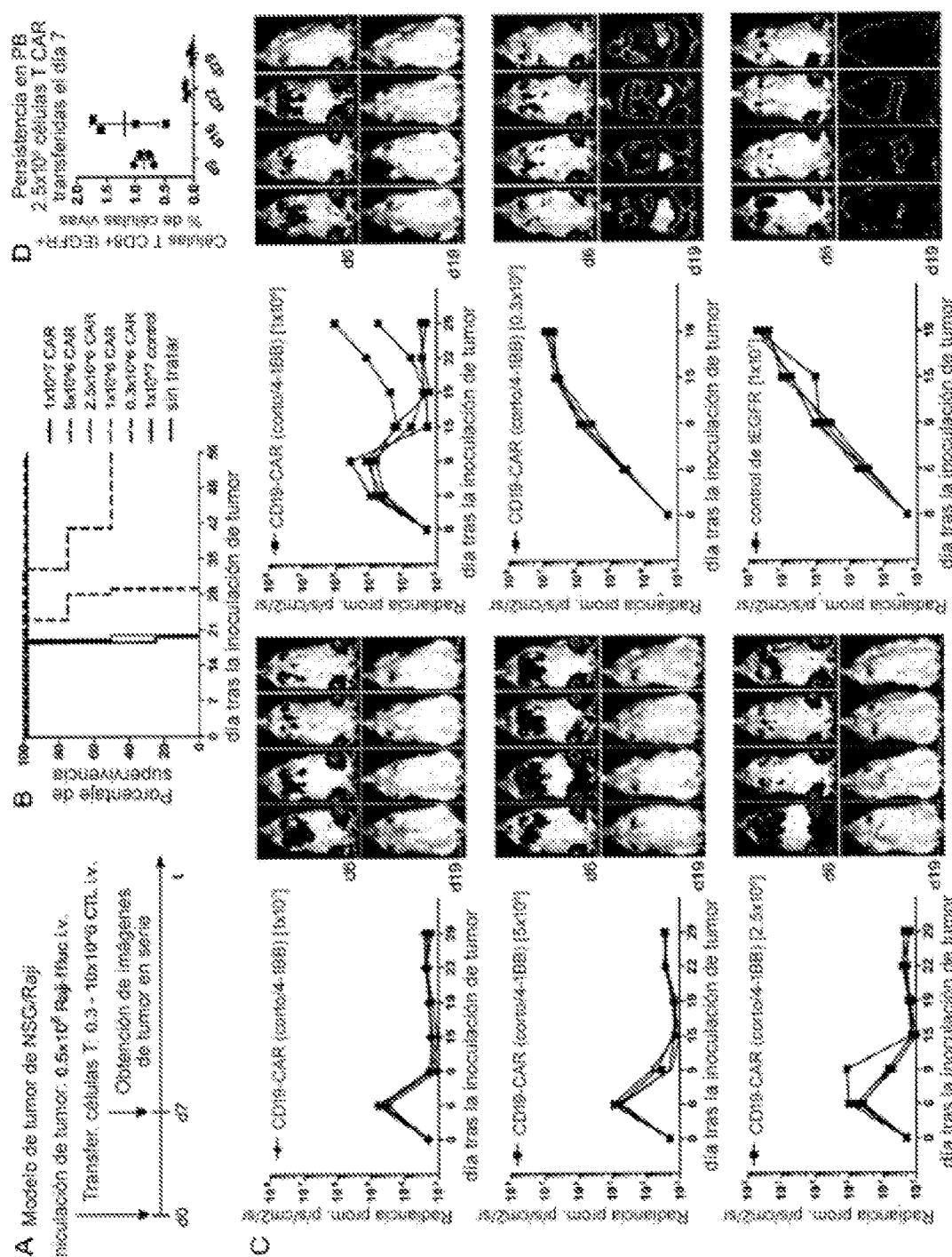
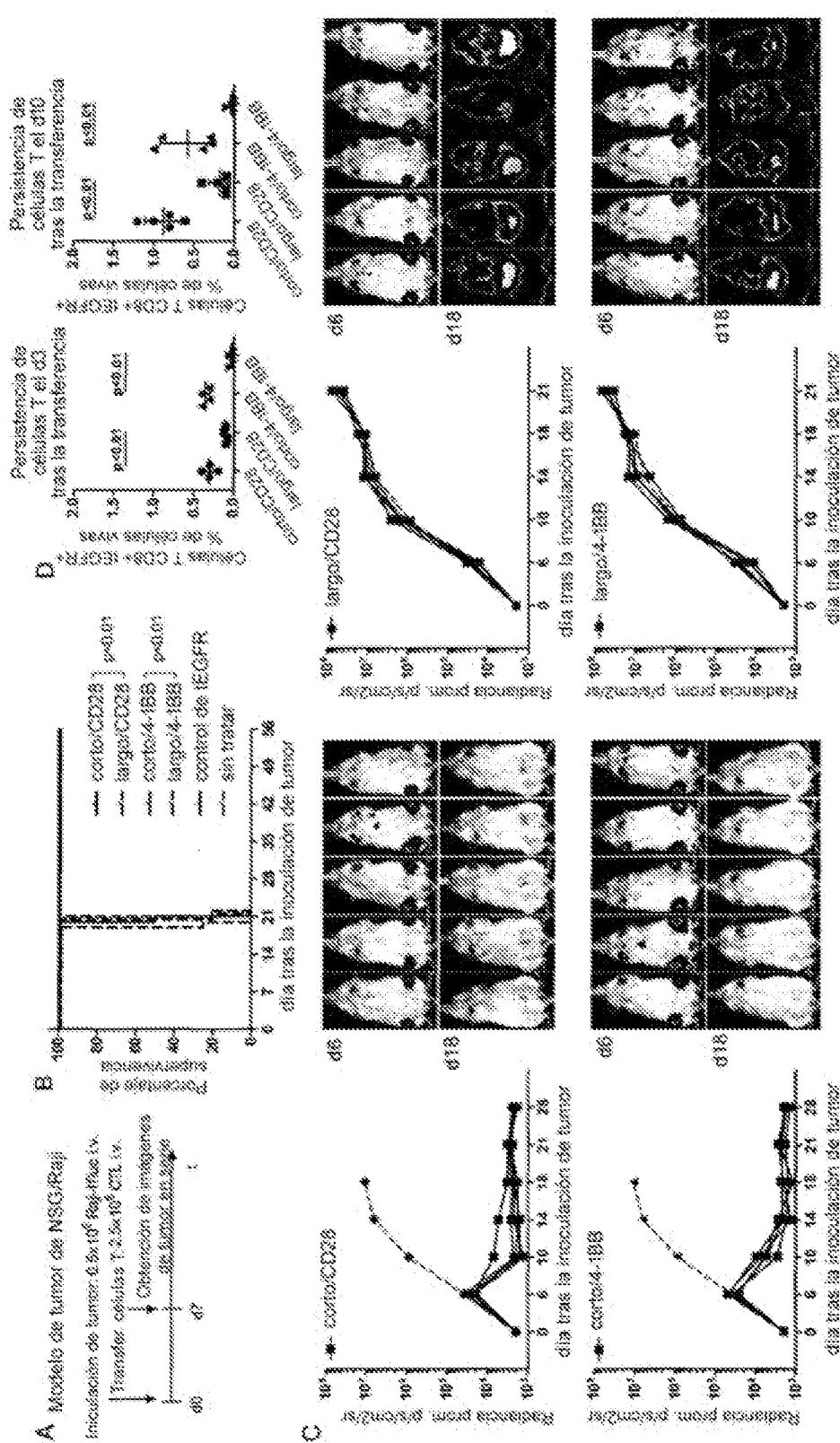
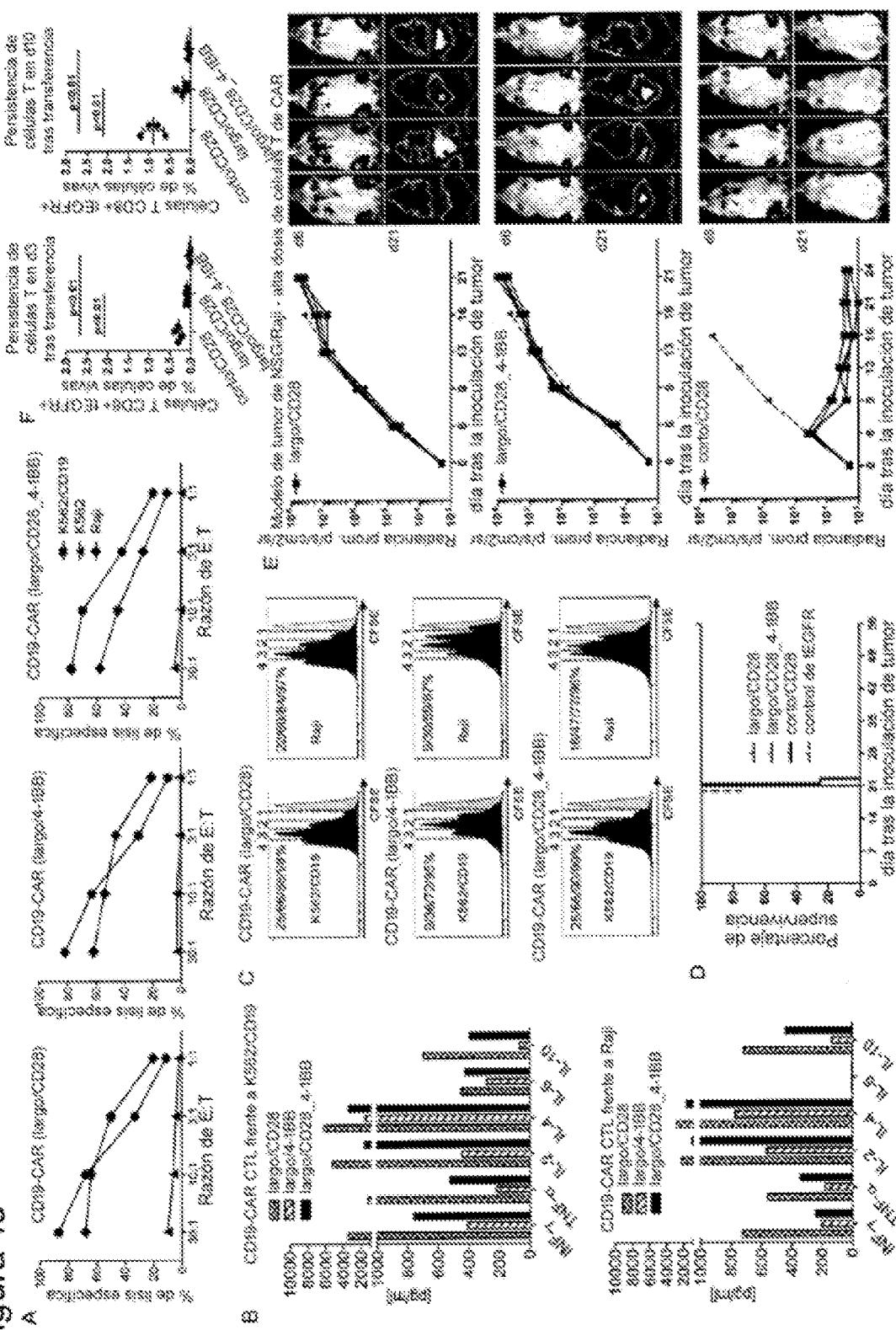


Figura 17

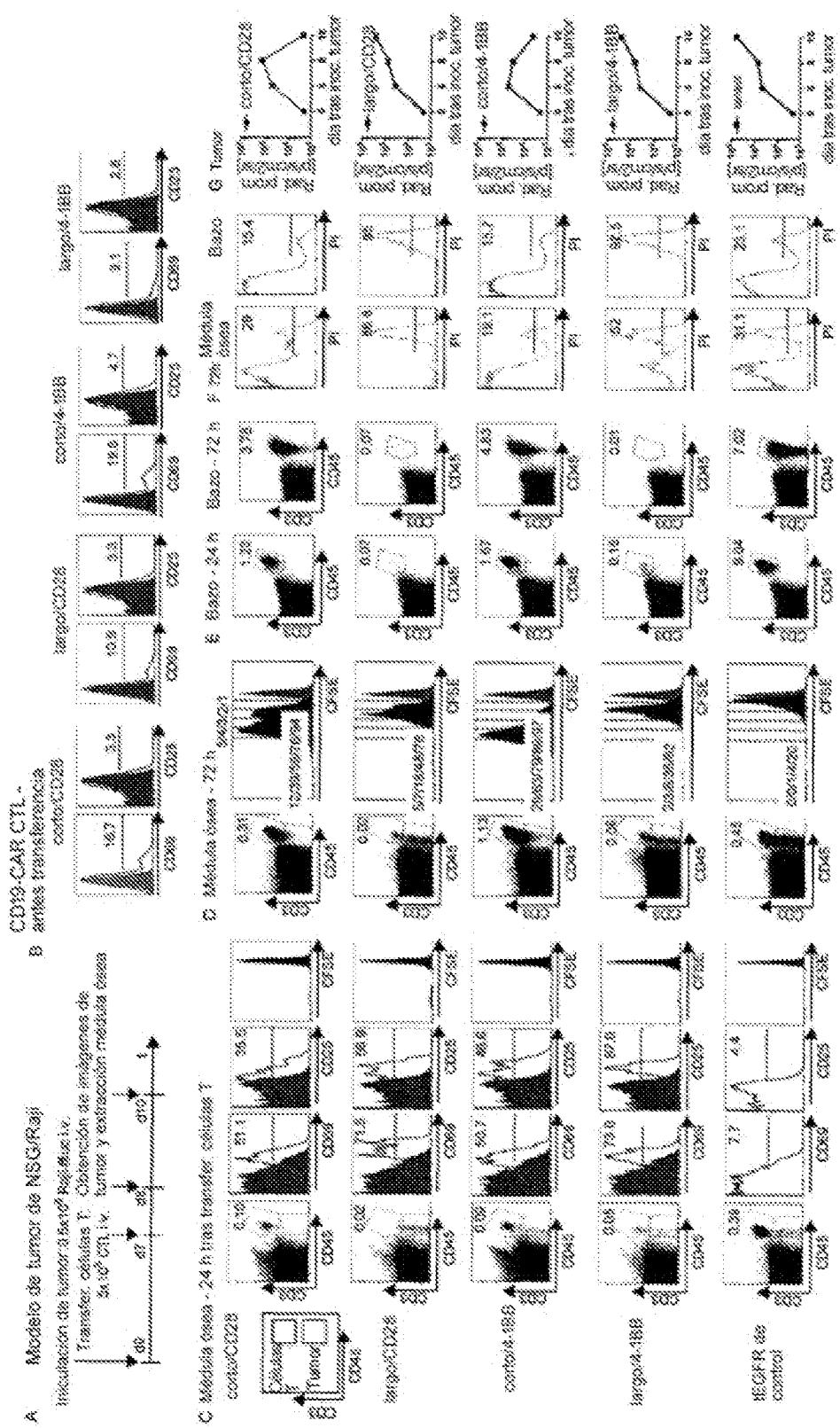


**Figure 18**



ES 3 015 267 T3

Figure 18



**Chiotoxicidad - ensayo de liberación de cromo      Análisis de citocinas (ELISA) Figura 20**

