

RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS QUE SE DIRIGEN A FLT3

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/514,634, presentada el 2 de junio de 2017, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

El contenido de las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 62/514,574, presentada el 2 de junio de 2017 y 62/660,908, presentada el 20 de abril de 2018 y una solicitud PCT denominada
10 “ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA FLT3 Y SUS USOS” [ANTIBODIES SPECIFIC FOR FLT3 AND THEIR USES], presentada el 31 de mayo de 2018, las cuales describen anticuerpos específicos para FLT3, se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

15 La presente solicitud se presenta de forma electrónica a través de EFS-Web e incluye un listado de secuencias emitido de forma electrónica en formato .txt. El archivo .txt contiene un listado de secuencias titulado ALGN_010_01WO_SeqList_ST25.txt”, creado el 24 de mayo de 2018, con un tamaño de 238 KB. El listado de secuencias contenido en este archivo .txt es parte de la memoria
20 descriptiva y se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

CAMPO

Se proporcionan en la presente anticuerpos específicos para la tirosina cinasa 3 similar a Fms
25 (FLT3), receptores de antígenos quiméricos (CAR, por sus siglas en inglés) que se unen específicamente a FLT3 (FLT3 CAR), polinucleótidos que codifican FLT3 CAR y células inmunitarias modificadas que comprenden los CAR específicos para FLT3 (por ejemplo, linfocitos T con CAR específicos para FLT3). La invención también hace referencia a métodos para modificar células inmunitarias para la expresión de CAR específicos para FLT3 y métodos para
30 utilizar los anticuerpos específicos para FLT3 y linfocitos T con CAR específicos para FLT3 para el tratamiento de afecciones asociadas con FLT3 (por ejemplo, células malignas que expresan FLT3).

ANTECEDENTES

35

La transferencia adoptiva de células inmunitarias modificadas genéticamente para reconocer antígenos asociados con neoplasias malignas ha demostrado ser prometedora como nuevo abordaje para el tratamiento del cáncer (ver, por ejemplo, Brenner et ál., *Current Opinion in Immunology*, 22(2): 251-257 (2010); Rosenberg et ál., *Nature Reviews Cancer*, 8(4): 299-308 (2008)). Los linfocitos T pueden modificarse genéticamente para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR), proteínas de fusión compuestas por un resto de reconocimiento de antígenos y dominios de activación de linfocitos T (ver, por ejemplo, Eshhar et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(2): 720-724 (1993) y Sadelain et ál., *Curr. Opin. Immunol*, 21(2): 215-223 (2009)).

FLT3 es un antígeno objetivo de leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés), se sobreexpresa en blastos de pacientes con AML en comparación con células saludables, y se expresa en la mayoría de las células de los pacientes (Carow et ál., 2 de febrero de 1996. *Blood*: 87(3); Birg et ál. Nov 1992 *Blood*: 80(10)). FLT3 es un gen frecuentemente mutado en pacientes con AML, y las mutaciones están asociadas con un pronóstico desfavorable (Abu-Duhier et ál. *Br J Haematol*. 2000 Oct;111(1):190-5, Yamamoto et ál. 15 de abril de 2001; *Blood*: 97 (8)). Los inhibidores de FLT3 de molécula pequeña han demostrado actividad en ensayos clínicos; sin embargo, las respuestas son normalmente transitorias debido a la adquisición de resistencia. Además, los inhibidores de cinasa tratan solamente a un porcentaje de pacientes que expresan la forma mutada de FLT3, lo que resalta la necesidad urgente de terapias mejoradas.

Por consiguiente, son necesarios tratamientos alternativos para el cáncer y, en particular, neoplasias malignas que implican la expresión anómala de FLT3. Se proporcionan en la presente métodos y composiciones dirigidos a esta necesidad.

COMPENDIO

Se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a la tirosina cinasa 3 similar a Fms (FLT3), receptores de antígenos quiméricos (CAR) que se unen específicamente a FLT3 y células inmunitarias modificadas que expresan dichos CAR (por ejemplo, linfocitos T con CAR específicos para FLT3). También se proporciona la confección de dichos anticuerpos, CAR y células inmunitarias. Se proporciona además el uso de dichos anticuerpos, CAR y células inmunitarias modificadas, por ejemplo, para el tratamiento de una afección asociada con células malignas que expresan FLT3 (por ejemplo, cáncer). En un aspecto, se proporciona en la presente un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene cualquiera de las secuencias parciales de VH enumeradas en la Tabla 2 y/o una región variable de cadena ligera (VL) que tiene cualquiera de las secuencias parciales de VL

enumeradas en la Tabla 2.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad uno (CDR1), CDR2 y CDR3 enumeradas en la Tabla 3 y/o (b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 enumeradas en la Tabla 3.

También se proporcionan en la presente receptores de antígenos quiméricos (CAR) que se unen a FLT3. Se ha demostrado que la expresión de CAR específicos para FLT3 en linfocitos T es eficaz para la activación de los linfocitos T tras entrar en contacto con FLT3. Los CAR específicos para FLT3 proporcionados en la presente se unen a FLT3 humana y presentan una actividad citotóxica tras entrar en contacto con células que expresan FLT3.

Por consiguiente, en otro aspecto, se proporciona en la presente un receptor de antígenos quimérico (CAR) específico para FLT3 que comprende un dominio de unión al ligando extracelular, un primer dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, donde el dominio extracelular comprende un fragmento variable de cadena simple (scFv) que se une al dominio extracelular de FLT3. En algunas modalidades, se proporcionan en la presente CAR de FLT3 que comprenden un dominio de unión al ligando extracelular, un primer dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, donde el dominio extracelular comprende un scFv que se une a dominios particulares del objetivo de FLT3, por ejemplo, unión a la SEQ ID NO: 199 (Dominio 1), SEQ ID NO: 200 (Dominio 2), SEQ ID NO: 201 (Dominio 3), SEQ ID NO: 254 (Dominios 2-3), SEQ ID NO: 202 (Dominio 4) o SEQ ID NO: 203 (Dominio 5), SEQ ID NO: 254 (Dominios 2-3) o SEQ ID NO: 202 (Dominio 4).

En algunas modalidades, los CAR específicos para FLT3 comprenden un dominio extracelular que comprende un scFv, donde el scFv se une al Dominio 4 del objetivo de FLT3 (SEQ ID NO: 202).

En algunas modalidades, los CAR específicos para FLT3 comprenden un dominio extracelular que comprende un scFv, donde el scFv se une al Dominio 2 del objetivo de FLT3 (SEQ ID NO: 200).

El dominio extracelular de los CAR específicos para FLT3 comprende un scFv, donde el scFv comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), donde cada una de las regiones VH y VL comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) específicas para FLT3.

En algunas modalidades, la región VH comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VH que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 37, 38, 39, 43, 44, 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 294, 295, 296, 300, 301, 305, 306, 307, 311, 312,

316, 317 o 318; (ii) una región determinante de la complementariedad dos (CDR2) de VH que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 40, 41, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 297, 298, 302, 303, 308, 309, 313, 314, 319, 320 o 322; y (iii) una región determinante de la complementariedad tres (CDR3) de VH que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 42, 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 299, 304, 310, 315 o 321; y/o la región VL comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VL que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 323, 326, 328, 331, 336, 338, 340, 343, 345, 348 o 350; (ii) una región determinante de la complementariedad dos (CDR2) de VL que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 324, 329, 332, 334, 341 o 346; y (iii) una región determinante de la complementariedad tres (CDR3) de VL que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 325, 327, 330, 333, 335, 337, 339, 342, 344, 347 o 349.

En algunas modalidades, se proporcionan CAR específicos para FLT3 que comprenden un scFv, donde el scFv comprende una región VH que tiene la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291 o 293.

En algunas modalidades, se proporcionan CAR específicos para FLT3 que comprenden un scFv, donde el scFv comprende una región VL que tiene la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290 o 292.

En algunas modalidades, se proporcionan CAR específicos para FLT3 que comprenden un scFv que comprende una región VH y una región VL, donde la región VH tiene la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291 o 293; y la región VL tiene la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290 o 292.

En algunas modalidades, la región VH comprende la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291 o 293, o una variante de esta, con una o varias sustituciones de aminoácidos conservadoras en residuos que no se encuentran dentro de una CDR y/o la región VL comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13,

15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290 o 292, o una variante de esta, con una o varias sustituciones de aminoácidos en aminoácidos que no se encuentran dentro de una CDR.

En algunas modalidades, la región VH comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 90, 91 o 92; una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 93 o 94; y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 95; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 171; una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 172; y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 173.

En algunas modalidades, la región VH comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 20; y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 19.

En algunas modalidades, la región VH comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 43, 44 o 45; una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 46 o 47; y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 48; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 147; una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 148; y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 149.

En algunas modalidades, la región VH comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4; y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3.

En algunas modalidades, la región VH comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 49, 44 o 50; una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 51 o 52; y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 53; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 150; una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 151; y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 152.

En algunas modalidades, la región VH comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 6; y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la

SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la región VH comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 60, 61 o 62; una CDR2 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 63 o 64; y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 65; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las siguientes CDR: una CDR1 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 156; una CDR2 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 157; y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 158.

En algunas modalidades, la región VH comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 10; y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, cada CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat, la definición de Chothia, la combinación de la definición de Kabat y la definición de Chothia, la definición de AbM o la definición de contacto de CDR.

En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización CD3ζ. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio 4-1BB. En algunas modalidades, el CAR específico para FLT3 comprende un segundo dominio de señalización intracelular. En algunas modalidades, el segundo dominio de señalización intracelular comprende un dominio 4-1BB.

En algunas modalidades, los CAR específicos para FLT3 descritos en la presente pueden comprender un dominio de tallo entre el dominio de unión al ligando extracelular y el primer dominio transmembrana. En algunas modalidades, el dominio de tallo se selecciona del grupo que consiste en: una bisagra de CD8α, una bisagra de IgG1 y una bisagra de FcγRIIIα. En algunas modalidades, el dominio de tallo es una bisagra de CD8α humana, una bisagra de IgG1 humana o una bisagra de FcγRIIIα humana.

En algunas modalidades, los CAR específicos para FLT3 descritos en la presente pueden comprender uno o más epítopos específicos para uno o más anticuerpos monoclonales. En algunas modalidades, el epítipo específico para un anticuerpo monoclonal es un epítipo de CD20. En algunas modalidades, el epítipo de CD20 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 229 o la SEQ ID NO: 230.

En algunas modalidades, el CAR específico para FLT3 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 235, 236, 237 o 242. En algunas modalidades, el CAR específico para FLT3 comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 235. En algunas modalidades, el CAR específico para FLT3 comprende la secuencia de

aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 236.

En algunas modalidades, el primer dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana de cadena CD8 α .

5 En algunas modalidades, el CAR específico para FLT3 puede comprender otro dominio de unión al ligando extracelular que no es específico para FLT3.

En algunas modalidades, el o los dominios de unión al ligando extracelular, el primer dominio transmembrana y el o los dominios de señalización intracelular se encuentran en un único polipéptido.

10 En algunas modalidades, el CAR puede comprender un segundo dominio transmembrana, donde el primer dominio transmembrana y el o los dominios de unión al ligando extracelular se encuentran en un primer polipéptido, y donde el segundo dominio transmembrana y el o los dominios de señalización intracelular se encuentran en un segundo polipéptido. En un ejemplo de modalidad, el primer dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana de la cadena α del receptor de IgE de afinidad elevada (Fc ϵ RI) y el segundo dominio transmembrana
15 comprende un dominio transmembrana de la cadena γ o β de Fc ϵ RI.

En algunas modalidades, el CAR puede comprender un tercer polipéptido que comprende un tercer dominio transmembrana fusionado a un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimulante, donde el tercer dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana de la cadena γ o β de Fc ϵ RI.

20 En otro aspecto, se proporciona en la presente un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR específico para FLT3 descrito en la presente.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el CAR específico para FLT3 descrito en la presente.

25 En otro aspecto, se proporciona en la presente una célula inmunitaria modificada que expresa en su membrana de la superficie celular un CAR específico para FLT3 descrito en la presente. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada puede comprender otro CAR que no es específico para FLT3. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido suicida. En algunas modalidades, el polipéptido suicida es RQR8.

30 En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada se deriva de un linfocito T inflamatorio, un linfocito T citotóxico, un linfocito T regulador o un linfocito T auxiliar.

En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada puede comprender una alteración de uno o más genes endógenos, donde el gen endógeno codifica TCR α , TCR β , CD52, el receptor de glucocorticoides (GR, por sus siglas en inglés), desoxicitidina cinasa (dCK) o una proteína del
35 punto de control del sistema inmunitario, tal como, por ejemplo muerte celular programada-1 (PD-

1).

En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada se obtiene de un donante saludable. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada se obtiene de un individuo que padece una enfermedad o trastorno.

- 5 En otro aspecto, se proporciona en la presente una célula inmunitaria modificada que expresa en su membrana de la superficie celular un CAR específico para FLT3 descrito en la presente para utilizar como medicamento. En otro aspecto, se proporciona en la presente un anticuerpo específico para FLT3 para usar como medicamento. En algunas modalidades, el medicamento que comprende las células inmunitarias que expresan un CAR específico para FLT3 o anticuerpos
- 10 específicos para FLT3 es para utilizar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociados con FLT3. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociados con FLT3 son un cáncer de origen hematopoyético, tal como linfoma o leucemia. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, neoplasia maligna de células plasmáticas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares, enfermedad de
- 15 Kahler y mielomatosis, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, leucemia de células pilosas, linfoma no hodgkiniano (NHL, por sus siglas en inglés) de linfocitos B, leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés), leucemia linfocítica crónica (CLL, por sus siglas en inglés), leucemia linfocítica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), leucemia mieloide crónica (CML, por sus siglas en inglés), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de
- 20 zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico de B precursores, leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, linfoma de tejido linfático asociado con la mucosa, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos B grandes mediastinal primario (tímico), linfoma linfoplasmacítico,
- 25 macroglobulinemia de Waldenström, linfoma nodal de linfocitos B de la zona marginal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de linfocitos B grandes con alto contenido de histiocitos/linfocitos T, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma primario cutáneo difuso de linfocitos B grandes (tipo pierna), linfoma difuso de linfocitos B grandes en ancianos
- 30 positivo para EBV, linfoma difuso de linfocitos B grandes asociado con inflamación, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B grandes positivo para ALK, linfoma plasmablastico, linfoma de linfocitos B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada con HHV8, linfoma de linfocitos B sin clasificar con elementos intermedios entre linfoma difuso de linfocitos B grandes y linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos B sin clasificar
- 35 con elementos intermedios entre linfoma difuso de linfocitos B grandes y linfoma de Hodgkin

clásico, y otros cánceres relacionados con células hematopoyéticas, por ejemplo, ALL o AML.

En un aspecto, se proporciona en la presente una población de células que comprende células inmunitarias modificadas que expresan los CAR específicos para FLT descritos en la presente, donde (ii) dicha población de células comprende un porcentaje de células madre de memoria y
5 células de memoria central mayor que 20 %, 30 % o 40 % y/o (iii) dicha población de células alcanza un porcentaje de lisis de células que expresan FLT3 mayor que 10 %, 20 %, 30 % o 40 %.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para modificar una célula inmunitaria que expresa cualquiera de los CAR específicos para FLT3 descritos en la presente, donde el método comprende: proporcionar una célula inmunitaria e introducir en la célula al menos un
10 polinucleótido que codifica dicho CAR específico para FLT3; a través de lo cual dicha célula inmunitaria expresa dicho CAR específico para FLT3.

En algunas modalidades, el método comprende proporcionar una célula inmunitaria; introducir en la célula al menos un polinucleótido que codifica dicho CAR específico para FLT3; e introducir al menos un polinucleótido que codifica un CAR que no es específico para FLT3.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad o trastorno asociados con FLT3, donde el método comprende: proporcionar una célula inmunitaria que expresa en la superficie un CAR específico para FLT3 descrito en la presente y administrar dichas células inmunitarias a dicho sujeto. La invención proporciona también métodos para el tratamiento de sujetos que padecen una enfermedad o
20 trastorno asociados con FLT3, donde el método comprende proporcionar anticuerpos específicos para FLT3 descritos en la presente y administrar dichos anticuerpos a dicho sujeto.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende una célula inmunitaria modificada que expresa CAR específicos para FLT3 como se describe en la presente. En otras modalidades, la invención proporciona composiciones
25 farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos específicos para FLT3 descritos en la presente.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para el tratamiento de una afección asociada con células malignas que expresan FLT3 en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende una
30 célula inmunitaria modificada como se describe en la presente o anticuerpos específicos para FLT3 como se describe en la presente. En algunas modalidades, la afección es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de origen hematopoyético, tal como linfoma o leucemia. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, neoplasia maligna de células plasmáticas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares, enfermedad de Kahler y mielomatosis, leucemia de células
35

plasmáticas, plasmacitoma, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, leucemia de células pilosas, linfoma no hodgkiniano (NHL) de linfocitos B, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico de B precursores, leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, linfoma de tejido linfático asociado con la mucosa, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos B grandes mediastinal primario (tímico), linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma nodal de linfocitos B de la zona marginal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de linfocitos B grandes con alto contenido de histiocitos/linfocitos T, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma primario cutáneo difuso de linfocitos B grandes (tipo pierna), linfoma difuso de linfocitos B grandes en ancianos positivo para EBV, linfoma difuso de linfocitos B grandes asociado con inflamación, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B grandes positivo para ALK, linfoma plasmablastico, linfoma de linfocitos B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada con HHV8, linfoma de linfocitos B sin clasificar con elementos intermedios entre linfoma difuso de linfocitos B grandes y linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos B sin clasificar con elementos intermedios entre linfoma difuso de linfocitos B grandes y linfoma de Hodgkin clásico, y otros cánceres relacionados con células hematopoyéticas, por ejemplo, ALL o AML.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para la inhibición del crecimiento o la evolución de un tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan FLT3, que comprende administrarle al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende una célula inmunitaria modificada como se describe en la presente o un anticuerpo específico para FLT3 como se describe en la presente.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para la inhibición de la metástasis de células malignas que expresan FLT3 en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende una célula inmunitaria modificada como se describe en la presente o un anticuerpo específico para FLT3 como se describe en la presente.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para inducir la regresión de un tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan FLT3, que comprende administrarle al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende una célula inmunitaria modificada como se describe en la presente o un anticuerpo específico para FLT3 como se describe en la presente.

En algunas modalidades, cualquiera de los métodos que anteceden comprende además administrar una o más terapias adicionales, tales como, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal y/o un agente quimioterapéutico. En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que se une a un inhibidor de un punto de control, tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas modalidades, cualquiera de los métodos que anteceden comprende además administrarle al sujeto un inhibidor del receptor de tirosina cinasa, un inhibidor de mTOR, un modulador epigenético, un inhibidor de proteasoma, un agente inmunomodulador tal como lenalidomida, un inhibidor de Hedgehog o un inhibidor de isocitrato deshidrogenasa (IDH).

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 muestra gráficas de FACS representativas que demuestran la transducción eficaz de linfocitos T activados con la construcción de CAR de P3A1 con respecto a un control no transducido, y las eficacias de transducción de todas las construcciones como porcentaje de linfocitos T que expresan CAR e intensidad promedio de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés).

15

La FIG. 2 muestra la expresión de los marcadores de activación CD25 y 4-1BB en linfocitos T transducidos con las diversas construcciones de CAR evaluadas mediante citometría de flujo.

20

La FIG. 3 muestra el fenotipo de los linfocitos T con CAR al final del cultivo, según se determina mediante análisis de citometría de flujo de la expresión de los marcadores CD62L y/o CD45RO.

La FIG. 4 muestra el diseño experimental global del ensayo de eliminación a largo plazo y la respuesta de los distintos linfocitos T con CAR a una exposición repetida a células objetivo, medida como expansión múltiplo y actividad citotóxica (porcentaje de lisis) al día 6.

25

La FIG. 5 muestra la actividad antitumoral de los linfocitos T con CAR que expresan las construcciones P3A1 o P3E10 con dos dosis mediante el uso de un modelo de ratón ortotópico de AML humana. Las señales bioluminiscentes cuantificadas como flujo total (fotones/seg) se muestran en distintos puntos temporales.

30

La FIG. 6 muestra la sensibilidad de los linfocitos T que expresan en la superficie celular CAR específicos para FLT3 que comprenden epítomos de CD20 ante la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) inducida por el anticuerpo anti-CD20 rituximab.

La FIG. 7 muestra la recuperación de células progenitoras endógenas de médula ósea en ratones tratados con linfocitos T antirratón con CAR de FLT3 que expresan epítomos de CD20 y a los que se les administra posteriormente rituximab.

35

En un aspecto, la invención descrita en la presente proporciona receptores de antígenos quiméricos (CAR) y células inmunitarias que comprenden CAR (por ejemplo, linfocitos T con CAR) que se une específicamente a FLT3 (por ejemplo, FLT3 humana). La invención proporciona también polinucleótidos que codifican estos CAR, composiciones que comprenden células inmunitarias que expresan estos CAR y métodos para confeccionar y utilizar estos CAR y células inmunitarias que expresan CAR. La invención proporciona también métodos para el tratamiento de una afección asociada con las patologías mediadas por FLT3 en un sujeto, tales como cáncer mediado por células malignas que expresan FLT3, mediante el uso de los CAR específicos para FLT3 y células inmunitarias que expresan estos CAR como se describe en la presente.

En un aspecto, la invención descrita en la presente proporciona anticuerpos que se une específicamente a FLT3 (por ejemplo, FLT3 humana). La invención también proporciona composiciones que comprenden estos anticuerpos y métodos para usar estos anticuerpos. Por ejemplo, se proporcionan en la presente métodos para el tratamiento de una afección asociada con patologías mediadas por FLT3 en un sujeto, tales como cáncer, mediante el uso de estos anticuerpos.

Técnicas generales

La puesta en práctica de la invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, las cuales se encuentran comprendidas dentro del conocimiento de la técnica. Dichas técnicas se explican en profundidad en la bibliografía, tal como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et ál., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et ál., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et ál., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et ál., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed.,

IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

5

Definiciones

Tal como se usa en la presente, la expresión “dominio de unión al ligando extracelular” hace referencia a un polipéptido que puede unirse a un ligando o que puede interactuar con una molécula de la superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión al ligando extracelular puede seleccionarse para reconocer un ligando que actúa como marcador de la superficie celular en células objetivo asociadas con un estado de enfermedad particular.

10

Las expresiones “dominio de tallo” o “dominio de bisagra” se usan de manera intercambiable en la presente para hacer referencia a cualquier polipéptido que funcione para unir el dominio transmembrana al dominio de unión al ligando extracelular. En particular, los dominios de tallo se usan para proporcionar más flexibilidad y accesibilidad para el dominio de unión al ligando extracelular.

15

La expresión “dominio de señalización intracelular” hace referencia a la parte de una proteína que transduce la señal de función efectora e indica a la célula que lleve a cabo una función especializada.

Como se usa en la presente, “molécula coestimulante” hace referencia al compañero de unión cognado en células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T, que se une específicamente a un ligando coestimulante, y media de este modo una respuesta coestimulante por parte de la célula, tal como, de modo no taxativo, proliferación. Las moléculas coestimulantes incluyen, de modo no taxativo, una molécula de MHC de clase I, BTLA y receptor del ligando Toll. Los ejemplos de moléculas coestimulantes incluyen CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, el antígeno 1 asociado con la función linfocitaria (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares.

25

La expresión “ligando coestimulante” hace referencia a una molécula en una célula que presenta un antígeno (APC, por sus siglas en inglés) que se une de forma específica a una molécula de señal coestimulante cognada en un linfocito T, de forma que se proporciona una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, mediante la unión del complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con el péptido, media una respuesta de linfocitos T, que incluye, de modo no taxativo, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando coestimulante puede incluir, de modo no taxativo, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulante inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular

30
35

(ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor β de linfotoxina, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une de forma específica a B7-H3. Un ligando coestimulante también comprende, entre otros, un anticuerpo que se une de forma específica a una molécula coestimulante presente en un linfocito T, tal como, de modo no taxativo, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función del linfocito (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une de forma específica a CD83.

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina que puede unirse de forma específica a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígenos ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en la presente, el término abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de estos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos de cadena simple (scFv) y de dominio (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y camélidos) y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígenos. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, IgE, IgD o IgM (o subclase de estos) y no es necesario que el anticuerpo sea de ninguna clase en particular. En función de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Se conocen las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

Como se usan en la presente, las expresiones “fragmento de unión al antígeno” o “parte de unión al antígeno” hacen referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, FLT3). Las funciones de unión al antígeno de un anticuerpo pueden ser realizada por fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en la expresión “fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen los fragmentos Fab; Fab'; F(ab')₂; un fragmento Fv que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio sencillo (dAb) (Ward et ál., Nature 341:544-546, 1989) y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.

Un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno, un conjugado de anticuerpo o un polipéptido

que “se une específicamente” a un objetivo (por ejemplo, proteína FLT3) es una expresión conocida en la técnica, y se conocen en la técnica también los métodos para determinar dicha unión específica. Se dice que una molécula presenta una “unión específica” si reacciona o se asocia con mayor frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una sustancia o célula particular que con sustancias o células alternativas. Un anticuerpo “se une específicamente” a un objetivo si se une con mayor afinidad, aidez, más fácilmente y/o con mayor duración con respecto a su unión a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de FLT3 es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, aidez, más fácilmente y/o con mayor duración con respecto a su unión a otros epítipos de FLT3 o epítipos que no sean de FLT3. También se entenderá al leer esta definición, por ejemplo, que un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específicamente a un primer objetivo puede o no unirse específicamente a un segundo objetivo. En sí, la “unión específica” no requiere necesariamente una unión exclusiva (aunque puede incluirla). En general, aunque no necesariamente, las referencias a la unión son referencias a una unión específica.

Una “región variable” de un anticuerpo hace referencia a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea por sí sola o en combinación. Como se conoce en la técnica, cada una de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera consiste en cuatro regiones marco (FR) conectadas mediante tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables.

Las CDR de cada cadena se mantienen a gran proximidad mediante las FR y, junto a las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un abordaje basado en variabilidad de secuencia a través de especies (es decir, Kabat et ál. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un abordaje basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et ál., 1997, *J. Molec. Biol.* 273:927-948). Tal como se utiliza en la presente, una CDR puede hacer referencia a CDR definidas mediante cualquier abordaje o mediante una combinación de ambos abordajes.

Una “CDR” de un dominio variable son residuos de aminoácidos dentro de la región variable que se identifican de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, tanto Kabat como Chothia, AbM, contacto y/o definiciones conformacionales o cualquier método de determinación de CDR conocido en la técnica. Las CDR de anticuerpos pueden identificarse como las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat et ál. Ver, por ejemplo, Kabat et ál., 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también pueden identificarse como las estructuras de bucle estructural descritas originalmente por Chothia y otros. Ver, por ejemplo, Chothia et ál., *Nature* 342:877-883, 1989.

Otros abordajes para la identificación de CDR incluyen la “definición AbM”, que es un acuerdo mutuo entre Kabat y Chothia y se deriva mediante el uso del software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®) o la “definición de contacto” de las CDR en función de contactos con antígenos observados, establecida en MacCallum et ál., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745, 1996. En otro abordaje, denominado en la presente “definición conformacional” de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los residuos que realiza contribuciones entálpicas a la unión de antígenos. Ver, por ejemplo, Makabe et ál., *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166, 2008. Además, otras definiciones de límites de CDR pueden no coincidir estrictamente con uno de los abordajes que anteceden, pero no obstante se superponen con al menos una parte de las CDR de Kabat, si bien pueden acortarse o alargarse en virtud de la predicción o hallazgos experimentales de que los residuos o grupos de residuos específicos o incluso las CDR completas no afectan significativamente la unión al antígeno. Tal como se usa en la presente, una CDR puede hacer referencia a CDR definidas mediante cualquier abordaje conocido en la técnica, lo que incluye combinaciones de abordajes. Los métodos utilizados en la presente pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos abordajes. Para cualquier modalidad dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendida, AbM, de contacto y/o conformacional.

Tal como se utiliza en la presente, “anticuerpo monoclonal” hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que conforman la población son idénticos, salvo por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que se dirigen contra un único sitio antigénico. Asimismo, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen típicamente distintos anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítopos) distintos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente descripción pueden confeccionarse mediante el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975, o mediante métodos de ADN recombinante tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 4,816,567. También es posible aislar anticuerpos monoclonales de bibliotecas de fagos generadas mediante las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty et ál., *Nature* 348:552-554, 1990.

Tal como se utiliza en la presente, un anticuerpo “humanizado” hace referencia a formas de

anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de estas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En un aspecto, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son remplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como de ratón, rata o conejo con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de región marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes.

Asimismo, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias marco o CDR importadas, pero que se incluyen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprende de forma óptima al menos una parte de un dominio o región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana. Se prefieren los anticuerpos con regiones Fc modificadas como se describe en WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 o CDR H3) alteradas con respecto al anticuerpo original, lo que también se expresa como una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

Tal como se utiliza en la presente, un "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se produjo mediante el uso de cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos conocidos en la técnica o descritos en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humano o al menos un polipéptido de cadena ligera humano. Un ejemplo de este tipo es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murinos y polipéptidos de cadena pesada humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de diversos métodos conocidos en la técnica. En una modalidad, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, donde dicha biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan et ál., *Nature Biotechnology*, 14:309-314, 1996; Sheets et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381, 1991; Marks et ál., *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991). Los anticuerpos humanos también pueden confeccionarse mediante la inmunización de animales en los que se

introdujeron de forma transgénica locus de inmunoglobulina humana en lugar de los locus endógenos, por ejemplo, ratones en los cuales los genes de inmunoglobulina endógenos se inactivaron de forma total o parcial. Este abordaje se describe en las patentes estadounidenses n.º 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016. De manera alternativa, el anticuerpo humano puede prepararse mediante la immortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo, a través de clonación de células individuales del ADNc o pueden haberse inmunizado in vitro). Ver, por ejemplo, Cole et ál. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et ál., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95, 1991; y patente estadounidense n.º 5,750,373.

Se pretende que la expresión “anticuerpo quimérico” haga referencia a anticuerpos en los que las secuencias de región variable se derivan de una especie y las secuencias de región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

Un “anticuerpo monovalente” comprende un sitio de unión al antígeno por molécula (por ejemplo, IgG o Fab). En algunos casos, un anticuerpo monovalente puede tener más de un sitio de unión al antígeno, pero los sitios de unión son para distintos antígenos.

Un “anticuerpo bivalente” comprende dos sitios de unión al antígeno por molécula (por ejemplo, IgG). En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades de antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos.

Los anticuerpos de la invención pueden producirse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de expresión en fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de estas tecnologías u otras tecnologías conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Jayasena, S.D., *Clin. Chem.*, 45: 1628-50, 1999 y Fellouse, F.A., et ál., *J. Mol. Biol.*, 373(4):924-40, 2007).

Tal como se usan en la técnica, los términos “polinucleótido” o “ácido nucleico”, utilizados de manera intercambiable en la presente, hacen referencia a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases o nucleótidos modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en una cadena mediante una polimerasa de ADN o ARN. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. De estar presente, la modificación de la estructura del nucleótido puede realizarse antes o después del ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede verse interrumpida por componentes que no son nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente luego de la

polimerización, por ejemplo, mediante la conjugación con un componente de etiquetado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “casquetes”, la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótido tales como, por ejemplo, las que tienen enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), las que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), las que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralén, etc.), las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), las que contienen alquiladores, las que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas de uno o más polinucleótidos. Además, es posible reemplazar cualquiera de los grupos hidroxilo presentes comúnmente en los azúcares, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerlos con grupos protectores estándares o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o conjugarse con soportes sólidos. Es posible fosforilar los OH de extremo 5' y 3', o sustituirlos con aminas o restos de grupos de casquete orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También pueden derivarse otros hidroxilos en grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metilo-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa o beta-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como ribósido de metilo. Es posible reemplazar uno o más enlaces de fosfodiéster con grupos de unión alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, de modo no taxativo, modalidades donde el fosfato se reemplaza con P(O)S (“tioato”), P(S)S (“ditioato”), (O)NR₂ (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ (“formacetal”), donde cada R o R' es independientemente H o un alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace de éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces de un polinucleótido sean idénticos. La descripción que antecede se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente, lo que incluye ARN y ADN.

Como se conoce en la técnica, una “región constante” de un anticuerpo hace referencia a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea por sí sola o de forma combinada.

Como se usa en la presente, “sustancialmente puro” hace referencia a material que es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o incluso al menos 99 % puro (es decir, sin contaminantes).

Una “célula hospedadora” incluye un cultivo celular o célula individual que puede ser o fue un receptor para vectores para la incorporación de inserciones de polinucleótidos. Las células hospedadoras incluyen la progenie de una única célula hospedadora y la progenie puede no necesariamente ser completamente idéntica (en su morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula progenitora original debido a mutaciones naturales, accidentales o deliberadas. Una célula hospedadora incluye células transfectadas in vivo con uno o más polinucleótidos de la presente invención.

Como se conoce en la técnica, la expresión “región Fc” se usa para definir una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina. La “región Fc” puede ser una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante. Si bien los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana usualmente se define con una extensión desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de esta. La numeración de los residuos de la región Fc es la del índice de EU como en Kabat. Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región de Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos regiones constantes, CH2 y CH3.

Como se usa en la técnica, “receptor de Fc” y “FcR” describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas variantes alélicas y formas sometidas de manera alternativa al corte y empalme de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor de inhibición”), que poseen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. Los FcR se reseñan en Ravetch y Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92, 1991; Capel et ál., *Immunomethods*, 4:25-34, 1994; y de Haas et ál., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41, 1995. “FcR” también incluye el receptor neonatal FcRn, que es responsable por la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et ál., *J. Immunol.*, 117:587, 1976; y Kim et ál., *J. Immunol.*, 24:249, 1994).

Tal como se usa en la presente con respecto a un anticuerpo, el término “competir” significa que un primer anticuerpo, o un fragmento (o parte) de unión al antígeno de este, se une a un epítipo de forma suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una parte de unión al antígeno de este, de forma tal que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo cognado se reduzca de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también se reduce de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede suceder, pero no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo

puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que dicho segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo a su epítipo o ligando cognado, ya sea en la misma, mayor o menor medida, se dice que los anticuerpos “compiten de forma cruzada” entre sí por la unión a su o sus epítopos respectivos. Tanto los anticuerpos competitivos como los de competencia cruzada están abarcados por la invención. Sin importar el mecanismo por el que se produzca dicha competencia o competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común o parte de este), el experto en la técnica apreciaría, en función de los principios proporcionados en la presente, que dichos anticuerpos competitivos y/o de competencia cruzada sean útiles para los métodos descritos en la presente memoria y estén comprendidos en esta.

Tal como se usa en la presente, “autólogo” significa que las células, una línea celular o población de células utilizadas para el tratamiento de un paciente provienen de dicho paciente.

Como se usa en la presente, “alogénico” significa que las células o población de células utilizadas para el tratamiento de un paciente no provienen de dicho paciente, sino de un donante.

Tal como se usa en la presente, “tratamiento” es un abordaje para obtener resultados clínicos favorables o deseados. A los fines de la presente invención, los resultados clínicos favorables o deseados incluyen, de modo no taxativo, uno o más de los siguientes: la reducción de la proliferación (o destrucción) de células neoplásicas o cancerosas, inhibición de la metástasis de células neoplásicas, reducción o disminución del tamaño del tumor que expresa FLT3, remisión de una enfermedad asociada con FLT3 (por ejemplo, cáncer), disminución de los síntomas resultantes de una enfermedad asociada con FLT3 (por ejemplo, cáncer), aumento de la calidad de vida de quienes padecen de una enfermedad asociada con FLT3 (por ejemplo, cáncer), disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para el tratamiento de una enfermedad asociada con FLT3 (por ejemplo, cáncer), retraso de la evolución de una enfermedad asociada con FLT3 (por ejemplo, cáncer), cura de una enfermedad asociada con FLT3 (por ejemplo, cáncer) y/o prolongamiento de la supervivencia de pacientes con una enfermedad asociada con FLT3 (por ejemplo, cáncer).

“Mejora” significa una reducción o mejora de uno o más síntomas en comparación con la ausencia de administración de un CAR específico para FLT3 o un linfocito T con CAR específico para FLT3. La “mejora” también incluye el acortamiento o la reducción de la duración de un síntoma.

Como se usa en la presente, una “dosificación eficaz” o “cantidad eficaz” de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para producir cualquiera de uno o más resultados favorables o deseados. Para uso profiláctico, los resultados favorables o deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, reducir la gravedad o retrasar el inicio de la

enfermedad, lo que incluye síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados favorables o deseados incluyen resultados clínicos tales como la reducción de la incidencia o mejora de uno o más de los síntomas de diversas enfermedades o afecciones asociadas con FLT3 (tales como, por ejemplo, mieloma múltiple), disminución de la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, potenciar el efecto de otro medicamento y/o retrasar la evolución de la enfermedad asociada con FLT3 de los pacientes. Una dosificación eficaz puede administrarse en una o más administraciones. A los efectos de la presente invención, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr un tratamiento profiláctico o terapéutico ya sea de forma directa o indirecta. Tal como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no lograrse de forma conjunta con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una “dosificación eficaz” puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y un único agente puede considerarse administrado en una cantidad eficaz si, en conjunto con uno o más agentes distintos, puede lograrse o se logra un resultado deseado. “Individuo”, “paciente” o “sujeto” se usan de forma intercambiable en la presente y son un mamífero. Los mamíferos incluyen, de modo no taxativo, seres humanos, monos, cerdos, otros animales de granja, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, roedores que incluyen ratones, ratas, cobayos, etc. Un sujeto es un mamífero y se usa de manera intercambiable en la presente. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. En algunas modalidades, el sujeto es un primate no humano. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano o un mono, por ejemplo, un mono cynomolgus.

Tal como se usa en la presente, “vector” significa una construcción capaz de administrar y, en algunas modalidades, expresar uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen, de modo no taxativo, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN no conjugado, vectores plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

Tal como se utiliza en la presente, “secuencia de control de la expresión” significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión se une de manera operativa a la secuencia de ácido nucleico a transcribir.

Tal como se usa en la presente, “portador farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluyen cualquier material que, al combinarse con un ingrediente activo, permiten que el ingrediente conserve la actividad biológica y no reaccione con el sistema inmunitario del sujeto. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como solución salina amortiguada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los ejemplos de diluyentes para administración parenteral o mediante aerosol incluyen solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) o solución salina normal (0.9 %). Las composiciones que comprenden estos portadores se formulan a través de métodos convencionales conocidos (ver, por ejemplo, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18.^a edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21.^a Ed. Mack Publishing, 2005).

Tal como se utiliza en la presente, el término “ k_{on} ” hace referencia a la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo o scFv de un CAR a un antígeno.

Tal como se utiliza en la presente, el término “ k_{off} ” hace referencia a la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo o scFv de un CAR del complejo de anticuerpo/antígeno.

Tal como se utiliza en la presente, el término “ K_D ” hace referencia a la constante de disociación en equilibrio de una interacción entre anticuerpo y antígeno o una interacción entre scFv y antígeno.

La referencia a “alrededor de” un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) modalidades que están dirigidas a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a “alrededor de X” incluye la descripción de “X”. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

Se entiende que, cuando las modalidades de la presente se describen con la expresión “comprende”, también se proporcionan modalidades análogas descritas en términos tales como “consiste en” y/o “consiste esencialmente en”.

Cuando los aspectos o modalidades de la invención se describen en términos de un grupo Markush u otra agrupación de alternativas, la invención abarca no solo el grupo entero como un todo, sino cada miembro del grupo de forma individual y todos los posibles subgrupos del grupo principal, así como el grupo principal sin uno o más de los miembros del grupo. La invención también concibe la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo de la invención reivindicada.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente descripción, que incluye las definiciones. A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se entenderá que la

palabra “comprender” o variaciones como “comprende” o “que comprende” indican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros mencionado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. A menos que el contexto lo requiera, los términos en singular incluirán los plurales y los plurales incluirán el singular.

- 5 Se describen en la presente ejemplos de métodos y materiales, aunque pueden utilizarse también métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en la presente en la práctica o el análisis de la invención. Los materiales, métodos y ejemplos son meramente a título ilustrativo y no se pretende que sean taxativos.

10 Anticuerpos de FLT3

- La presente descripción proporciona anticuerpos que se unen a FLT3 [por ejemplo, FLT3 humana (por ejemplo, n.º de acceso: NP_004110 o SEQ ID NO: 198)] y se caracterizan por cualesquiera una o más de las siguientes características: (a) tratamiento, prevención, mejora de uno o más síntomas de una afección asociada con células malignas que expresan FLT3 en un sujeto (por ejemplo, cáncer tal como AML); (b) inhibición del crecimiento o evolución del tumor en un sujeto (que tiene un tumor maligno que expresa FLT3); (c) inhibición de la metástasis de un células cancerosas (malignas) que expresan FLT3 en un sujeto (que tiene una o más células malignas que expresan FLT3); (d) inducción de la regresión (por ejemplo, regresión a largo plazo) de un tumor que expresa FLT3; (e) ejercicio de actividad citotóxica sobre células malignas que expresan FLT3; (f) bloqueo de la interacción de FLT3 con otros factores a identificar; y/o (g) inducción del efecto testigo que destruye o inhibe el crecimiento de células malignas que no expresan FLT3 en las cercanías.

- En un aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VH que comprende la secuencia que se muestra en 37, 38, 39, 43, 44, 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 246 o 247; (ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 40, 41, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 248, 249, 251, 252, 253 o 255; y iii) una CDR3 de VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 42, 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 245, 250 o 254; y/o una región variable de cadena ligera (VL) que comprende (i) una CDR1 de VL que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 257, 261, 263, 265, 268,

270, 273 o 275; (ii) una CDR2 de VL que comprende la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 259, 266 o 271; y (iii) una CDR3 de VL que comprende la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 256, 258, 260, 262, 264, 267, 269, 272 o 274.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291 o 293; y/o una región VL que comprende la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290 o 292.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 275, 289 o 291; y/o una región VL que comprende la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 274, 288 o 290.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo que tiene cualquiera de las secuencias parciales de cadena ligera enumeradas en la Tabla 2 y/o cualquiera de las secuencias parciales de cadena pesada enumeradas en la Tabla 2.

En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante. En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente son de la subclase IgG1, IgG2, IgG2Δa, IgG3 o IgG4. En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante glicosilada. En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante con una afinidad de unión menor a uno o más receptores de Fc gamma humano.

Los anticuerpos proporcionados en la presente pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena simple (ScFv) y/o humanizados. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (que incluye anticuerpos quiméricos o humanizados).

CAR específicos para FLT3 y métodos para confeccionarlos

Se proporcionan en la presente CAR que se unen a FLT3 (por ejemplo, FLT3 humana (por ejemplo, SEQ ID NO: 198) o número de acceso: NP_004110). Los CAR específicos para FLT3 proporcionados en la presente incluyen CAR de cadena simple y CAR de múltiples cadenas. Los CAR tienen la capacidad de redirigir la especificidad y reactividad de los linfocitos T hacia FLT3 de

una forma no limitada a MHC, lo que explota las propiedades de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales. El reconocimiento del antígeno no limitado a MHC otorga a los linfocitos T que expresan CAR la capacidad de reconocer un antígeno sin importar el procesamiento del antígeno, mediante lo cual se evita un mecanismo principal del escape tumoral.

- 5 En algunas modalidades, los CAR proporcionados en la presente comprenden un dominio de unión al ligando extracelular (por ejemplo, un fragmento variable de cadena simple (scFv)), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular, dominio transmembrana y dominio de señalización intracelular se encuentran en un polipéptido, es decir, en una única cadena. También se
- 10 proporcionan en la presente polipéptidos y CAR de múltiples cadenas. En algunas modalidades, los CAR de múltiples cadenas comprenden: un primer polipéptido que comprende un dominio transmembrana y al menos un dominio de unión al ligando extracelular, y un segundo polipéptido que comprende un dominio transmembrana y al menos un dominio de señalización intracelular, donde los polipéptidos se ensamblan de forma conjunta para formar un CAR de múltiples cadenas.
- 15 En algunas modalidades, un CAR de múltiples cadenas específico para FLT3 se basa en el receptor de afinidad elevada para IgE (FcεRI). El FcεRI expresado en los mastocitos y basófilos desencadena reacciones alérgicas. FcεRI es un complejo tetramérico compuesto por una única subunidad α, una única subunidad β y dos subunidades γ enlazadas mediante disulfuro. La subunidad α contiene el dominio de unión a IgE. Las subunidades β y γ contienen ITAM que
- 20 median la transducción de señales. En algunas modalidades, se selecciona el dominio extracelular de la cadena de FcRα y se reemplaza con un dominio de unión al ligando extracelular específico para FLT3. En algunas modalidades, el CAR específico para FLT3 de múltiples cadenas comprende un scFv que se une específicamente a FLT3, la bisagra de CD8α y el ITAM de la cadena de FcRβ. En algunas modalidades, el CAR puede comprender o no la cadena de FcRγ.
- 25 En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular comprende un scFv que comprende la región variable de cadena ligera (VL) y la región variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno objetivo unidas mediante un enlazador flexible. Los fragmentos de región variable de cadena simple se confeccionan al enlazar regiones variables de cadena ligera y/o pesada mediante el uso de un péptido enlazador corto (Bird et ál.,
- 30 Science 242:423-426, 1988). Un ejemplo de péptido enlazador es el enlazador GS con la secuencia de aminoácidos (GGGS)₃ (SEQ ID NO: 232), que enlaza aproximadamente 3.5 nm entre el extremo carboxi de una región variable y el extremo amino de la otra región variable. Se han diseñado y utilizado enlazadores de otras secuencias (Bird et ál., 1988, supra). En general, los enlazadores pueden ser polipéptidos cortos y flexibles, por ejemplo, compuestos por alrededor de
- 35 20 residuos de aminoácidos o menos. A su vez, los enlazadores pueden modificarse para realizar

más funciones, tales como el acoplamiento de fármacos o acoplamiento a soportes sólidos. Las variantes de cadena simple pueden producirse de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, es posible utilizar un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, es posible introducir un plásmido adecuado que contiene un polinucleótido que codifica el scFv en una célula hospedadora adecuada, ya sea eucariota, tal como células de levadura, vegetales, de insectos o de mamíferos, o procariotas, tales como E. coli. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden producirse mediante manipulaciones de rutina tales como enlace de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse mediante el uso de métodos de purificación proteica estándares conocidos en la técnica.

- 10 El dominio extracelular de FLT3 está compuesto por 5 dominios de inmunoglobulina, donde el Dominio 5 es el más cercano a la membrana celular y el dominio 1 es el más lejano (de forma lineal; Verstraete, 7 de julio de 2011; Blood: 118 (1)). Las secuencias de los cinco dominios extracelulares de FLT3 se enumeran en la Tabla 1 que figura a continuación.

15 Tabla 1.

N.º de dominio extracelular de FLT3	Secuencia
1	NQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLGCALRPQSSG TVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQ NRGVVSMVILKMTETQA GEYLLFIQSEATNYTILFTVSIR (SEQ ID NO: 199)
2	NTLLYLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLCD SQGESCKEES PAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECTRL (SEQ ID NO: 200)
3	FTIDLNQTPQTTL PQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKAL EEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSA LVTIVE (SEQ ID NO: 201)
4	KGFINATNSSDY EIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTF SRKSFPCEQ KGLDNGYSISKFCNHKHQPGEYIFHAENDDAQFTKMFTLN (SEQ ID NO: 202)
5	IRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEG VWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETIL LNSPGPFPIQDN (SEQ ID NO: 203)

El dominio 2-3 comprende la secuencia del Dominio 2 y el Dominio 3 (SEQ ID NO: 254).

En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular de los CAR específicos para

FLT3 descrito en la presente se une al Dominio 1, 2, 3, 4 o 5 del dominio extracelular de FLT3.

En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular de los CAR específicos para FLT3 descrito en la presente se une al Dominio 1 del dominio extracelular de FLT3.

En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular de los CAR específicos para

5 FLT3 descrito en la presente se une al Dominio 2 del dominio extracelular de FLT3.

En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular de los CAR específicos para FLT3 descrito en la presente se une al Dominio 3 del dominio extracelular de FLT3.

En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular de los CAR específicos para FLT3 descrito en la presente se une al Dominio 4 del dominio extracelular de FLT3.

10 En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular de los CAR específicos para FLT3 descrito en la presente se une al Dominio 5 del dominio extracelular de FLT3.

En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular de los CAR específicos para FLT3 descrito en la presente se une al Dominio 2-3 del dominio extracelular de FLT3.

En algunas modalidades, el dominio de unión al ligando extracelular de los CAR específicos para

15 FLT3 descrito en la presente se une al Dominio 2-3 o 4 del dominio extracelular de FLT3.

En otro aspecto, se proporciona un CAR que se une específicamente a FLT3, donde el CAR comprende un dominio de unión al ligando extracelular que comprende: una región VH que tiene la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291 o 293; y/o una

20 región VL que tiene la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286, 288, 290 o 292. En algunas modalidades, el VH y VL se enlazan juntos a través de un enlazador flexible. En algunas modalidades, el enlazador flexible comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 232.

25 En otro aspecto, se proporciona un receptor de antígenos quimérico (CAR) específico para FLT3 que comprende un dominio de unión al ligando extracelular, un primer dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, donde el dominio extracelular comprende un fragmento Fv de cadena simple (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), donde la región VH comprende (i) una región determinante de la

30 complementariedad uno (CDR1) de VH que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 37, 38, 39, 43, 44, 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 294, 295, 296, 300, 301, 305, 306, 307, 311, 312, 316, 317 o 318; (ii) una región determinante de la complementariedad dos (CDR2) de VH que tiene

35 la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 40, 41, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 63,

64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 297, 298, 302, 303, 308, 309, 313, 314, 319, 320 o 322; y (iii) una región determinante de la complementariedad tres (CDR3) de VH que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 42, 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 299, 304, 310, 315, o 321.

En otro aspecto, se proporciona un receptor de antígenos quimérico (CAR) específico para FLT3 que comprende un dominio de unión al ligando extracelular, un primer dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, donde el dominio extracelular comprende un fragmento Fv de cadena simple (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), donde la región VL comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VL que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 323, 326, 328, 331, 336, 338, 340, 343, 345, 348 o 350; (ii) una región determinante de la complementariedad dos (CDR2) de VL que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 324, 329, 332, 334, 341 o 346; y (iii) una región determinante de la complementariedad tres (CDR3) de VL que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 325, 327, 330, 333, 335, 337, 339, 342, 344, 347 o 349.

En otro aspecto, se proporciona un receptor de antígenos quimérico (CAR) específico para FLT3 que comprende un dominio de unión al ligando extracelular, un primer dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, donde el dominio extracelular comprende un fragmento Fv de cadena simple (scFv) que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), donde (a) la región VH comprende (i) una región determinante de la complementariedad uno (CDR1) de VH que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 37, 38, 39, 43, 44, 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 294, 295, 296, 300, 301, 305, 306, 307, 311, 312, 316, 317 o 318; (ii) una región determinante de la complementariedad dos (CDR2) de VH que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 40, 41, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 297, 298, 302, 303, 308, 309, 313, 314, 319, 320 o 322; y (iii) una región determinante de la complementariedad tres (CDR3) de VH que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 42, 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 299, 304, 310, 315 o 321; y (b) la región VL comprende (i) una región determinante

- de la complementariedad uno (CDR1) de VL que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 323, 326, 328, 331, 336, 338, 340, 343, 345, 348 o 350; (ii) una región determinante de la complementariedad dos (CDR2) de VL que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 324, 329, 332, 334, 341 o 346; y (iii) una región determinante de la complementariedad tres (CDR3) de VL que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 325, 327, 330, 333, 335, 337, 339, 342, 344, 347 o 349.
- En algunas modalidades, un CAR de la invención comprende un dominio de unión al ligando extracelular que tiene cualquiera de las secuencias parciales de cadena ligera enumeradas en la Tabla 2 y/o cualquiera de las secuencias parciales de cadena pesada enumeradas en la Tabla 2. En la Tabla 2, las secuencias subrayadas son secuencias de CDR de acuerdo con Kabat y en negrita de acuerdo con Chothia, salvo por las secuencias de CDR2 de cadena pesada de P4F6, P4C7, P3A1, P5A3, P9B5, P9F1, P1B4, P1B11, P7H3, P3E10, P1A5, P5F7, P4H11, P15F7, P12B6, P8B6, P14G2 y P7F9, donde la secuencia de CDR de Chothia está subrayada y la secuencia de CDR de Kabat se encuentra en negrita.

Tabla 2.

mAb	Cadena ligera	Cadena pesada
P4F6	EIVLTQSPGTL SL SPGERATLSC <u>RASHS</u> <u>VSSSYLAWY</u> QKPGQAPRLLIY <u>GASSR</u> <u>AT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYGSP</u> PRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV <u>SCKASG</u> <u>GTFGSY</u> GISWVRQAPGQGLEWM <u>GGIIP</u> <u>IFGTV</u> TYAQKFQGRVTITADESTRTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARD <u>DSWSGATGAS</u> <u>DT</u> WGQGT LV TVSS (SEQ ID NO: 2)
P4C7	EIVLTQSPGTL SL SPGERATLSC <u>RASQY</u> <u>VSASLLAWY</u> QKPGQAPRLLIY <u>GASTR</u> <u>AT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYARSST</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 3)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV <u>SCKASG</u> <u>GTFSSY</u> TISWVRQAPGQGLEWM <u>GGIIP</u> <u>AFGI</u> ANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAK <u>GGSYSLDYFDI</u> WGQGT LV TVSS (SEQ ID NO: 4)

P3A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC <u>RASQS</u> <u>SSYLN</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>AASSLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC <u>QQSYSTPLT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 5)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG <u>GTFSSYDIS</u> WVRQAPGQGLEWMGGIIP <u>VSGRANYAQKFQGR</u> VTITTDKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCAR <u>VRPTYWPLD</u> <u>YW</u> GQGTLTVSS (SEQ ID NO: 6)
P5A3	QSALTQPASVSGSPGQSITISC <u>TGTSSD</u> <u>VGGYNYVS</u> WYQQHPGKAPKLLMIY <u>EVSK</u> <u>RPS</u> GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQA EDEADYYC <u>SSYAGSNTVV</u> FGGGTKLTV L (SEQ ID NO: 7)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG <u>GTFSSY</u> IGWVRQAPGQGLEWMGGIIP <u>WFGTANYAQKFQGR</u> VTITADKSTNTAY MELSSLRSEDTAVYYCAAD <u>DHHDSPSGY</u> <u>TSGGFDV</u> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 8)
P9B5	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC <u>SGSSSN</u> <u>IGSNYVY</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>RNNQRP</u> <u>SG</u> VDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDE ADYYC <u>AAWDDSLSGVV</u> FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 9)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGF <u>IFASYAMS</u> WVRQAPGKGLEWVSEISS <u>GGSTTYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DRVMAGLGY</u> <u>DPFDY</u> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 10)
P9F1	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC <u>SGSGS</u> <u>NIGSNYVY</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>RNNQR</u> <u>PS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYC <u>AAWDGSLSRPV</u> FGTGTKLTVL (SEQ ID NO: 11)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGF <u>IFSSFAMS</u> WVRQAPGKGLEWVSDISGS <u>GASTYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAS <u>ASGGSGSYW</u> <u>PYMDP</u> WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 12)
P1B4	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VPNEQLAWY</u> QQKPGQAPRLLIY <u>DASSR</u> <u>AT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYGSPLT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 13)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG <u>GVFSRYALS</u> WVRQAPGQGLEWMGGIIP <u>MLGFANYAQKFQGR</u> VTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCAT <u>LDFGALDYW</u> QGQTLTVSS (SEQ ID NO: 14)
P1B11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSSSELA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASSR</u> <u>AT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYDSSPLT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 15)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG <u>GTFRSF</u> DISWVRQAPGQGLEWMGRIIP <u>LGYANYAQKFQGR</u> VTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAS <u>DLGAPWAGYP</u> <u>FDP</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 16)

P7H3	QSVLTQPPSVSVAPGKTARITC <u>GGNNIG</u> <u>SKSVH</u> WYQQKPGQAPVLVIY <u>YDSRPS</u> GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEA DYYC <u>QVWDSSTAWV</u> FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 17)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSY</u> AMHWVRQAPGKGLEWVSA <u>ISG</u> <u>SGGSTYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARG <u>TRWWWG</u> <u>DAFDH</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)
P3E10	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VPSSQLAWY</u> QQKPGQAPRLLIY <u>DASSR</u> <u>AT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYGSSPLT</u> FGQG TKVEIK (SEQ ID NO: 19)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>G</u> <u>GTFSSY</u> AIQWVRQAPGQGLEWMGG <u>IV</u> <u>GSWGL</u> ANYA <u>AQKFQGR</u> VTITTDKSTSTA YMESSLRSED TAVYYCAT <u>SAFGELAS</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 20)
P1A5	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQA</u> <u>VDSSDLAWY</u> QQKPGQAPRLLIY <u>DAYTR</u> <u>PS</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYGSSPLT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>G</u> <u>GVFSRYAL</u> SWVRQAPGQGLEWMGG <u>IIP</u> <u>MLGF</u> ANYA <u>AQKFQGR</u> VTITADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAT <u>LDFGALDYW</u> GQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 22)
P5F7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DTFTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYC <u>QQYGSSPPT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSY</u> AMNWVRQAPGKGLEWVSS <u>ISG</u> <u>GGRSTYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DLSPSDVG</u> <u>WGYGFDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
P4H11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSNTYLAWY</u> QQKPGQAPRLLIY <u>DTSSR</u> <u>AT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYGSSLT</u> FGQG TKVEIK (SEQ ID NO: 25)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSY</u> AMNWVRQAPGKGLEWVSS <u>ISG</u> <u>GGRSTYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DLSPSDVG</u> <u>WGYGFDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 26)
P15F7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC <u>RASQSI</u> <u>STYLN</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>AASNLS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC <u>QQSYSIPLT</u> FGQG TKVEIK (SEQ ID NO: 27)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFNNY</u> AMNWVRQAPGKGLEWVSV <u>ISG</u> <u>SGGT</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAS <u>GIWDLRYWG</u> QGLTVTVSS (SEQ ID NO: 28)

P12B6	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSC <u>RASQIV</u> <u>SSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASSRA</u> <u>SG</u> IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYC <u>QQYGGSPYT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 29)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASG <u>GTFMSYAIS</u> WVRQAPGQGLEWMG <u>GIIP</u> <u>IFG</u> IANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARE <u>ETLIYPIPFELW</u> GQGTLTVSS (SEQ ID NO: 30)
P8B6	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSHSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASFR</u> <u>AA</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYGSDPYT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 31)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASG <u>GTFSSYAVS</u> WVRQAPGQGLEWMG <u>GIIP</u> <u>IFG</u> IANYAQKFQGRVTITADTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAI <u>EGIGGDLRYDG</u> <u>YDA</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 32)
P14G2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASQSI</u> <u>SSYLN</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>DASDLQR</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYC <u>QQSYNTPWT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 33)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG <u>F</u> <u>TFSNYVMN</u> WVRQAPGKGLEWVSAISG <u>SGATTYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVS <u>GLWAGGIWG</u> QGTLTVSS (SEQ ID NO: 34)
P7F9	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC <u>TRSSGS</u> <u>IASNYVQ</u> WYQQKPGQAPVLVY <u>DDSDR</u> <u>PS</u> GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD EADYYC <u>QVWDSSSDHWV</u> FGGGTKLTV L (SEQ ID NO: 35)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG <u>F</u> <u>TFSSYAMS</u> WVRQAPGKGLEWVSAIGG <u>SGGSTYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAMYYCARD <u>DYYAFSDP</u> <u>AYGGMDV</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 36)
P08B0 6EE	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSHSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASFR</u> <u>AA</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYGSEPYT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 264)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASG <u>GTFSSYAVS</u> WVRQAPGQGLEWMG <u>GIIP</u> <u>IFG</u> IANYAQKFQGRVTITADTSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCAI <u>EGIGGDLRYEGY</u> <u>DA</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 265)
P04A0 4	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VTSSQLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASSR</u> <u>AT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYGSSLLIT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 266)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASG <u>GTFSSYIIT</u> WVRQAPGQGLEWMG <u>GRIM</u> <u>PAFGWTNYAQKFQGR</u> VTITTDKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAS <u>DEFGAFDV</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 267)

P01A0 5	EIVLTQSPGTL SL SPGERATLSC <u>RASQA</u> <u>VDSSDL</u> AWYQHKPGQAPRLLIY <u>DAYTR</u> <u>PS</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYC <u>QQYGSSPLT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 268)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>G</u> <u>GVFSRYAL</u> SWVRQAPGQGLEWMGGI <u>IP</u> <u>MLGF</u> FANYAQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCAT <u>LDFGALDYW</u> GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 269)
P08B0 3	DIVMTQSPGTL SL SPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DAYTRA</u> <u>T</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYC <u>QQYGSPYT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 270)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>G</u> <u>GTFSSYDI</u> SWVRQAPGQGLEWMGRI <u>IP</u> <u>SFGA</u> AANYAQKFQGRVTITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCAT <u>DDGEGWTPP</u> <u>FGY</u> WGQGT LT VTVSS (SEQ ID NO: 271)
P5F7	DIVMTQSPATL SL SPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DTFTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYC <u>QQYGSSPPT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 272)	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVSS <u>ISG</u> <u>GGRST</u> YYADSVKGRFTISRDN SK N TL YL QMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGT LT VTVSS (SEQ ID NO: 273)
P5F7g	EIVLTQSPATL SL SPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DTFTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV YYC <u>QQYGSSPPT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 274)	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVSS <u>ISG</u> <u>GGRST</u> YYADSVKGRFTISRDN SK N TL YL QMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGT LT VTVSS (SEQ ID NO: 275)
P10A0 2g	EIVLTQSPATL SL SPGERATLSC <u>RASQD</u> <u>VSDLLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DAYTRA</u> <u>T</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA VYYC <u>QQYASSPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 276)	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVSS <u>ISG</u> <u>GGRST</u> YYADSVKGRFTISRDN SK N TL YL QMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGT LT VTVSS (SEQ ID NO: 277)
P10A0 4g	EIVLTQSPATL SL SPGERATLSC <u>RASQK</u> <u>VSDLLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DAYTRA</u> <u>T</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA VYYC <u>QQYTGSPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 278)	EVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVSS <u>ISG</u> <u>GGRST</u> YYADSVKGRFTISRDN SK N TL YL QMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGT LT VTVSS (SEQ ID NO: 279)

P10A0 5g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASLSV</u> <u>SDLLAWYQQKPGQAPRLLIYDAYSRA</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV YYC <u>QQYSSNPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 280)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSSI</u> <u>SG</u> <u>GGRSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL</u> QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 281)
P10A0 7g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASGS</u> <u>VSDLLAWYQQKPGQAPRLLIYDAYSRA</u> <u>T</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA VYYC <u>QQYASYPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 282)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSSI</u> <u>SG</u> <u>GGRSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL</u> QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 283)
P10B0 3g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSDLLAWYQQKPGQAPRLLIYDAFSRA</u> <u>T</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA VYYC <u>QQYGTPPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 284)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSSI</u> <u>SG</u> <u>GGRSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL</u> QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 285)
P10B0 6g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASESV</u> <u>SDLLAWYQQKPGQAPRLLIYDAYSRA</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV YYC <u>QQYSASPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 286)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSSI</u> <u>SG</u> <u>GGRSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL</u> QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 287)
P5F7g 2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYDTFTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV YYC <u>QQYGSSPPT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 288)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAI</u> <u>SG</u> <u>GGRSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL</u> QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 289)

P5F7g 3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSSLL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>DAYTRA</u> <u>T</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFA VYYC <u>QQYTGSPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 290)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAAS <u>GF</u> <u>TFSSY</u> AMNWVRQAPGKGLEWVSA <u>ISG</u> <u>GGRST</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 291)
P5F7g 4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQS</u> <u>VSSLL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>DAYTRA</u> <u>T</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFA VYYC <u>QQYTGSPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 292)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAAS <u>GF</u> <u>TFSSY</u> AMSWVRQAPGKGLEWVSA <u>ISG</u> <u>GGRST</u> YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DLSPSDVGW</u> <u>GYGFDI</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 293)

También se proporcionan en la presente partes de CDR de dominios de unión al antígeno de anticuerpos contra FLT3 o partes de CDR de dominios de unión al ligando extracelular de CAR para FLT3 (que incluyen las regiones de contacto de CDR, CDR de Kabat, Chothia). Se conoce en la técnica la determinación de las regiones CDR. Se entiende que, en algunas modalidades, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Chothia y de Kabat (también determinadas “CDR combinadas” o “CDR extendidas”). En algunas modalidades, las CDR son las CDR de Kabat. En otras modalidades, las CDR son las CDR de Chothia. Dicho de otra forma, en modalidades con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de las CDR de Kabat, Chothia, de combinación, o combinaciones de estas. La Tabla 3 proporciona ejemplos de secuencias de CDR proporcionadas en la presente.

Tabla 3.

Cadena pesada			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
P4F6	SYGIS (SEQ ID NO: 37) (Kabat); GGTFGSY (SEQ ID NO: 38) (Chothia); GGTFGSYGIS (SEQ ID NO: 39) (Extendida)	GIIPIFGTVTYAQKFQ G (SEQ ID NO: 40) (Kabat); IPIFGT (SEQ ID NO: 41) (Chothia)	DSWSGATGASDT (SEQ ID NO: 42)

P4C7	SYTIS (SEQ ID NO: 43) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia) GGTFSSYTIS (Extendida) (SEQ ID NO: 45)	GIIPAFGIANYAQKFQ G (SEQ ID NO: 46) (Kabat); IPAFGI (SEQ ID NO: 47) (Chothia)	GGSYSLDYFDI (SEQ ID NO: 48)
P3A1	SYDIS (SEQ ID NO: 49) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia); GGTFSSYDIS (SEQ ID NO: 50) (Extendida)	GIIPVSGRANYAQKF QG (SEQ ID NO: 51) (Kabat); IPVSGR (SEQ ID NO: 52) (Chothia)	VRPTYWPLDY (SEQ ID NO: 53)
P5A3	SYBIG (SEQ ID NO: 54) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 55) (Chothia); GGTFSSYBIG (SEQ ID NO: 56) (Extendida)	GIIPWFGTANYAQKF QG (SEQ ID NO: 57) (Kabat); IPWFGT (SEQ ID NO: 58) (Chothia)	DHHDSPSGYTSGG FDV (SEQ ID NO: 59)
P9B5	SYAMS (SEQ ID NO: 60) (Kabat); GFIFASY (SEQ ID NO: 61) (Chothia); GFIFASYAMS (SEQ ID NO: 62) (Extendida)	EISSSGGSTTYADSV KG (SEQ ID NO: 63) (Kabat); SSSGGS (SEQ ID NO: 64) (Chothia)	DRVMAGLGYDPFD Y (SEQ ID NO: 65)
P9F1	SFAMS (SEQ ID NO: 66) (Kabat); GFIFSSF (SEQ ID NO: 67) (Chothia); GFIFSSFAMS (SEQ ID NO: 68) (Extendida)	DISGSGASTYYADSV KG (SEQ ID NO: 69) (Kabat); SGSGAS (SEQ ID NO: 70) (Chothia)	ASGGSGSYWPYM DP (SEQ ID NO: 71)

P1B4	RYALS (SEQ ID NO: 72) (Kabat); GGVFSRY (SEQ ID NO: 73) (Chothia); GGVFSRYALS (SEQ ID NO: 74) (Extendida)	GIIPMLGFANYAQKFQ (SEQ ID NO: 75) (Kabat); IPMLGF (SEQ ID NO: 76) (Chothia)	LDFGALDY (SEQ ID NO: 77)
P1B11	SFDIS (SEQ ID NO: 78) (Kabat); GGTFRSF (SEQ ID NO: 79) (Chothia); GGTFRSFDIS (SEQ ID NO: 80) (Extendida)	RIIPILGYANYAQKFQ (SEQ ID NO: 81) (Kabat); IPILGY (SEQ ID NO: 82) (Chothia)	DLGAPWAGYPFDP (SEQ ID NO: 83)
P7H3	SYAMH (SEQ ID NO: 84) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 85) (Chothia); GFTFSSYAMH (SEQ ID NO: 86) (Extendida)	AISGSGGSTYYADSV (SEQ ID NO: 87) (Kabat); SGSGGS (SEQ ID NO: 88) (Chothia)	GTRWWWGDAFDH (SEQ ID NO: 89)
P3E10	SYAIQ (SEQ ID NO: 90) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 91) (Chothia); GGTFSSYAIQ (SEQ ID NO: 92) (Extendida)	GIVGSWGLANYAQKFQ (SEQ ID NO: 93) (Kabat); VGSWGL (SEQ ID NO: 94) (Chothia)	SAFGELAS (SEQ ID NO: 95)
P1A5	RYALS (SEQ ID NO: 96) (Kabat); GGVFSRY (SEQ ID NO: 97) (Chothia); GGVFSRYALS (SEQ ID NO: 98) (Extendida)	GIIPMLGFANYAQKFQ (SEQ ID NO: 99) (Kabat); IPMLGF (SEQ ID NO: 100) (Chothia)	LDFGALDY (SEQ ID NO: 101)

P5F7	SYAMN (SEQ ID NO: 102) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 104) (Extendida)	SISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 105) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 106) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 107)
P4H11	SYAMN (SEQ ID NO: 108) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 109) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 110) (Extendida)	SISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 111) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 112) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 113)
P15F7	NYAMN (SEQ ID NO: 114) (Kabat); GFTFNYY (SEQ ID NO: 115) (Chothia); GFTFNYYAMN (SEQ ID NO: 116) (Extendida)	VISGSGGTTYADSV KG (SEQ ID NO: 117) (Kabat); SGSGGT (SEQ ID NO: 118) (Chothia)	GIWDLRY (SEQ ID NO: 119)
P12B6	SYAIS (SEQ ID NO: 120) (Kabat); GGTFMSY (SEQ ID NO: 121) (Chothia); GGTFMSY AIS (SEQ ID NO: 122) (Extendida)	GIPIFGIANYAQKFQ G (SEQ ID NO: 123) (Kabat); IPIFGI (SEQ ID NO: 124) (Chothia)	ETLIYPIPFEL (SEQ ID NO: 125)
P8B6	SYAVS (SEQ ID NO: 126) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 127) (Chothia); GGTFSSYAVS (SEQ ID NO: 128) (Extendida)	GIPIFGIANYAQKFQ G (SEQ ID NO: 129) (Kabat); IPIFGI (SEQ ID NO: 130) (Chothia)	EGIGGDLRYDGYD A (SEQ ID NO: 131)

P14G2	NYVMN (SEQ ID NO: 132) (Kabat); GFTFSNY (SEQ ID NO: 133) (Chothia); GFTFSNYVMN (SEQ ID NO: 134) (Extendida)	AISGSGATTYYADSV KG (SEQ ID NO: 135) (Kabat); SGSGAT (SEQ ID NO: 136) (Chothia)	GLWAGGI (SEQ ID NO: 137)
P7F9	SYAMS (SEQ ID NO: 138) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 139) (Chothia); GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 140) (Extendida)	AIGGSGGSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 141) (Kabat); GGSGGS (SEQ ID NO: 142) (Chothia)	DYYAFSDPAYGGM DV (SEQ ID NO: 143)
P08B06EE	SYAVS (SEQ ID NO: 294) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 295) (Chothia); GGTFSSYAVS (SEQ ID NO: 296) (Extendida)	GIPIFGIANYAQKFQ G (SEQ ID NO: 297) (Kabat); IPIFGI (SEQ ID NO: 298) (Chothia)	EGIGGDLRYEGYD A (SEQ ID NO: 299)
P04A04	SYIIT (SEQ ID NO: 300) GGTFSSY (SEQ ID NO: 295) (Chothia) GGTFSSYIIT (SEQ ID NO: 301) (Extendida)	RIMPAFGWTNYAQK FQG (SEQ ID NO: 302) (Kabat) MPAFGW (SEQ ID NO: 303) (Chothia)	DEFGAFDV (SEQ ID NO: 304)
P01A05	RYALS (SEQ ID NO: 305) (Kabat); GGVFSRY (SEQ ID NO: 306) (Chothia); GGVFSRYALS (SEQ ID NO: 307) (Extendida)	IPMLGF (SEQ ID NO: 308) (Chothia) GGIIPMLGFANYAQK FQG (SEQ ID NO: 309) (Kabat)	LDFGALDY (SEQ ID NO: 3110)

P08B03	SYDIS (SEQ ID NO: 311) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 295) (Chothia); GGTFSSYDIS (SEQ ID NO: 312) (Extendida)	RIIPSGAANYAQKF QG (SEQ ID NO: 313) (Kabat) IPSGA (SEQ ID NO: 314) (Chothia)	DDGEGWTPPGY (SEQ ID NO: 315)
P5F7g; P10A02g; P10A04g; P10A05g; P10A07g; P10B03g; P10B06g	SYAMN (SEQ ID NO: 316) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 317) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 318) (Extendida)	SISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 319) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 320) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 321)
P5F7g2; P5F7g3	SYAMN (SEQ ID NO: 316) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 317) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 318) (Extendida)	AISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 322) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 320) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 321)
P5F7g4	SYAMS (SEQ ID NO: 138) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 317) (Chothia); GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 140) (Extendida)	AISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 322) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 320) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 321)
Cadena ligera			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
P4F6	RASHSVSSSYLA (SEQ ID NO: 144)	GASSRAT (SEQ ID NO: 145)	QQYGSPPT (SEQ ID NO: 146)
P4C7	RASQYVSASLLA (SEQ ID NO: 147)	GASTRAT (SEQ ID NO: 148)	QQYARSST (SEQ ID NO: 149)
P3A1	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 150)	AASSLQS (SEQ ID NO: 151)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 152)

P5A3	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 153)	EVSKRPS (SEQ ID NO: 154)	SSYAGSNTVV (SEQ ID NO: 155)
P9B5	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 156)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 157)	AAWDDSLSGVV (SEQ ID NO: 158)
P9F1	SGSGSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 159)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 160)	AAWDGSLSRPV (SEQ ID NO: 161)
P1B4	RASQSVNEQLA (SEQ ID NO: 162)	DASSRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYGSPPLT (SEQ ID NO: 164)
P1B11	RASQSVSSELA (SEQ ID NO: 165)	DASSRAT (SEQ ID NO: 166)	QQYDSSPLT (SEQ ID NO: 167)
P7H3	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 168)	YSDRPS (SEQ ID NO: 169)	QVWDSSTAWV (SEQ ID NO: 170)
P3E10	RASQSVPSQLA (SEQ ID NO: 171)	DASSRAT (SEQ ID NO: 172)	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 173)
P1A5	RASQAVDSSDLA (SEQ ID NO: 174)	DAYTRPS (SEQ ID NO: 175)	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 176)
P5F7	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 177)	DTFTRAT (SEQ ID NO: 178)	QQYGSSPPT (SEQ ID NO: 179)
P4H11	RASQSVSNTYLA (SEQ ID NO: 180)	DTSSRAT (SEQ ID NO: 181)	QQYGSSLT (SEQ ID NO: 182)
P15F7	RASQSISTYLN (SEQ ID NO: 183)	AASNLQS (SEQ ID NO: 184)	QQSYSIPLT (SEQ ID NO: 185)
P12B6	RASQIVSSSYLA (SEQ ID NO: 186)	GASSRAS (SEQ ID NO: 187)	QQYGGSPYT (SEQ ID NO: 188)
P8B6	RASQSVSHSYLA (SEQ ID NO: 189)	GASFRAA (SEQ ID NO: 190)	QQYGSDPYT (SEQ ID NO: 191)
P14G2	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 192)	DASDLQR (SEQ ID NO: 193)	QQSYNTPWT (SEQ ID NO: 194)
P7F9	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 195)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 196)	QVWDSSSDHWV (SEQ ID NO: 197)
P08B06EE	RASQSVSHSYLA (SEQ ID NO: 323)	GASFRAA (SEQ ID NO: 324)	QQYGSEPYT (SEQ ID NO: 325)
P04A04	RASQSVTSSQLA (SEQ ID NO: 326)	GASFRAA (SEQ ID NO: 324)	QQYGSSLLIT (SEQ ID NO: 327)

P01A05	RASQAVDSSDLA (SEQ ID NO: 328)	DAYTRPS (SEQ ID NO: 329)	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 330)
P08B03	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 331)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 332)	QQYGSPYT (SEQ ID NO: 333)
P5F7g	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 331)	DTFTRAT (SEQ ID NO: 334)	QQYGSSPPT (SEQ ID NO: 335)
P10A02g	RASQDVSDLLA (SEQ ID NO: 336)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 332)	QQYASSPIT (SEQ ID NO: 337)
P10A04g	RASQKVSDLLA (SEQ ID NO: 338)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 332)	QQYTGSPIT (SEQ ID NO: 339)
P10A05g	RASLSVSDLLA (SEQ ID NO: 340)	DAYS RAT (SEQ ID NO: 341)	QQYSSNPIT (SEQ ID NO: 342)
P10A07g	RASGSVSDLLA (SEQ ID NO: 343)	DAYS RAT (SEQ ID NO: 341)	QQYASYPIT (SEQ ID NO: 344)
P10B03g	RASQSVSDLLA (SEQ ID NO: 345)	DAFSRAT (SEQ ID NO: 346)	QQYGTTPIT (SEQ ID NO: 347)
P10B06g	RASESVSDLLA (SEQ ID NO: 348)	DAYS RAT (SEQ ID NO: 341)	QQYSASPIT (SEQ ID NO: 349)
P5F7g2	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 331)	DTFTRAT (SEQ ID NO: 334)	QQYGSSPPT (SEQ ID NO: 335)
P5F7g3; P5F7g4	RASQSVSSLLA (SEQ ID NO: 350)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 332)	QQYTGSPIT (SEQ ID NO: 339)

La invención abarca modificaciones de los CAR y polipéptidos de la invención que se muestran en la Tabla 2, lo que incluye CAR funcionalmente equivalentes que tiene modificaciones que no afectan de forma significativa sus propiedades y variantes que potenciaron o disminuyeron la actividad y/o afinidad. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada a FLT3. La modificación de polipéptidos es una práctica de rutina en la técnica y no es necesario describirla en detalle en la presente. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambian la actividad funcional de forma significativamente perjudicial o que maduran (potencian) la afinidad del polipéptido para su ligando, o el uso de análogos químicos.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que varían en cuanto a la longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos,

así como también inserciones intrasecuencia de un único o de múltiples residuos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N o el anticuerpo fusionado a una etiqueta de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en la circulación sanguínea.

Las variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido eliminado en la molécula del anticuerpo y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se ilustran sustituciones conservadoras en la Tabla 4 con el título “sustituciones conservadoras”. Si dichas sustituciones produjeran un cambio de la actividad biológica, podrían introducirse cambios más sustanciales, denominados “ejemplos de sustituciones” en la Tabla 4, o como se describen adicionalmente más adelante con referencia a las clases de aminoácidos, y podrían analizarse los productos.

Tabla 4: Sustituciones de aminoácidos

Residuo original (aminoácido de origen natural)	Sustituciones conservadoras	Ejemplos de sustituciones
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

En algunas modalidades, se proporciona en la presente un CAR que comprende un dominio de unión al ligando extracelular que se une a FLT3 y compite por la unión a FLT3 con un CAR descrito en la presente, que incluye un CAR que comprende un dominio extracelular que comprende P4F6, P4C7, P3A1, P5A3, P9B5, P9F1, P1B4, P1B11, P7H3, P3E10, P1A5, P5F7, P4H11, P15F7, P12B6, P8B6, P14G2, P7F9, P08B06EE, P04A04, P01A05, P08B03, P5F7g, P10A02g, P10A04g, P10A05g, P10A07g, P10B03g, P10B06g, P5F7g2, P5F7g3 y P5F7g4.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente un CAR que se une específicamente a FLT3, donde el CAR comprende una región VH que comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 4; y/o una región VL que comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, se proporciona en la presente un CAR que se une específicamente a FLT3, donde el CAR comprende una región VH que comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 6; y/o una región VL que comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la invención proporciona un CAR que se une específicamente a FLT3, donde el CAR comprende una región VH que comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 10; y/o una región VL que comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, se proporciona en la presente un CAR que se une específicamente a FLT3, donde el CAR comprende una región VH que comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 20; y/o una región VL que comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 19.

En algunas modalidades, la invención proporciona también CAR que comprenden partes de CDR de anticuerpos contra FLT3 en función de las regiones de contacto de CDR. Las regiones de contacto de CDR son regiones de un anticuerpo que otorgan especificidad al anticuerpo para un antígeno. En general, las regiones de contacto de CDR incluyen las posiciones de residuos en las CDR y zonas de Vernier que están limitadas para mantener una estructura de bucle adecuada para que el anticuerpo se una a un antígeno específico. Ver, por ejemplo, Makabe et ál., J. Biol. Chem., 283:1156-1166, 2007. Se conoce en la técnica la determinación de las regiones de contacto de CDR.

La afinidad de unión (K_D) del dominio de unión al ligando del CAR específico para FLT3, como se describe en la presente para FLT3 (tal como FLT3 humana (por ejemplo, (SEQ ID NO: 198) puede ser, por ejemplo, de alrededor de 0.1 a alrededor de 1000 nM, por ejemplo, de alrededor de 0.5 nM a alrededor de 500 nM o, por ejemplo, de alrededor de 1 nM a alrededor de 250 nM. En algunas modalidades, la afinidad de unión de alrededor de cualquiera de 1000 nM, 750 nM, 500 nM, 400 nM, 300 nM, 250 nM, 200 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 45 nM, 40 nM, 35 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 19 nM, 18 nM, 17 nM, 16 nM, 15 nM, 10 nM, 8 nM, 7.5 nM, 7 nM, 6.5 nM, 6 nM, 5.5 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.3 nM o 0.1 nM.

En algunas modalidades, la afinidad de unión (K_D) del scFv del dominio de unión al ligando del CAR específico para FLT3, como se describe en la presente para FLT3, es de alrededor de 10 nM a alrededor de 100 nM, de alrededor de 10 nM a alrededor de 90 nM, de alrededor de 10 nM a alrededor de 80 nM, de alrededor de 20 nM a alrededor de 70 nM, de alrededor de 25 nM a alrededor de 75 nM, o de alrededor de 40 nM a alrededor de 110 nM. En una modalidad, las afinidades de unión del scFv descrito en este párrafo son para la FLT3 humana.

En algunas modalidades, la afinidad de unión (K_D) del scFv del dominio de unión al ligando del CAR específico para FLT3, como se describe en la presente con respecto al dominio 4 del dominio extracelular de FLT3 humana, es de alrededor de 1 nM a alrededor de 100 nM, de alrededor de 10 nM a alrededor de 100 nM, de alrededor de 20 nM a alrededor de 100 nM, de alrededor de 25 nM a alrededor de 105 nM, de alrededor de 40 nM a alrededor de 80 nM, de alrededor de 40 nM a alrededor de 100 nM, o de alrededor de 50 nM a alrededor de 100 nM.

En algunas modalidades, la afinidad de unión (K_D) del scFv del dominio de unión al ligando del CAR específico para FLT3, como se describe en la presente con respecto al dominio 2-3 del dominio extracelular de FLT3 humana, es de alrededor de 5 nM a 30 nM, de alrededor de 5 nM a alrededor de 25 nM, de alrededor de 10 nM a alrededor de 30 nM, de alrededor de 10 nM a alrededor de 40 nM, o de alrededor de 10 nM a alrededor de 25 nM.

En un ejemplo de modalidad, la K_D del ScFv se mide tal como se describe en el Ejemplo 1.

En algunas modalidades, la afinidad de unión es menor que alrededor de cualquiera de 1000 nM, 900 nM, 800 nM, 250 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 7.5 nM, 7 nM, 6.5 nM, 6 nM, 5 nM.

Epítomos específicos para anticuerpos monoclonales

En algunas modalidades, el dominio extracelular de cualquiera los CAR específicos para FLT3 descritos en la presente pueden comprender uno o más epítomos específicos para un anticuerpo monoclonal (es decir, que lo reconocen de forma específica). Estos epítomos también se denominan en la presente epítomos específicos para mAb. En estas modalidades, el dominio

extracelular comprende los polipéptidos de VH y VL que se unen específicamente a FLT3 y uno o más epítopos que se unen a uno o más anticuerpos monoclonales (mAb). Los CAR que comprenden estos epítopos específicos para mAb pueden ser de cadena simple o de múltiples cadenas.

- 5 La inclusión de epítopos específicos para anticuerpos monoclonales en el dominio extracelular de los CAR descritos en la presente permite la clasificación y el agotamiento de las células inmunitarias modificadas que expresan los CAR. En algunas modalidades, esta característica también promueve la recuperación de células que expresan FLT3 endógenas que se agotaron mediante la administración de células inmunitarias modificadas que expresan los CAR.
- 10 Por consiguiente, en algunas modalidades, la presente invención hace referencia a un método para clasificar y/o agotar las células inmunitarias modificadas dotadas de los CAR que comprenden epítopos específicos para mAb y un método para promover la recuperación de células que expresan FLT3 endógenas, tales como células progenitoras de médula ósea.
Pueden usarse varias parejas de anticuerpos monoclonales y epítopos para generar CAR que
- 15 comprenden epítopos específicos para anticuerpos monoclonales; en particular, a modo de ejemplo no taxativo, aquellos ya aprobados para uso médico, tales como rituximab/epítopo de CD20.
En algunas modalidades, el anticuerpo monoclonal específico para el epítopo puede conjugarse con un fármaco citotóxico. También es posible promover la citotoxicidad CDC mediante el uso de
- 20 anticuerpos modificados sobre los cuales se injertan componentes del sistema de complemento. En algunas modalidades, la activación de los linfocitos T con CAR puede modularse al agotar las células mediante el uso de un anticuerpo que reconoce el epítopo.
La invención también abarca métodos para clasificar las células inmunitarias modificadas dotadas con los CAR específicos para FLT3 que expresan el o los epítopos específicos para mAb y
- 25 métodos terapéuticos donde la activación de las células inmunitarias modificadas dotadas con estos CAR se modula al agotar las células mediante el uso de un anticuerpo que se dirige al dominio de unión al ligando de dichos CAR.
Los CAR que comprenden uno o más epítopos reconocidos específicamente por un anticuerpo monoclonal se describen en WO2016/120216, que se incorpora a la presente mediante esta
- 30 referencia en su totalidad. El epítopo puede seleccionarse de cualquier cantidad de epítopos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el epítopo puede ser un objetivo de un anticuerpo monoclonal aprobado para uso médico, tal como, por ejemplo, de modo no taxativo, el epítopo de CD20 reconocido por rituximab. En algunas modalidades, el epítopo comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 229.
- 35 CPYSNPSLC (SEQ ID NO: 229)

En algunas modalidades, el epítipo puede ubicarse entre el scFv y la bisagra de un CAR. En algunas modalidades, pueden usarse en el CAR dos instancias del mismo epítipo separadas por enlazadores. Por ejemplo, puede usarse dentro de un CAR, entre la región variable de cadena ligera y la bisagra, un polipéptido que comprende 2 copias del epítipo que se muestra en la SEQ ID NO: 229, separadas por enlazadores, como se muestra en GSGGGGSCPYNSP~~SL~~CSGGGGSCPYNSP~~SL~~CSGGGGGS (SEQ ID NO: 230).

En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR que comprende los polipéptidos de VH y VL y el o los epítopos específicos para mAb pueden tener estructuras distintas en función de la posición de inserción del epítipo y el uso de enlazadores. Por ejemplo, el dominio de unión extracelular del CAR específico para FLT3 que comprende epítopos específicos para mAb puede tener una de las siguientes estructuras:

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$;

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$;

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ -Epítipo3- $(L)_x$;

$(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2$;

$(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2$;

Epítipo1- $(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ -Epítipo3- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2$;

$(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$;

$(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ -Epítipo3- $(L)_x$;

$(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ -Epítipo3- $(L)_x$ -Epítipo4- $(L)_x$;

$(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítipo3- $(L)_x$;

$(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítipo3- $(L)_x$ -Epítipo4- $(L)_x$;

$V_1-(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - V_2 ;

$V_1-(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$;

$V_1-(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ -Epítipo3- $(L)_x$;

$V_1-(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ -Epítipo3- $(L)_x$ -Epítipo4- $(L)_x$;

$(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - $V_1-(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ - V_2 ; o

$(L)_x$ -Epítipo1- $(L)_x$ - $V_1-(L)_x$ -Epítipo2- $(L)_x$ - $V_2-(L)_x$ -Epítipo3- $(L)_x$;

donde,

V_1 es V_L y V_2 es V_H o V_1 es V_H y V_2 es V_L ;

L_1 es un enlazador adecuado para unir la cadena de V_H a la cadena de V_L ;

L es un enlazador que comprende residuos de glicina y serina, y cada aparición de L en el dominio de unión extracelular puede ser idéntica o distinta a otra aparición de L en el mismo dominio de unión extracelular; por ejemplo, SGGGG, GGGGS o SGGGGS; y

x es 0 o 1 y cada aparición de x se selecciona independientemente de las otras; y

el Epítopo 1, Epítopo 2, Epítopo 3 y Epítopo 4 son epítomos específicos para mAb y pueden ser idénticos o distintos. En algunas modalidades, el Epítopo 1, Epítopo 2 y Epítopo 4 son un epítopo específico para mAb con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 229 y el Epítopo 3 es un epítopo específico para mAb con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 231.

- 5 En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR comprende la siguiente secuencia

$V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítopo1- $(L)_x$ -Epítopo2- $(L)_x$; o

$(L)_x$ -Epítopo1- $(L)_x$ - $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -Epítopo2- $(L)_x$ -Epítopo3- $(L)_x$ -Epítopo4- $(L)_x$. donde V_1 , V_2 , L_1 , L , x y Epítopo 1, Epítopo 2, Epítopo 3 y Epítopo 4 son tal como se definió anteriormente.

- 10 En algunas modalidades, cualquiera de los CAR específicos para FLT3 descritos en la presente puede comprender uno o más epítomos específicos para mAb de un epítopo de CD52, un epítopo de CD20, un epítopo de CD3, un epítopo de CD41, un epítopo de CD25, un epítopo de CD30, un epítopo de EGFR, un epítopo de $TNF\alpha$, un epítopo de VEGF, un epítopo de proteína de complemento de C5, un epítopo de CD11a, un epítopo de CD33, un epítopo de alfa-4 integrina, un
15 epítopo de región Fc de IgE, un epítopo de proteína F de RSV, un epítopo de receptor de IL-6, un epítopo de receptor de HER2, un epítopo de integrina $\alpha_4\beta_7$, un epítopo de BAFF (factor de activación de linfocitos B), un epítopo de IL-1 β , un epítopo de RANKL, un epítopo de CTLA4, un epítopo de CD34, un epítopo de IL-12 y/o un epítopo de IL-23.

- En algunas modalidades, los CAR específicos para FLT3 descritos en la presente pueden
20 comprender uno o más epítomos específicos para mAb que se seleccionan de epítomos reconocidos específicamente por alemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, muromonab-CD3, tositumomab, abciximab, basiliximab, brentuximab vedotin, cetuximab, infliximab, rituximab, bevacizumab, certolizumab pegol, daclizumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, natalizumab, omalizumab, palivizumab, ranibizumab, tocilizumab, trastuzumab, vedolizumab, adalimumab,
25 belimumab, canakinumab, denosumab, golimumab, ipilimumab, ofatumumab, panitumumab, QBEND-10 y/o ustekinumab.

En algunas modalidades, los CAR específicos para FLT3 comprenden uno o más epítomos específicos para mAb que se seleccionan de los epítomos descritos en la Tabla 5:

- Tabla 5: Ejemplos de epítomos específicos para mAb que pueden usarse en el dominio de unión
30 extracelular de los CAR específicos para FLT3 de la invención, tal como, por ejemplo, mimótopos y epítomos con su mAb correspondiente

Rituximab		
Mimótopo	SEQ ID NO: 229	CPYSNPSLC

Palivizumab		
Epítopo	SEQ ID NO: 255	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN
Cetuximab		
Mimótopo 1	SEQ ID NO: 256	CQFDLSTRRLKC
Mimótopo 2	SEQ ID NO: 257	CQYNLSSRALKC
Mimótopo 3	SEQ ID NO: 258	CVWQRWQKSYVC
Mimótopo 4	SEQ ID NO: 259	CMWDRFSRWYKC
Nivolumab		
Epítopo 1	SEQ ID NO: 260	SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDR
Epítopo 2	SEQ ID NO: 261	SGTYLCGAISLAPKAQIKE
QBEND-10		
Epítopo	SEQ ID NO: 262	ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTA
Alemtuzumab		
Epítopo	SEQ ID NO: 263	GQNDTSQTSSPS

El dominio de señalización intracelular de un CAR de acuerdo con la invención es responsable de la señalización intracelular después de la unión del dominio de unión al ligando extracelular al objetivo, lo que da como resultado la activación de la célula inmunitaria y la respuesta inmunitaria.

- 5 El dominio de señalización intracelular tiene la capacidad de activar al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la cual se expresa el CAR. Por ejemplo, la función efectora de un linfocito T puede ser una actividad citolítica o actividad auxiliar, lo que incluye la secreción de citocinas.

- 10 En algunas modalidades, un dominio de señalización intracelular para utilizar en un CAR puede ser la secuencia citoplasmática, por ejemplo, de modo no taxativo, del receptor y correceptores de linfocitos T que actúan de forma conjunta para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento con el receptor de antígenos, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional. Los dominios de señalización intracelular comprenden dos clases distintas de secuencias de señalización
- 15 citoplasmáticas: las que inician la activación primaria dependiente del antígeno y las que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimulante. Las secuencias de señalización citoplasmática primaria pueden contener motivos de señalización que se conocen como “motivos de activación basados en el inmunorreceptor de tirosina” o “iITAM”. Los ITAM son motivos de señalización bien definidos que se hallan en la cola intracitoplasmática de
- 20 una variedad de receptores que funcionan como sitios de unión para las tirosinas cinasas de la

clase syk/zap70. Los ejemplos de ITAM utilizados en la invención pueden incluir, a modo de ejemplo no taxativo, los derivados de TCR ζ , FcR γ , FcR β , FcR ϵ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender el dominio de señalización CD3 ζ que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 70 %, por ejemplo, al menos 80 % o al menos 90 %, 95 %, 97 % o 99 % con respecto a una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 210. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención comprende un dominio de una molécula coestimulante.

En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular de un CAR de la invención comprende una parte de una molécula coestimulante que se selecciona del grupo que consiste en un fragmento de 41BB (GenBank: AAA53133.) y CD28 (NP_006130.1). En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 70 %, por ejemplo, al menos 80 % o al menos 90 %, 95 %, 97 % o 99 % con respecto a una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 209 y la SEQ ID NO: 213. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular del CAR de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una identidad de secuencia de al menos 70 %, por ejemplo, al menos 80 % o al menos 90 %, 95 %, 97 % o 99 % con respecto a una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 209 y la SEQ ID NO: 214.

Los CAR se expresan en la membrana superficial de la célula. Por lo tanto, el CAR puede comprender un dominio transmembrana. Los dominios transmembrana adecuados para un CAR descrito en la presente tienen la capacidad de (a) expresarse en la superficie de una célula, por ejemplo, una célula inmunitaria tal como, por ejemplo, de modo no taxativo, linfocitos o linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés) y (b) interactuar con el dominio de unión al ligando y dominio de señalización intracelular para dirigir la respuesta celular de la célula inmunitaria contra una célula objetivo predefinida. El dominio transmembrana puede derivar de una fuente natural o sintética. El dominio transmembrana puede derivarse de cualquier proteína unida a una membrana o transmembrana. A modo de ejemplo no taxativo, el polipéptido transmembrana puede ser una subunidad del receptor de linfocitos T, tal como α , β , γ o δ , polipéptido que constituye el complejo de CD3, receptores de linfocitos T de IL-2 p55 (cadena α), p75 (cadena β) o cadena γ , cadena de subunidad de receptores de Fc, en receptor III de Fc γ , o proteínas CD. De manera alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético y puede comprender residuos predominantemente hidrofóbicos tales como leucina y valina. En algunas modalidades, dicho dominio transmembrana deriva de la cadena de CD8 α humana (por ejemplo, NP_001139345.1).

El dominio transmembrana se enlaza al dominio de unión al ligando extracelular a través de un

dominio de tallo (también denominado dominio bisagra). Un dominio de tallo puede comprender hasta 300 aminoácidos, por ejemplo, de 10 a 100 aminoácidos o de 25 a 50 aminoácidos. La región de tallo puede derivar de la totalidad o parte de las moléculas de origen natural, tal como, la totalidad o parte de la región extracelular de CD8, CD4 o CD28, o la totalidad o parte de una región constante de anticuerpo. De manera alternativa, el dominio de tallo puede ser una secuencia sintética que corresponde a una secuencia de tallo de origen natural, o puede ser una secuencia de tallo completamente sintética. En algunas modalidades, dicho dominio de tallo es parte de la cadena de CD8 α humana (por ejemplo, NP_001139345.1). En otra modalidad particular, dichos dominios transmembrana y bisagra comprenden una parte de la cadena de CD8 α humana, por ejemplo, que comprende una identidad de secuencia de al menos 70 % o al menos 80 %, 90 %, 95 % 97 % o 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 206 y 208. En algunas modalidades, el dominio de tallo de los CAR específicos para FLT3 descrito en la presente comprende una bisagra de CD8 α , una bisagra de IgG1 y una bisagra de Fc γ RIII α . En algunas modalidades, el dominio de tallo comprende una bisagra de CD8 α humana, una bisagra de IgG1 humana o una bisagra de Fc γ RIII α humana. En algunas modalidades, los CAR descritos en la presente pueden comprender un dominio de unión al ligando extracelular que se une específicamente a FLT3, los dominios transmembrana y bisagra de CD8 α humana, el dominio de señalización de CD3 ζ y el dominio de señalización de 4-1BB. La Tabla 6 proporciona ejemplos de secuencias de dominios que pueden usarse en los CAR descritos en la presente.

Tabla 6: Ejemplos de secuencias de componentes de CAR

Dominio	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
Péptido señal de CD8 α	MALPVTALLLPLALLLHAARP	204
Bisagra de Fc γ RIII α	GLAVSTISSFFPPGYQ	205
Bisagra CD8 α	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACD	206

Bisagra IgG1	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	207
Dominio transmembrana (YM) de CD8 α	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	208
Dominio de señalización intracelular (ISD) de 41BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE L	209
Dominio de señalización intracelular (ISD) de CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	210
Fc ϵ RI α -TM-IC (dominio intracelular y transmembrana de la cadena α de Fc ϵ RI)	FFIPLLVLFAVDTGLFISTQQQVTFLLKIKRTRKGFRLNPHP KPNPKNN	211
Fc ϵ RI β - Δ ITAM (cadena β de Fc ϵ RI sin ITAM)	MDTESNRRANLALPQEPSSVPAFEVLEISPQEVSSGRLLKSA SSPPLHTWLTVLKKEQEFLGVTQILTAMICLCFGTVVCSVLDIS HIEGDIFSSFKAGYPFWGAIFFSISGMLSIIISERNATYLVGRS LGANTASSIAGGTGITILIINLKSLAYIHHSQCQKFETKCFMAS FSTEIVMMMLFLTILGLGSAVSLTICGAGEELKGNKVPE	212
41BB-IC (dominio coestimulante de 41BB)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE L	213
CD28-IC (dominio coestimulante de CD28)	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S	214

FcεRIγ-SP (péptido señal)	MIPAVVLLLLLLVEQAAA	215
FcεRI γ-ΔITAM (cadena γ de FcεRI sin ITAM)	LGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEKS	216
GSG-P2A (polipéptido de omisión ribosomal de GSG-P2A)	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	217
GSG-T2A (polipéptido de omisión ribosomal de GSG-T2A)	GSGEGRGSLLTCDGVEENPGP	218

Se observa comúnmente en células cancerosas la regulación por disminución o mutación de antígenos objetivo, lo que crea variantes de escape de pérdida de antígenos. Por lo tanto, para compensar el escape tumoral y hacer a las células inmunitarias más específicas al objetivo, el

5 CAR específico para FLT3 puede comprender uno o más dominios de unión al ligando extracelular adicionales, para unir de forma simultánea distintos elementos del objetivo, mediante lo cual se aumenta la activación y función de las células inmunitarias. En algunas modalidades, los dominios de unión al ligando extracelular puede colocarse en tándem en el mismo polipéptido transmembrana y, opcionalmente, pueden separarse a través de un enlazador. En algunas

10 modalidades, dichos dominios de unión al ligando extracelular distintos pueden colocarse en distintos polipéptidos transmembrana que conforman el CAR. En algunas modalidades, la invención hace referencia a una población de CAR, donde cada CAR comprende un distinto dominio de unión al ligando extracelular. En particular, la invención hace referencia a un método para modificar células inmunitarias que comprende proporcionar una célula inmunitaria y expresar

15 en la superficie de la célula una población de CAR, donde cada CAR comprende distintos dominios de unión al ligando extracelular. En otra modalidad particular, la invención hace referencia a un método para modificar una célula inmunitaria que comprende proporcionar una célula inmunitaria e introducir en la célula polinucleótidos que codifican polipéptidos que conforman una población de CAR, donde cada uno comprende distintos dominios de unión al ligando extracelular. Por

20 población de CAR se entiende al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más CAR, donde cada uno comprende distintos dominios de unión al ligando extracelular. Los distintos dominios de unión al ligando extracelular de acuerdo con la invención, por ejemplo, pueden unir de forma simultánea

diferentes elementos en el objetivo, mediante lo cual se aumenta la activación y función de las células inmunitarias. La invención también hace referencia a una célula inmunitaria aislada que comprende una población de CAR, donde cada uno comprende distintos dominios de unión al ligando extracelular.

- 5 En otro aspecto, se proporcionan en la presente polinucleótidos que codifican cualquiera de los CAR y polipéptidos descritos en la presente. Los polinucleótidos pueden confeccionarse y expresarse a través de procedimientos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, se proporcionan en la presente composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de las células de la invención. En algunas
10 modalidades, la composición comprende una célula que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los CAR descritos en la presente. En aun otras modalidades, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos que se muestran en la SEQ ID NO: 245 y la SEQ ID NO:246 que figuran a continuación:

15 *Región variable de cadena pesada de P3E10*

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGAAGAAGCCAGGCAGCTCCGTGAAGGTGT
CCTGCAAGGCCTCTGGCGGCACATTCTCTAGCTACGCCATCCAGTGGGTGCGGCAGGCACCA
GGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGAGGAATCGTGGAAGCTGGGGCCTGGCAAACCTACGCCC
AGAAGTTTCAGGGCAGAGTGACCATCACACCGATAAGTCTACAAGCACCGCCTATATGGAGC
20 TGTCTCTCTGAGGTCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCACCTCCGCCTTCGGCGAG
CTGGCATCTTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGAGCTCC (SEQ ID NO: 245)

Región variable de cadena ligera de P3E10

GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCAGGCACCCTGTCCCTGTCTCCAGGAGAGAGGGCCACACT
25 GTCCTGTAGGGCCAGCCAGTCCGTGCCTTCTAGCCAGCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAG
GCCAGGCCCCCAGACTGCTGATCTATGACGCCTCCTCTAGAGCCACAGGCATCCCAGATAGG
TTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTTACACTGACCATCTCCAGGCTGGAGCCCCGAGGA
TTTCGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTACGGCAGCTCCCCTCTGACATTTGGCCAGGGCACCAA
GGTGGAGATCAAGG (SEQ ID NO: 246)

30 En aun otras modalidades, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos que se muestran en la SEQ ID NO: 247 y la SEQ ID NO:248 que figuran a continuación:

Región variable de cadena pesada de P3A1

35 CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGCAGCTCCGTGAAGGTGT

CTTGCAAGGCCAGCGGCGGCACATTCTCTAGCTACGATATCTCTTGGGTGAGGCAGGCCCCA
 GGCCAGGGACTGGAGTGGATGGGAGGAATCATCCCCGTGAGCGGAAGGGCAAACCTACGCAC
 AGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCATCACACAGACAAGTCCACATCTACCGCCTATATGGAG
 CTGTCCTCTCTGAGAAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGTGAGGCCTACCTA
 5 CTGGCCACTGGACTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGAGCTCC (SEQ ID NO: 247)

Región variable de cadena ligera de P3A1

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCTAGCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGATAGAGTGACAAT
 CACCTGTAGGGCCTCTCAGAGCATCTCCTCTTACCTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAA
 10 GGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCAGCAAGCTCCCTGCAGTCCGGAGTGCCATCTCGGTTCT
 CCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACACTGACCATCTCTAGCCTGCAGCCTGAGGATTTC
 GCCACCTACTATTGCCAGCAGTCCTATTCTACACCACTGACCTTTGGCCAGGGGCACAAAGGTG
 GAGATCAAG (SEQ ID NO: 248).

15 En aun otras modalidades, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos que se muestran en la SEQ ID NO: 249 y la SEQ ID NO:250 que figuran a continuación:

Región variable de cadena pesada de P9B5

GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA
 20 GCTGCGCAGCATCCGGCTTCATCTTTGCCTCTTACGCAATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCT
 GGCAAGGGACTGGAGTGGGTGAGCGAGATCAGCTCCTCTGGCGGCAGCACCATATGCCG
 ACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACAATCAGCCGGGACAACCTCTAAGAATACCCTGTACCTGCAG
 ATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGATAGAGTGATGGC
 CGGCCTGGGCTATGACCCATTTGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGAGCTCC
 25 (SEQ ID NO: 249).

Región variable de cadena ligera de P9B5

CAGAGCGTGCTGACCCAGCCACCTTCCGCCTCTGGAACACCCGGCCAGAGGGTGACCATCA
 GCTGTTCCGGCTCTAGCTCCAACATCGGCTCCAATTACGTGTATTGGTACCAGCAGCTGCCCCG
 30 GCACAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACAGAAACAATCAGAGGCCATCTGGCGTGCCCGACCGC
 TTCTCTGGCAGCAAGTCCGGCACCTCTGCCAGCCTGGCAATCAGCGGACTGCGGTCCGAGGA
 CGAGGCCGATTACTATTGCGCAGCATGGGACGATTCCCTGTCTGGAGTGGTGTTTGGCGGCG
 GCACAAAGCTGACCGTGCTG (SEQ ID NO: 250).

35 En aun otras modalidades, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos que se

muestran en la SEQ ID NO: 251 y la SEQ ID NO:252 que figuran a continuación:

Región variable de cadena pesada de P4C7

5 CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGAAGAAGCCTGGCAGCTCCGTGAAGGTGT
CTTGCAAGGCCAGCGGCGGCACATTCTCTAGCTACACCATCTCCTGGGTGCGGCAGGCCCA
GGCCAGGGACTGGAGTGGATGGGAGGAATCATCCAGCCTTCGGCATCGCCAACTACGCCC
AGAAGTTTCAGGGCCGCGTGACAATCACCGCCGACAAGTCCACATCTACCGCCTATATGGAG
CTGTCCTCTCTGCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGCGCCAAGGGCGGCAGCTACTC
CCTGGACTATTTTGATATCTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGAGCTCC (SEQ ID NO:
10 251)

Región variable de cadena ligera de P4C7

GAGATCGTGCTGACACAGTCCCCTGGCACCCCTGTCTCTGAGCCCAGGCGAGAGGGCCCACT
GTCCTGTAGGGCATCTCAGTACGTGTCCGCCTCTCTGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTG
15 GCCAGGCCCAAGACTGCTGATCTACGGAGCATCCACAAGAGCCACCGGCATCCCCGACAG
GTTTCAGCGGCTCCGGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGACCATCTCTAGACTGGAGCCTGAGG
ACTTCGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTATGCCAGGTCTAGCACATTTGGCCAGGGCACCAAG
GTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 252)

20 Se describen además en la presente vectores de expresión y la administración de composiciones de polinucleótidos.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para confeccionar cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente.

La invención también abarca polinucleótidos complementarios a cualquiera de estas secuencias.

25 Los polinucleótidos pueden ser de cadena simple (codificante o antisentido) o de cadena doble, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARN_{nh}, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de forma individual, y moléculas de ARN_m, que no contienen intrones. Pueden encontrarse presentes dentro de un polinucleótido de la invención, pero no necesariamente, secuencias codificantes o no
30 codificantes adicionales, y un polinucleótido puede estar enlazado a otras moléculas y/o materiales de soporte, pero no necesariamente.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia natural (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una parte de este) o pueden comprender una variante de esta secuencia. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones,
35 delecciones y/o inserciones de forma tal que no disminuya la inmunorreactividad del polipéptido

codificado con respecto a una molécula inmunorreactiva natural. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado puede evaluarse en términos generales tal como se describe en la presente. Las variantes generalmente presentan una identidad de al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 % o incluso al menos alrededor de 90 % o 95 % con respecto a una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo natural o una parte de este.

Se dice que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son “idénticas” si las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de las dos secuencias son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima según se describe más adelante. Las comparaciones entre dos secuencias se llevan a cabo típicamente al comparar la secuencia en una ventana de comparación para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Tal como se usa en la presente, una “ventana de comparación” hace referencia a un segmento de al menos alrededor de 20 posiciones contiguas, normalmente de 30 a alrededor de 75, o de 40 a alrededor de 50, donde una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia con la misma cantidad de posiciones contiguas luego de haber alineado las dos secuencias de manera óptima.

La alineación óptima de las secuencias para compararlas puede llevarse a cabo mediante el uso del programa Megalign de la suite de Lasergene de software bioinformático (DNASTAR, Inc., Madison, WI), con los parámetros por defecto. Este programa representa varios esquemas de alineación descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

En general, el “porcentaje de identidad de secuencia” se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas de forma óptima en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, donde la parte de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos, normalmente de 5 a 15 por ciento o de 10 a 12 por ciento, en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula al dividir la cantidad de posiciones en las que las

bases de ácido nucleico o residuo de aminoácido idénticas aparecen en ambas secuencias para obtener la cantidad de posiciones coincidentes, dividir la cantidad de posiciones coincidentes entre la cantidad total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

- 5 De manera adicional o alternativa, las variantes pueden ser sustancialmente homólogas con respecto a un gen natural, o una parte o complemento de este. Estas variantes de polinucleótidos pueden hibridarse en condiciones moderadamente rigurosas a una secuencia de ADN de origen natural que codifica un anticuerpo natural (o una secuencia complementaria).

- 10 Las “condiciones moderadamente rigurosas” adecuadas incluyen un prelavado en una solución de 5 X SSC, SDS al 0.5 %, EDTA 1.0 mM (pH 8.0); hibridación a 50 °C-65 °C, 5 X SSC, durante la noche; seguida por dos lavados a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de 2X, 0.5X y 0.2X SSC con SDS al 0.1 %.

- 15 Tal como se usa en la presente, “condiciones muy rigurosas” o “condiciones de rigurosidad elevada” son aquellas con: (1) uso de baja fuerza iónica y temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro de sodio 0.015 M/citrato de sodio 0.0015 M/dodecil sulfato de sodio al 0.1 % a 50 °C; (2) uso durante la hibridación de un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino al 0.1 % /Ficoll al 0.1 %/polivinilpirrolidona al 0.1 % /amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C o (3) uso de formamida al 50 %, 5xSSC (NaCl 0.75 M, citrato de sodio 20 0.075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6.8), pirofosfato de sodio al 0.1 %, 5x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón homogeneizado con ultrasonido (50 µg/ml), SDS al 0.1 % y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0.2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y un lavado de rigurosidad elevada de 0.1 x SSC con EDTA a 55 °C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, potencia iónica, etc. según sea necesario para adaptarse a factores tales como la longitud de la sonda y similares.
- 25

- Los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido tal como se describe en la presente. Algunos de estos polinucleótidos poseen una homología mínima con respecto a la secuencia de nucleótidos de cualquier gen natural. Sin embargo, se contemplan específicamente en la invención los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones. Además, se encuentran dentro del alcance de la invención los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente. Los alelos son genes endógenos alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como delecciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y proteína resultantes pueden tener una estructura o función alterada, pero no necesariamente. Los alelos pueden identificarse mediante el uso de
- 30
- 35

técnicas estándar (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias en la base de datos).

Los polinucleótidos de la invención pueden obtenerse mediante el uso de síntesis química, métodos recombinantes o PCR. Se conocen en la técnica los métodos de síntesis química de polinucleótidos y no es necesario describirlos en detalle en la presente. Un experto en la técnica puede utilizar las secuencias proporcionadas en la presente y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para la preparación de polinucleótidos mediante el uso de métodos recombinantes, un polinucleótido que comprende una secuencia deseada puede insertarse en un vector adecuado y el vector a su vez puede introducirse en una célula hospedadora para la replicación y amplificación, como se describe en la presente. Los polinucleótidos pueden insertarse en células hospedadoras a través de cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman mediante la introducción de un polinucleótido exógeno mediante la absorción directa, endocitosis, transfección, emparejamiento F o electroporación. Después de introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como vector no integrado (tal como un plásmido) o integrarse en el genoma de célula hospedadora. El polinucleótido amplificado de esta forma puede aislarse de la célula hospedadora a través de métodos conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et ál., 1989.

Alternativamente, el PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología PCR se conoce en la técnica y se describe en las patentes estadounidenses n.º 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 y 4,683,202, así como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et ál. eds., Birkauswer Press, Boston, 1994.

El ARN puede obtenerse mediante el uso del ADN aislado en un vector adecuado y su inserción en una célula hospedadora adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN puede aislarse mediante el uso de métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los que se indican en Sambrook et ál., 1989, supra, por ejemplo.

Es posible construir vectores de clonación adecuados de acuerdo con técnicas estándares, o estos pueden seleccionarse de una gran cantidad de vectores de clonación disponibles en la técnica. Si bien el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula hospedadora que se desea utilizar, los vectores de clonación útiles generalmente pueden autorreplicarse, pueden poseer un único objetivo para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden portar genes para un marcador que puede utilizarse en la selección de clones que contienen el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores transportadores, tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros

vectores de clonación se encuentran disponibles de proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

En general, los vectores de expresión son construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Se implica que un vector de expresión debe poder replicarse en las células hospedadoras, ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, de modo no taxativo, plásmidos, vectores virales, que incluyen adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y vectores de expresión descritos en la publicación PCT n.º WO 87/04462. En general, los componentes de vectores pueden incluir, de modo no taxativo, uno o más de los siguientes:

una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, elementos de control de transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y elementos de terminación). Usualmente, para la expresión (es decir, traducción) también son necesarios uno o más elementos de control de traducción, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de inicio de la traducción y codones de finalización.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula hospedadora mediante cualquiera de una cantidad de medios adecuados, que incluyen electroporación, transfección que emplea cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección e infección (por ejemplo, donde el vector es un agente infeccioso tal como el virus vaccinia). La decisión de introducir vectores o polinucleótidos dependerá, a menudo, de características de la célula hospedadora.

Un polinucleótido que codifica un CAR específico para FLT3 descrito en la presente puede existir en un casete de expresión o vector de expresión (por ejemplo, un plásmido para introducir en una célula hospedadora bacteriana o un vector viral tal como vector de baculovirus para la transfección de una célula hospedadora de insecto, o un plásmido o vector viral tal como un lentivirus para la transfección de una célula hospedadora de mamífero). En algunas modalidades, un polinucleótido o vector puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica secuencias de omisión ribosomal tales como, por ejemplo, de modo no taxativo, una secuencia que codifica un péptido 2A. Los péptidos 2A, que se identifican en el subgrupo de Aphthovirus de los picornavirus, provoca una “omisión” ribosomal de un codón al siguiente sin la formación en un enlace peptídico entre los dos aminoácidos codificados por los codones (ver (Donnelly y Elliott 2001; Atkins, Wills et ál. 2007; Doronina, Wu et ál. 2008)). Por “codón” se entiende tres nucleótidos en un ARNm (o en la cadena sentido de una molécula de ADN) que son traducidos por un ribosoma en un residuo de aminoácido. Por lo tanto, dos polipéptidos pueden sintetizarse a partir de un único marco de lectura abierto contiguo dentro de un ARNm cuando los polipéptidos se separan con una

secuencia de oligopéptido 2A que se encuentra en el marco. Estos mecanismos de omisión ribosomal se conocen en la técnica y son utilizados por varios vectores para la expresión de varias proteínas codificadas por un único ARN mensajero.

Para dirigir a los polipéptidos transmembrana hacia la vía secretora de una célula hospedadora, en algunas modalidades, se proporciona una secuencia señal de secreción (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en una secuencia de polinucleótidos o secuencia del vector. La secuencia señal de secreción se une de manera operativa a la secuencia del ácido nucleico transmembrana; es decir, las dos secuencias se unen en el marco de lectura correcto y se colocan de manera que dirijan el polipéptido recientemente sintetizado hacia la vía secretora de la célula hospedadora. Las secuencias señal de secreción se colocan comúnmente en la posición 5' con respecto a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés, aunque determinadas secuencias señal pueden colocarse en otras partes de la secuencia de ácido nucleico de interés (ver, por ejemplo, Welch et ál., patente estadounidense n.º 5,037,743; Holland et ál., patente estadounidense n.º 5,143,830). En algunas modalidades, el péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 204 o 215. Los expertos en la técnica reconocerán que, en vista de la degeneración del código genético, es posible una variación considerable de las secuencias entre estas moléculas de polinucleótidos. En algunas modalidades, las secuencias de ácido nucleico de la invención se optimizan por codones para expresarse en células de mamíferos, por ejemplo, para expresarse en células de primate (por ejemplo, ser humano o mono). La optimización por codones hace referencia al intercambio en una secuencia de interés de codones que generalmente no son comunes en genes con expresión elevada de una especie determinada por codones que son generalmente frecuentes en genes con expresión elevada de dicha especie; estos codones codifican los mismos aminoácidos que los codones que se sustituyen.

25

Métodos para modificar una célula inmunitaria

Se proporcionan en la presente métodos para preparar células inmunitarias para utilizarlas en inmunoterapia. En algunas modalidades, los métodos comprenden obtener células inmunitarias, introducir un CAR de acuerdo con la invención en las células inmunitarias y expandir las células. En algunas modalidades, la invención hace referencia a un método para modificar una célula inmunitaria que comprende: proporcionar una célula y expresar en la superficie de la célula al menos un CAR como se describió anteriormente. Los métodos para modificar células inmunitarias se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.º WO/2014/039523, WO/2014/184741, WO/2014/191128, WO/2014/184744 y WO/2014/184143, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. En

algunas modalidades, el método comprende: transfectar la célula con al menos un polinucleótido que codifica CAR como se describió anteriormente y expresar los polinucleótidos en la célula.

Antes de modificar las células, puede obtenerse una fuente de células de un sujeto a través de una variedad de métodos no taxativos. Las células pueden obtenerse de una cantidad de fuentes no

- 5 taxativas, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En algunas modalidades, es posible utilizar cualquier cantidad de líneas de linfocitos T disponibles y conocidos por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, las células pueden derivarse de un donante saludable o de un donante
- 10 que padece de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un individuo con diagnóstico de cáncer o un individuo con diagnóstico de infección. En algunas modalidades, las células pueden ser parte de una población mixta de células que presentan distintas características fenotípicas.

En algunas modalidades, los polinucleótidos están presentes en vectores lentivirales para una expresión estable en las células.

- 15 En algunas modalidades, el método puede comprender además una etapa de modificar genéticamente una célula al alterar o inactivar al menos un gen que expresa, por ejemplo, de modo no taxativo, un componente del TCR, un objetivo para un agente inmunosupresor, un gen de HLA y/o una proteína del punto de control del sistema inmunitario, tal como, por ejemplo, PDCD1 o CTLA-4. Mediante la alteración o inactivación de un gen se entiende que el gen de interés no se
- 20 expresa en forma de proteína funcional. En algunas modalidades, el gen a alterar o inactivar se selecciona del grupo que consiste, por ejemplo, de modo no taxativo, en TCR α , TCR β , CD52, receptor de glucocorticoides (GR), desoxicitidina cinasa (DCK), PD-1 y CTLA-4. En algunas modalidades, el método comprende inactivar uno o más genes al introducir en las células una endonucleasa de corte infrecuente capaz de activar de manera selectiva un gen a través de
- 25 escisión selectiva de ADN. En algunas modalidades, por ejemplo, la endonucleasa de corte infrecuente puede ser una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (nucleasa TALEN, por sus siglas en inglés) o endonucleasa Cas9.

En algunas modalidades, se usa un dominio catalítico adicional con una endonucleasa de corte infrecuente para potenciar su capacidad de inactivar genes dirigidos. Por ejemplo, un dominio catalítico adicional puede ser una enzima de procesamiento final de ADN. Los ejemplos no

30 taxativos de enzimas de procesamiento final de ADN incluyen exonucleasas 5-3', exonucleasas 3-5', exonucleasas alcalinas 5-3', endonucleasas Flap 5', helicasas, fosfatasa, hidrolasas y polimerasas de ADN independientes de la plantilla. Los ejemplos no taxativos de este dominio catalítico comprenden un dominio de proteína o derivado catalíticamente activo del dominio de

- 35 proteína que se selecciona del grupo que consiste en hExo1 (EXO1_HUMAN), Exo1 de levadura

(EXO1_YEAST), Exol de *E. coli*, TREX2 humana, TREX1 de ratón, TREX1 humana, TREX1 de bovino, TREX1 de rata, ADN2 humano de TdT (transferasa de desoxinucleotidilo terminal), ADN2 de levadura (DNA2_YEAST). En algunas modalidades, un dominio catalítico adicional puede tener una actividad de exonucleasa 3'-5' y, en algunas modalidades, dicho dominio catalítico adicional es TREX, por ejemplo, un dominio catalítico de TREX2 (WO2012/058458). En algunas modalidades, dicho dominio catalítico se codifica mediante un polipéptido TREX de cadena simple. El dominio catalítico adicional puede fusionarse a una proteína de fusión de nucleasa o proteína quimérica. En algunas modalidades, el dominio catalítico adicional se fusiona, por ejemplo, mediante el uso de un enlazador peptídico.

En algunas modalidades, el método comprende además una etapa de introducir en las células un ácido nucleico exógeno que comprende al menos una secuencia homóloga a una parte de la secuencia de ácido nucleico objetivo, de forma tal que se produzca una recombinación homóloga entre la secuencia de ácido nucleico objetivo y el ácido nucleico exógeno. En algunas modalidades, dicho ácido nucleico exógeno comprende primeras y segundas partes que son homólogas a la región 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico objetivo, respectivamente. El ácido nucleico exógeno también puede comprender una tercera parte colocada entre la primera y la segunda parte que no comprende ninguna homología con las regiones 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico objetivo. Después de la escisión de la secuencia de ácido nucleico objetivo, se estimula un evento de recombinación homóloga entre la secuencia de ácido nucleico objetivo y el ácido nucleico exógeno. En algunas modalidades, pueden usarse secuencias homólogas de al menos alrededor de 50 bp, más que alrededor de 100 bp o más que alrededor de 200 bp dentro de la matriz donante. El ácido nucleico exógeno puede tener, por ejemplo, de modo no taxativo, de alrededor de 200 bp a alrededor de 6000 bp, por ejemplo, de alrededor de 1000 bp a alrededor de 2000 bp. Las homólogías de ácido nucleico compartidas se ubican en regiones de flaqueo anteriores y posteriores al sitio de la ruptura, y la secuencia de ácido nucleico a introducir se encuentra entre los dos brazos.

En algunas modalidades, un ácido nucleico comprende de forma sucesiva una primera región de homología con respecto a secuencias anteriores a dicha escisión; una secuencia para inactivar un gen objetivo que se selecciona del grupo que consiste en TCR α , TCR β , CD52, receptor de glucocorticoides (GR), desoxicitidina cinasa (DCK) y una proteína del punto de control del sistema inmunitario, tal como, por ejemplo, muerte celular programada-1 (PD-1); y una segunda región de homología con respecto a secuencias posteriores a la escisión. La etapa de introducción del polinucleótido puede ser simultánea, antes o después de la introducción o expresión de la endonucleasa de corte infrecuente. Dependiendo de la ubicación de la secuencia de ácido nucleico objetivo donde se produjo el evento de ruptura, dicho ácido nucleico exógeno puede usarse para

inactivar un gen, por ejemplo, cuando el ácido nucleico exógeno se encuentra dentro del marco de lectura abierto del gen, o para introducir nuevas secuencias o genes de interés. Pueden usarse inserciones de secuencia con dicho ácido nucleico exógeno para modificar un gen existente objetivo, mediante corrección o reemplazo del gen (intercambio de alelos, como ejemplo no taxativo) o para regular por aumento o disminución la expresión del gen objetivo (intercambio de promotores, como ejemplo no taxativo), la corrección o reemplazo del gen objetivo. En algunas modalidades, la inactivación de un gen que se selecciona del grupo que consiste en TCR α , TCR β , CD52, GR, DCK y proteínas del punto de control del sistema inmunitario puede llevarse a cabo en una ubicación genómica precisa seleccionada como objetivo por una nucleasa TALE específica, donde dicha nucleasa TALE específica cataliza una escisión y donde el ácido nucleico exógeno comprende sucesivamente al menos una región de homología y una secuencia para inactivar un gen objetivo que se selecciona del grupo que consiste en TCR α , TCR β , CD52, GR, DCK, proteínas del punto de control del sistema inmunitario que se integra mediante recombinación homóloga. En algunas modalidades, pueden inactivarse varios genes, de forma sucesiva o al mismo tiempo, mediante el uso de varias nucleasas TALE, respectivamente, y seleccionando como objetivo específicamente un gen definido y varios polinucleótidos específicos para la inactivación específica de genes.

En algunas modalidades, el método comprende la inactivación de uno o más genes adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en TCR α , TCR β , CD52, GR, DCK y proteínas del punto de control del sistema inmunitario. En algunas modalidades, la inactivación de un gen puede lograrse mediante la introducción en las células de al menos una endonucleasa de corte infrecuente, de forma tal que la endonucleasa de corte infrecuente catalice de forma específica la escisión en una secuencia objetivo del genoma de la célula; y, opcionalmente, la introducción en las células de un ácido nucleico exógeno que comprende sucesivamente una primera región de homología con respecto a secuencias anteriores a la escisión, una secuencia a insertar en el genoma de la célula y una segunda región de homología con respecto a secuencias posteriores a la escisión; donde el ácido nucleico exógeno introducido inactiva un gen e integra al menos una secuencia de polinucleótidos exógena que codifica al menos una proteína recombinante de interés. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos exógena se integra dentro de un gen que codifica una proteína que se selecciona del grupo que consiste en TCR α , TCR β , CD52, GR, DCK y proteína del punto de control del sistema inmunitario.

En otro aspecto, una etapa de modificación genética de las células puede comprender: modificar linfocitos T mediante inactivación de al menos un gen que expresa un objetivo para un agente inmunosupresor; y expandir las células, opcionalmente en presencia del agente inmunosupresor. Un agente inmunosupresor es un agente que suprime la función inmunitaria a través de uno de

varios mecanismos de acción. Un agente inmunosupresor puede disminuir el grado y/o voracidad de una respuesta inmunitaria. Los ejemplos no taxativos de agentes inmunosupresores incluyen inhibidores de calcineurina, objetivos de rapamicina, bloqueadores de la cadena α de interleucina-2, inhibidores de inosina monofosfato deshidrogenasa, inhibidores de ácido dihidrofólico reductasa, corticosteroides y antimetabolitos inmunosupresores. Algunos inmunosupresores citotóxicos actúan mediante la inhibición de la síntesis de ADN. Otros pueden actuar a través de la activación de linfocitos T o mediante la inhibición de la activación de células auxiliares. Los métodos de acuerdo con la invención permiten conferir una resistencia inmunosupresora a los linfocitos T para la inmunoterapia al inactivar el objetivo del agente inmunosupresor en los linfocitos T. A modo de ejemplos no taxativos, los objetivos para el agente inmunosupresor pueden ser un receptor para un agente inmunosupresor tal como, por ejemplo, de modo no taxativo, CD52 receptor de glucocorticoides (GR), miembros génicos de la familia FKBP y miembros génicos de la familia de ciclofilina.

En algunas modalidades, la modificación genética del método implica la expresión, en células proporcionadas a modificar, de endonucleasas de corte infrecuente, de forma tal que la endonucleasa de corte infrecuente catalice específicamente la escisión en un gen objetivo, mediante lo cual se inactiva el gen objetivo. En algunas modalidades, un método para modificar células comprende al menos una de las siguientes etapas: proporcionar un linfocito T, tal como de un cultivo celular o de una muestra sanguínea; seleccionar un gen del linfocito T que expresa un objetivo para un agente inmunosupresor; introducir en el linfocito T una endonucleasa de corte infrecuente capaz de inactivar de forma selectiva mediante escisión de ADN, por ejemplo, mediante ruptura de cadena doble, el gen que codifica un objetivo para el agente inmunosupresor, y expandir las células, opcionalmente en presencia del agente inmunosupresor.

En algunas modalidades, el método comprende: proporcionar un linfocito T, tal como de un cultivo celular o de una muestra sanguínea; seleccionar un gen del linfocito T, donde el gen expresa un objetivo para un agente inmunosupresor; transfectar el linfocito T con ácido nucleico que codifica una endonucleasa de corte infrecuente capaz de inactivar de forma selectiva mediante escisión de ADN, por ejemplo, mediante ruptura de cadena doble, el gen que codifica un objetivo para el agente inmunosupresor, y expresar las endonucleasa de corte infrecuente en los linfocitos T; y expandir las células, opcionalmente en presencia del agente inmunosupresor.

En algunas modalidades, la endonucleasa de corte infrecuente se dirige específicamente a CD52 o a GR. En algunas modalidades, el gen seleccionado para la inactivación codifica CD52 y el tratamiento inmunosupresor comprende un anticuerpo humanizado que se dirige al antígeno CD52. En algunas modalidades, el gen seleccionado para la inactivación codifica GR y el tratamiento inmunosupresor comprende un corticosteroide tal como dexametasona. En algunas

modalidades, el gen seleccionado para la inactivación es un miembro génico de la familia FKBP o una variante de este, y el tratamiento inmunosupresor comprende FK506, también conocido como Tacrolimus o fujimicina. En algunas modalidades, el miembro génico de la familia FKBP es FKBP12 o una variante de este. En algunas modalidades, el gen seleccionado para la inactivación es un miembro génico de la familia de ciclofilina o una variante de este, y el tratamiento inmunosupresor comprende ciclosporina.

En algunas modalidades, la endonucleasa de corte infrecuente puede ser, por ejemplo, una meganucleasa, una nucleasa de dedos de cinc o una nucleasa TALE (TALEN). En algunas modalidades, la endonucleasa de corte infrecuente es una nucleasa TALE.

También se proporcionan en la presente métodos para modificar linfocitos T adecuados para la inmunoterapia, donde los métodos comprenden: modificar genéticamente los linfocitos T mediante la inactivación de al menos una proteína del punto de control del sistema inmunitario. En algunas modalidades, la proteína del punto de control del sistema inmunitario es, por ejemplo, PD-1 y/o CTLA-4. En algunas modalidades, los métodos para modificar genéticamente una célula comprenden: modificar los linfocitos T mediante la inactivación de al menos una proteína del punto de control del sistema inmunitario y la expansión de las células. Las proteínas de punto de control del sistema inmunitario incluyen, de modo no taxativo, muerte celular programada 1 (PD-1, también conocida como PDCD1 o CD279, número de acceso: NM_005018), antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4, también conocida como CD152, número de acceso de GenBank AF414120.1), LAG3 (también conocida como CD223, número de acceso: NM_002286.5), Tim3 (también conocida como HAVCR2, número de acceso de GenBank: JX049979.1), BTLA (también conocida como CD272, número de acceso: NM_181780.3), BY55 (también conocida como CD160, número de acceso de GenBank: CR541888.1), TIGIT (también conocida como VSTM3, número de acceso: NM_173799), B7H5 (también conocida como C10orf54, homólogo del gen vista de ratón, número de acceso: NM_022153.1), LAIR1 (también conocida como CD305, número de acceso de GenBank: CR542051.1), SIGLEC10 (número de acceso de GeneBank: AY358337.1), 2B4 (también conocida como CD244, número de acceso: NM_001166664.1), que inhiben directamente las células inmunitarias. Por ejemplo, CTLA-4 es una proteína de la superficie celular expresada en determinados linfocitos T CD4 y CD8; cuando se acopla mediante sus ligandos (B7-1 y B7-2) a células que presentan antígenos, se inhibe la función efectora y la activación de los linfocitos T.

En algunas modalidades, dicho método para modificar células comprende al menos una de las siguientes etapas: proporcionar un linfocito T, tal como de un cultivo celular o de una muestra sanguínea; introducir en el linfocito T una endonucleasa de corte infrecuente capaz de inactivar de manera selectiva mediante escisión de ADN, por ejemplo, mediante ruptura de cadena doble, un gen que codifica una proteína de punto de control del sistema inmunitario; y expandir las células.

En algunas modalidades, el método comprende: proporcionar un linfocito T, tal como de un cultivo celular o de una muestra sanguínea; transfectar dicho linfocito T con ácido nucleico que codifica una endonucleasa de corte infrecuente capaz de inactivar de forma selectiva mediante escisión de ADN, por ejemplo, mediante ruptura de cadena doble, un gen que codifica una proteína de punto de control del sistema inmunitario; expresar las endonucleasas de corte infrecuente en los linfocitos T; expandir las células. En algunas modalidades, la endonucleasa de corte infrecuente se dirige específicamente a un gen que se selecciona del grupo que consiste en: PD-1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR α y TCR β . En algunas modalidades, la endonucleasa de corte infrecuente puede ser una meganucleasa, una nucleasa de dedos de cinc o una nucleasa TALE. En algunas modalidades, la endonucleasa de corte infrecuente es una nucleasa TALE.

En algunas modalidades, la presente invención puede ser particularmente adecuada para una inmunoterapia alogénica. En dichas modalidades, las células pueden modificarse a través de un método que comprende: inactivar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) en linfocitos T; y expandir los linfocitos T. En algunas modalidades, la modificación genética del método se basa en la expresión, en células proporcionadas a modificar, de endonucleasas de corte infrecuente, de forma tal que la endonucleasa de corte infrecuente catalice específicamente la escisión en un gen objetivo, mediante lo cual se inactiva el gen objetivo. En algunas modalidades, dicho método para modificar células comprende al menos una de las siguientes etapas: proporcionar un linfocito T, tal como de un cultivo celular o de una muestra sanguínea; introducir en el linfocito T una endonucleasa de corte infrecuente capaz de inactivar de manera selectiva mediante escisión de ADN, por ejemplo, mediante ruptura de cadena doble, un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR); y expandir las células.

En algunas modalidades, el método comprende: proporcionar un linfocito T, tal como de un cultivo celular o de una muestra sanguínea; transfectar dicho linfocito T con ácido nucleico que codifica una endonucleasa de corte infrecuente capaz de inactivar de forma selectiva mediante escisión de ADN, por ejemplo, mediante ruptura de cadena doble, al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR); expresar las endonucleasas de corte infrecuente en los linfocitos T; clasificar los linfocitos T transformados, que no expresan TCR en su superficie celular; y expandir las células.

En algunas modalidades, la endonucleasa de corte infrecuente puede ser una meganucleasa, una nucleasa de dedos de cinc o una nucleasa TALE. En algunas modalidades, la endonucleasa de corte infrecuente es una nucleasa TALE. En algunas modalidades, las nucleasas TALE reconocen y escinden una secuencia que codifica TCR α o TCR β . En algunas modalidades, una nucleasa

TALE comprende una secuencia de polipéptidos que se selecciona de la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225 o 226.

Secuencias de polipéptidos de nucleasas TALE:

5 TRAC_T01-L de repetición

LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQ
AHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLC
QAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLL
PVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQR
10 LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETV
QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE
TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQA
LETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGG
RPALE (SEQ ID NO: 219).

15

TRAC_T01-R de repetición

LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA
HGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLC
QAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLP
20 VLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQR
LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALET
VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQAL
ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQ
ALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG
25 GRPALE (SEQ ID NO: 220).

TRBC_T01-L de repetición

LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQ
AHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
30 LCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQR
LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQ
ALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALET
VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQAL
ETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGK
35 QALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG

GRPALE (SEQ ID NO: 221).

TRBC T01-R de repetición

NPQRSTVWYLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETV
 5 QRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGK
 QALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNG
 GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIA
 SNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVV
 10 AIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQ
 QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL
 TPQQVVAIASNNGGRPALE (SEQ ID NO: 222).

TRBC T02-L de repetición

15 LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLC
 QAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLP
 VLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQR
 LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETV
 20 QRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGK
 QALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNG
 GGRPALE (SEQ ID NO: 223).

25 TRBC T02-R de repetición

LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQ
 AHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPV
 CQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLP
 VLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQR
 30 LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETV
 QRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGK
 QALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNG
 GGRPALE (SEQ ID NO: 224).

CD52 T02-L de repetición

LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQA
 HGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 CQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLL
 5 PVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQA
 LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETV
 QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE
 TVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQ
 ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGG
 10 RPALE (SEQ ID NO: 225).

CD52 T02-R de repetición

LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQ
 AHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 15 CQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLL
 PVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQA
 LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETV
 QRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL
 ETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQ
 20 ALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGG
 RPALE (SEQ ID NO: 226).

En otro aspecto, otra etapa de modificación genética de una célula puede ser un método para
 expandir linfocitos T con deficiencia de TCR α que comprende introducir pT α (también conocido
 25 como preTCR α) o una variante funcional de este en el linfocito T y expandir las células,
 opcionalmente a través de la estimulación del complejo CD3. En algunas modalidades, el método
 comprende: a) transfectar las células con ácido nucleico que codifica al menos un fragmento de
 pT α para brindar soporte a la expresión superficial de CD3; b) expresar dicho pT α en las células; y
 c) expandir las células, opcionalmente a través de la estimulación del complejo CD3.
 30 También se proporcionan métodos para preparar linfocitos T para la inmunoterapia, que
 comprenden las etapas del método para la expansión de linfocitos T. En algunas modalidades, la
 secuencia de polinucleótidos de pT α puede introducirse de manera aleatoria o a través de
 recombinación homóloga. En algunas modalidades, la inserción puede asociarse con la
 inactivación del gen de TCR α .
 35 Pueden usarse distintas variantes funcionales de pT α . Una “variante funcional” del péptido hace

referencia a una molécula sustancialmente similar ya sea al péptido completo o a un fragmento de este. Un “fragmento” del pTα o variante funcional de este hace referencia a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto que el pTα de longitud completa. En algunas modalidades, pTα o sus variantes funcionales pueden ser, por ejemplo, pTα de longitud completa o una versión de pTα truncada en el extremo C. El pTα truncado en el extremo C carece de uno o más residuos en el extremo C. Como ejemplos no taxativos, la versión de pTα truncada en el extremo C carece de 18, 48, 62, 78, 92, 110 o 114 residuos del extremo C de la proteína. Las variantes de secuencia de aminoácidos del péptido pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN que codifica el péptido. Estas variantes funcionales incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. También puede realizarse cualquier combinación de delecciones, inserciones y sustituciones para obtener la construcción final, siempre que la construcción final posea la actividad deseada, en particular la restauración de un complejo de CD3 funcional. En un ejemplo de modalidad, se introduce al menos una mutación en las distintas versiones de pTα descritas anteriormente para afectar la dimerización. A modo de ejemplo no taxativo, el residuo mutado puede ser al menos W46R, D22A, K24A, R102A o R117A de la proteína de pTα humana o posiciones alineadas mediante el uso del método CLUSTALW con el miembro homólogo o familia de pTα. Por ejemplo, pTα o su variante como se describió anteriormente comprenden el residuo mutado W46R o los residuos mutados D22A, K24A, R102A y R117A. En algunas modalidades, dicho pTα o variantes también se fusionan a un dominio de transducción de señales tal como CD28, OX40, ICOS, CD27, CD137 (4-1BB) y CD8, como ejemplos no taxativos. El dominio extracelular de pTα o sus variantes como se describió anteriormente puede fusionarse a un fragmento de la proteína TCRα, particularmente el dominio transmembrana e intracelular de TCRα. Las variantes de pTα también pueden fusionarse al dominio intracelular de TCRα.

En algunas modalidades, las versiones de pTα pueden fusionarse a un dominio de unión al ligando extracelular. En algunas modalidades, pTα o su variante funcional se fusionan a un fragmento de anticuerpo de cadena simple (scFv) que comprende el fragmento variable ligero y pesado de un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno objetivo unidos mediante un enlazador flexible. La expresión “linfocito T con deficiencia de TCRα” hace referencia a un linfocito T aislado que carece de la expresión de una cadena de TCRα funcional. Esto puede lograrse a través de distintos medios, como ejemplos no taxativos, al modificar un linfocito T de forma tal que no exprese ningún TCRα funcional sobre su superficie celular, al modificar un linfocito T de forma tal que produzca muy pocas cadenas de TCRα funcional en su superficie, o al modificar un linfocito T para que exprese una forma mutada o truncada de la cadena de TCRα. Las células con deficiencia de TCRα no pueden expandirse a través del complejo de CD3. Por lo tanto, para solucionar este

problema y para permitir la proliferación de células con deficiencia de TCR α , se introduce en las células pT α o una variante funcional de este, mediante lo cual se restaura un complejo de CD3 funcional. En algunas modalidades, el método comprende además introducir en dichos linfocitos T endonucleasas de corte infrecuente capaces de inactivar de manera selectiva mediante escisión de ADN un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR). En algunas modalidades, la endonucleasa de corte infrecuente es una nucleasa TALE.

En algunas modalidades, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden ser ARNm que se introduce directamente en las células, por ejemplo, mediante electroporación. En algunas modalidades, puede usarse la tecnología cytoPulse para permeabilizar de forma transitoria las células vivas para suministrar material a las células. Pueden modificarse los parámetros para determinar condiciones para una eficacia de transfección elevada con mortalidad mínima.

También se proporcionan en la presente métodos para transfectar linfocitos T. En algunas modalidades, el método comprende: poner en contacto un linfocito T con ARN y aplicar al linfocito T una secuencia de pulsado ágil que consiste en: (a) un pulso eléctrico con un rango de voltaje de alrededor de 2250 a 3000 V por centímetro; (b) un ancho de pulso de 0.1 ms; (c) un intervalo de pulso de alrededor de 0.2 a 10 ms entre los pulsos eléctricos de la etapa (a) y (b); (d) un pulso eléctrico con un rango de voltaje de alrededor de 2250 a 3000 V con un ancho de pulso de alrededor de 100 ms y un intervalo de pulso de alrededor de 100 ms entre el pulso eléctrico de la etapa (b) y el primer pulso eléctrico de la etapa (c); y (e) cuatro pulsos eléctricos con un voltaje de alrededor de 325 V con un ancho de pulso de alrededor de 0.2 ms y un intervalo de pulso de 2 ms entre cada uno de los 4 pulsos eléctricos. En algunas modalidades, un método para la transfección de linfocitos T comprende poner en contacto a dicho linfocito T con ARN y aplicar al linfocito T una secuencia de pulsado ágil que comprende: (a) un pulso eléctrico con un voltaje de alrededor de 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000V por centímetro; (b) un ancho de pulso de 0.1 ms; (c) y un intervalo de pulso de alrededor de 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ms entre los pulsos eléctricos de la etapa (a) y (b); (d) un pulso eléctrico con un rango de voltaje de alrededor de 2250, de 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000V con un ancho de pulso de 100 ms y un intervalo de pulso de 100 ms entre el pulso eléctrico de la etapa (b) y el primer pulso eléctrico de la etapa (c); y (e) 4 pulsos eléctricos con un voltaje de alrededor de 325 V con un ancho de pulso de alrededor de 0.2 ms y un intervalo de pulso de alrededor de 2 ms entre cada uno de los 4 pulsos eléctricos. Se describen en la presente solicitud todos los valores incluidos en el intervalo de valores descrito anteriormente. El medio de electroporación puede ser cualquier medio adecuado conocido en la técnica. En algunas modalidades, el medio de electroporación tiene una

conductividad dentro del intervalo de alrededor de 0.01 a alrededor de 1.0 miliSiemens.

En algunas modalidades, como ejemplos no taxativos, un ARN codifica una endonucleasa de corte infrecuente, un monómero de la endonucleasa de corte infrecuente tal como una nucleasa semi TALE, un CAR, al menos un componente del receptor de antígenos quimérico de múltiples cadenas, un pTα o variante funcional de este, un ácido nucleico exógeno y/o un dominio catalítico adicional.

Células inmunitarias modificadas genéticamente

La invención proporciona también células inmunitarias modificadas que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de CAR descritos en la presente. En algunas modalidades, un CAR puede introducirse en una célula inmunitaria como transgén a través de un vector plásmido. En algunas modalidades, el vector plásmido también puede contener, por ejemplo, un marcador de selección que permite la identificación y/o selección de células que recibieron el vector.

Los polipéptidos de CAR pueden sintetizarse in situ en la célula después de la introducción de polinucleótidos que codifican los polipéptidos de CAR en la célula. De manera alternativa, los polipéptidos de CAR pueden producirse fuera de las células e introducirse después en estas. Se conocen en la técnica métodos para introducir una construcción de polinucleótidos en células. En algunas modalidades, pueden usarse métodos de transformación estable para integrar la construcción de polinucleótidos en el genoma de la célula. En otras modalidades, pueden usarse métodos de transformación transitoria para expresar de forma transitoria la construcción de polinucleótidos no integrada en el genoma de la célula. En otras modalidades, pueden usarse métodos mediados por virus. Los polinucleótidos pueden introducirse en una célula a través de cualquier medio adecuado, tal como, por ejemplo, vectores virales recombinantes (por ejemplo, retrovirus, adenovirus), liposomas y similares. Los métodos de transformación transitoria incluyen, por ejemplo, de modo no taxativo, microinyección, electroporación o bombardeo de partículas. Los polinucleótidos pueden incluirse en vectores, tales como, por ejemplo, vectores plásmidos o vectores virales.

También se proporcionan en la presente células aisladas y líneas celulares obtenidas a través de los métodos descritos anteriormente para modificar células proporcionados en la presente. En algunas modalidades, una célula aislada comprende al menos un CAR como se describió anteriormente. En algunas modalidades, una célula aislada comprende una población de CAR, donde cada CAR comprende distintos dominios de unión al ligando extracelular.

También se proporcionan en la presente células inmunitarias aisladas obtenidas de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Es posible utilizar cualquier célula inmunitaria capaz de expresar ADN heterólogos a los efectos de expresar el CAR de interés. En algunas

modalidades, la célula inmunitaria utilizada para la expresión de cualquiera de los CAR descritos en la presente es un linfocito T. En algunas modalidades, una célula inmunitaria utilizada para la expresión de CAR puede derivarse, por ejemplo, de modo no taxativo, de una célula madre. Las células madre pueden ser células madre de adulto, células madre embrionarias no humanas, más particularmente células madre no humanas, células madre de sangre del cordón umbilical, células progenitoras, células madre de médula ósea, células madre pluripotentes inducidas, células madre totipotentes o células madre hematopoyéticas. Las células madre humanas representativas son células CD34+.

En algunas modalidades, las células inmunitarias modificadas que expresan en su membrana de la superficie celular un CAR específico para FLT3 de la invención comprenden un porcentaje de células de memoria de célula madre y memoria central mayor que 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 %. En algunas modalidades, las células inmunitarias modificadas que expresan en su membrana de la superficie celular un CAR específico para FLT3 de la invención comprenden un porcentaje de células de memoria de célula madre y memoria central de alrededor de 10 % a alrededor de 60 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 50 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 40 %, de alrededor de 15 % a alrededor de 50 %, de alrededor de 15 % a alrededor de 40 %, de alrededor de 20 % a alrededor de 60 % o de alrededor de 20 % a alrededor de 70 %.

En algunas modalidades, el porcentaje de células de memoria de célula madre y memoria central se mide tal como se describe en el Ejemplo 2d.

La célula inmunitaria utilizada para la expresión de cualquiera de los CAR descritos en la presente puede ser también una célula dendrítica, célula dendrítica citolítica, un mastocito, un linfocito NK, un linfocito B o un linfocito T que se selecciona del grupo que consiste en linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T auxiliares. En algunas modalidades, la célula puede derivarse del grupo que consiste en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+.

En una modalidad, la célula inmunitaria es un linfocito T inflamatorio que expresa cualquiera de los CAR descritos en la presente. En una modalidad, la célula inmunitaria es un linfocito T citotóxico que expresa cualquiera de los CAR descritos en la presente. En una modalidad, la célula inmunitaria es un linfocito T regulador que expresa cualquiera de los CAR descritos en la presente. En una modalidad, la célula inmunitaria es un linfocito T auxiliar que expresa cualquiera de los CAR descritos en la presente.

También se proporcionan en la presente líneas celulares obtenidas de un linfocito T transformado de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente. También se proporcionan en la presente células modificadas resistentes a un tratamiento inmunosupresor. En algunas modalidades, una célula aislada de acuerdo con la invención comprende un polinucleótido que codifica un CAR.

Las células inmunitarias de la invención pueden activarse y expandirse, ya sea antes o después de la modificación genética de los linfocitos T, mediante el uso de métodos descritos, en líneas generales, por ejemplo, de modo no taxativo, en las patentes estadounidenses 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y la publicación de la solicitud de patente estadounidense n.º 20060121005. Los linfocitos T pueden expandirse in vitro o in vivo. En general, los linfocitos T de la invención pueden expandirse, por ejemplo, al ponerlos en contacto con un agente que estimula un complejo de CD3 TCR y una molécula coestimulante en la superficie de los linfocitos T para crear una señal de activación para el linfocito T. Por ejemplo, pueden usarse químicos tales como ionóforo de calcio A23187, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), o lectinas mitogénicas como fitohemaglutinina (PHA) para crear una señal de activación para el linfocito T.

En algunas modalidades, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse in vitro mediante contacto, por ejemplo, con un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión al antígeno de este, un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado sobre una superficie, o mediante contacto con un activador de proteína cinasa C (por ejemplo, briostatina) en conjunto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, es posible poner en contacto a una población de linfocitos T con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones adecuadas para estimular la proliferación de linfocitos T. Las condiciones adecuadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio adecuado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o X-vivo 5 (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para proliferación y viabilidad, que incluyen suero (por ejemplo, suero humano o bovino fetal), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-2, IL-15, TGF β y TNF, o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, de modo no taxativo, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos agregados, piruvato sódico y vitaminas, ya sea sin suero o complementados con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas y/o una cantidad de citocinas suficiente para el crecimiento y la expansión de linfocitos T. Se incluyen antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomicina, solamente en cultivos experimentales, no en cultivos de células que van a infundirse en un sujeto. Las células objetivo se mantienen en condiciones necesarias para sustentar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (por ejemplo, 37 °C) y atmósfera (por ejemplo, aire más CO₂ al 5 %) adecuadas. Los linfocitos T que se expusieron a diversos plazos de estimulación pueden presentar diferentes características.

En algunas modalidades, las células de la invención pueden expandirse mediante cocultivo con tejido o células. Las células también pueden expandirse in vivo, por ejemplo, en la sangre del sujeto después de administrar la célula al sujeto.

En algunas modalidades, una célula aislada de acuerdo con la presente invención comprende un gen inactivado que se selecciona del grupo que consiste en CD52, GR, PD-1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, HLA, TCR α y TCR β y/o expresa un CAR, un CAR de múltiples cadenas y/o un transgén de pT α . En algunas modalidades, una célula aislada comprende polinucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden un CAR de múltiples cadenas. En algunas modalidades, la célula aislada de acuerdo con la presente invención comprende dos genes inactivados que se seleccionan del grupo que consiste en: CD52 y GR, CD52 y TCR α , CDR52 y TCR β , GR y TCR α , GR y TCR β , TCR α y TCR β , PD-1 y TCR α , PD-1 y TCR β , CTLA-4 y TCR α , CTLA-4 y TCR β , LAG3 y TCR α , LAG3 y TCR β , Tim3 y TCR α , Tim3 y TCR β , BTLA y TCR α , BTLA y TCR β , BY55 y TCR α , BY55 y TCR β , TIGIT y TCR α , TIGIT y TCR β , B7H5 y TCR α , B7H5 y TCR β , LAIR1 y TCR α , LAIR1 y TCR β , SIGLEC10 y TCR α , SIGLEC10 y TCR β , 2B4 y TCR α , 2B4 y TCR β y/o expresa un CAR, un CAR de múltiples cadenas y un transgén de pT α .

En algunas modalidades, el TCR se vuelve no funcional en las células de acuerdo con la invención al inactivar el gen de TCR α y/o los genes de TCR β . En algunas modalidades, se proporciona un método para obtener células modificadas derivadas de un individuo, donde las células pueden proliferarse de forma independiente de la vía de señalización del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Se encuentran abarcadas en el alcance de la presente invención las células modificadas, que pueden proliferarse de forma independiente de la vía de señalización del MHC, susceptibles a obtenerse a través de este método. Las células modificadas descritas en la presente pueden usarse para el tratamiento de individuos que lo necesiten contra el rechazo de hospedador contra injerto (HvG) y enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD); por lo tanto, se encuentra dentro del alcance de la presente invención un método para el tratamiento de individuos que lo precisen contra el rechazo de hospedador contra injerto (HvG) y enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD) que comprende tratar a dicho mediante la administración de una cantidad eficaz de células modificadas que comprenden genes de TCR α y/o TCR β inactivados.

En algunas modalidades, las células inmunitarias se modifican de forma que sean resistentes a uno o más fármacos de quimioterapia. El fármaco de quimioterapia puede ser, por ejemplo, un análogo de nucleótido de purina (PNA, por sus siglas en inglés), lo que hace a la célula inmunitaria adecuada para el tratamiento contra el cáncer que combina quimioterapia e inmunoterapia adoptiva. Los ejemplos de PNA incluyen, por ejemplo, clofarabina, fludarabina y citarabina, de manera individual o combinada. Los PNA se metabolizan a través de desoxicitidina cinasa (dCK)

en PNA de mono, di y trifosfato. Sus formas de trifosfato compiten con ATP para la síntesis de ADN, actúan como agentes proapoptóticos y son inhibidores potentes de ribonucleótido reductasa (RNR), que está implicada en la producción de trinucleótidos. Se proporcionan en la presente linfocitos T con CAR específicos para FLT3 que comprenden un gen de dCK inactivado. en algunas modalidades, las células con inactivación de dCK se confeccionan mediante la transfección de linfocitos T con polinucleótidos que codifican nucleasas TAL específicas dirigidas contra genes de dCK, por ejemplo, mediante electroporación de ARNm. Los linfocitos T con CAR específicos para FLT3 con inactivación de dCK son resistentes a los PNA, que incluyen, por ejemplo, clorofarabina y/o fludarabina, y mantienen la actividad citotóxica de linfocitos T hacia células que expresan FLT3.

En algunas modalidades, las líneas celulares o células aisladas de la invención pueden comprender un pTα o una variante funcional de este. En algunas modalidades, una línea celular o célula aislada puede modificarse genéticamente de forma adicional al inactivar el gen de TCRα.

En algunas modalidades, el linfocito T con CAR comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido suicida, tal como, por ejemplo, RQR8. Ver, por ejemplo, WO2013153391A, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. En linfocitos T con CAR que comprenden el polinucleótido, el polipéptido suicida se expresa en la superficie de un linfocito T con CAR. En algunas modalidades, el polipéptido suicida comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 227.

CPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSTNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGGGSP
APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLS
LVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV (SEQ ID NO: 227).

El polipéptido suicida también puede comprender un péptido señal en el extremo amino. En algunas modalidades, el polipéptido suicida comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 228.

MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSTNVSTNVSPAKPTTTACPY
SNPSLCSGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG
VLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV (SEQ ID NO: 228).

Cuando el polipéptido suicida se expresa en la superficie de un linfocito T con CAR, la unión de rituximab a los epítopos de rituximab del polipéptido provoca la lisis de la célula. Puede unirse más de una molécula de rituximab por polipéptido expresado en la superficie celular. Cada epítipo de rituximab del polipéptido puede unirse a una molécula separada de rituximab. La delección de linfocitos T con CAR específicos para FLT3 puede producirse in vivo, por ejemplo, mediante la administración de rituximab a un sujeto. La decisión de eliminar las células transferidas puede surgir de la detección de efectos indeseables en el sujeto que pueden atribuirse a las células

transferidas, tal como, por ejemplo, cuando se detectan niveles inaceptables de toxicidad.

En algunas modalidades, tras la administración a un paciente, las células inmunitarias modificadas que expresan en su superficie celular cualquiera de los CAR específicos para FLT3 descritos en la presente pueden reducir, eliminar o lisar células endógenas del paciente que expresan FLT3. En

5 una modalidad, un porcentaje de reducción o lisis de células endógenas que expresan FLT3 o células de una línea celular que expresa FLT3 a través de la modificación de células inmunitarias que expresan cualquiera de los CAR específicos para FLT3 descritos en la presente es de al menos alrededor de o mayor que 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. En una modalidad, un porcentaje de reducción o lisis de células endógenas que expresan FLT3 o células de una línea celular que expresa FLT3 a través de la modificación de células inmunitarias que expresan cualquiera de los CAR específicos para FLT3 descritos en la presente es de alrededor de 5 % a alrededor de 95 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 95 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 90 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 80 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 70 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 60 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 50 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 40 %, de alrededor de 20 % a alrededor de 90 %, de alrededor de 20 % a alrededor de 80 %, de alrededor de 20 % a alrededor de 70 %, de alrededor de 20 % a alrededor de 60 %, de alrededor de 20 % a alrededor de 50 %, de alrededor de 25 % a alrededor de 75 % o de alrededor de 25 % a alrededor de 60 %. En una modalidad, las células endógenas que expresan FLT3 son células endógenas de médula ósea que expresan FLT3.

En una modalidad, el porcentaje de reducción o lisis de las células objetivo, por ejemplo, una línea celular que expresa FLT3, mediante células inmunitarias modificadas que expresan en su superficie celular un CAR específico para FLT3 de la invención puede medirse con el ensayo descrito en el Ejemplo 2e.

Método para clasificar células inmunitarias positivas para CAR

En un aspecto, se proporcionan métodos para la clasificación *in vitro* de una población de células inmunitarias, donde un subconjunto de la población de células inmunitarias comprende células inmunitarias modificadas que expresan cualquiera de los CAR específicos para FLT3 que comprenden epítomos específicos para los anticuerpos monoclonales descritos en la presente. El método comprende poner en contacto la población de células inmunitarias con un anticuerpo monoclonal específico para los epítomos y seleccionar las células inmunitarias que se unen al anticuerpo monoclonal para obtener una población de células enriquecida con células inmunitarias modificadas que expresan el CAR específico para FLT3.

En algunas modalidades, dicho anticuerpo monoclonal específico para dicho epítomo se conjuga

opcionalmente a un fluoróforo. En esta modalidad, la etapa de selección de las células que se unen al anticuerpo monoclonal puede llevarse a cabo mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, dicho anticuerpo monoclonal específico para dicho epítipo se conjuga opcionalmente a una partícula magnética. En esta modalidad, la etapa de selección de las células que se unen al anticuerpo monoclonal puede llevarse a cabo mediante clasificación de células activadas de forma magnética (MACS, por sus siglas en inglés).

En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR que comprende un epítipo específico para mAb de la SEQ ID NO: 262. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR que comprende un epítipo específico para mAb de la SEQ ID NO: 262 y el anticuerpo utilizado para poner en contacto a la población de células inmunitarias es QBEND-10.

En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR que comprende un epítipo específico para mAb de la SEQ ID NO: 229. En algunas modalidades, el dominio de unión extracelular del CAR que comprende un epítipo específico para mAb de la SEQ ID NO: 229 y el anticuerpo utilizado para poner en contacto a la población de células inmunitarias es Rituximab.

En algunas modalidades, la población de células inmunitarias que expresan CAR de FLT3 obtenida al utilizar el método para clasificación *in vitro* de células inmunitarias descrito anteriormente comprende al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de células inmunitarias que expresan CAR de FLT3. En algunas modalidades, la población de células inmunitarias que expresan CAR de FLT3 obtenida al utilizar el método para clasificación *in vitro* de células inmunitarias que expresan CAR descrito anteriormente comprende al menos 85 % de células inmunitarias que expresan CAR de FLT3.

En algunas modalidades, los mAb utilizados en el método de clasificación *in vitro* se unieron anteriormente a un soporte tal como una columna o en perlas tales como se realiza de forma rutinaria en la técnica. En algunas modalidades, las células inmunitarias que expresan los CAR son linfocitos T.

De acuerdo con la invención, las células a administrar al receptor pueden enriquecerse *in vitro* a partir de la población original. Se conocen en la técnica los métodos para expandir poblaciones fuente, y estos pueden incluir seleccionar células que expresan un antígeno tal como el antígeno CD34, usar combinaciones de centrifugado por densidad, purificación con perlas inmunomagnéticas, cromatografía por afinidad y clasificación de células activadas por fluorescencia, conocidos por los expertos en la técnica.

La citometría de flujo se usa ampliamente en la técnica y es un método conocido por los expertos en la técnica para clasificar y cuantificar tipos específicos de células dentro de una población de células. En general, la citometría de flujo es un método para cuantificar componentes o elementos

estructurales de células principalmente a través de medios ópticos. Dado que pueden distinguirse distintos tipos distintos de células mediante cuantificación de elementos estructurales, puede usarse la citometría de flujo y la clasificación de células para contar y clasificar células de distintos fenotipos en una mezcla.

- 5 Un análisis de citometría de flujo implica dos etapas básicas: 1) marcar los tipos de células seleccionados con uno o más marcadores etiquetados y 2) determinar la cantidad de células marcadas con respecto a la cantidad total de células de la población.

El método principal de marcado de los tipos de células es mediante la unión de anticuerpos marcados a marcadores expresados por el tipo específico de célula. Los anticuerpos se marcan de
10 manera directa con un compuesto fluorescente o de forma indirecta, por ejemplo, con un segundo anticuerpo marcado de manera fluorescente que reconoce el primer anticuerpo.

En algunas modalidades, el método utilizado para clasificar las células inmunitarias que expresan un CAR es la clasificación de células activadas de forma magnética (MACS).

La clasificación de células activadas de forma magnética (MACS) es un método para la separación
15 de diversas poblaciones de células en función de sus antígenos superficiales (moléculas CD) mediante el uso de columnas y nanopartículas superparamagnéticas. La obtención de poblaciones de células puras lleva unas pocas etapas simples. Las células de una suspensión de células únicas se marcan de forma magnética con microperlas. La muestra se aplica a una columna compuesta por esferas ferromagnéticas, que están cubiertas con un recubrimiento compatible con
20 las células que permite una separación rápida y cuidadosa de las células. Las células sin marcar pasan a través de este, mientras que las células marcadas de forma magnética se conservan dentro de la columna. Las que pasan a través del recubrimiento pueden recogerse como la fracción de células no marcadas. Después de una breve etapa de lavado, la columna se retira del separador y las celdas marcadas de forma magnética se eluyen de la columna.

25 En algunas modalidades, el mAb usado en el método para clasificar células inmunitarias que expresan el CAR se selecciona de alemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, muromonab-CD3, tositumomab, abciximab, basiliximab, brentuximab vedotin, cetuximab, infliximab, rituximab, bevacizumab, certolizumab pegol, daclizumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, natalizumab, omalizumab, palivizumab, ranibizumab, tocilizumab, trastuzumab, vedolizumab, adalimumab,
30 belimumab, canakinumab, denosumab, golimumab, ipilimumab, ofatumumab, panitumumab, QBEND-10 y/o ustekinumab. En algunas modalidades, dicho mAb es rituximab. En otra modalidad, dicho mAb es QBEND-10.

Aplicaciones terapéuticas

35 Las células aisladas obtenidas con los métodos descritos anteriormente, o las líneas celulares

derivadas de dichas células aisladas, que expresan CAR específicos para FLT3, pueden usarse como medicamento. De forma similar, pueden usarse como medicamento los anticuerpos específicos para FLT3 descritos en la presente. En algunas modalidades, este medicamento puede usarse para el tratamiento de un trastorno o una enfermedad asociada con FLT3. En

5 algunas modalidades, un trastorno o la enfermedad asociada con FLT3 comprende células malignas que expresan FLT3, por ejemplo, cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer de origen hematopoyético, tal como linfoma o leucemia. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple, neoplasia maligna de células plasmáticas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares, enfermedad de Kahler y mielomatosis, leucemia
10 de células plasmáticas, plasmacitoma, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, leucemia de células pilosas, linfoma no hodgkiniano (NHL) de linfocitos B, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico de B precursores, leucemia mieloide, macroglobulinemia de
15 Waldenstrom, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, linfoma de tejido linfático asociado con la mucosa, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos B grandes mediastinal primario (tímico), linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma nodal de linfocitos B de la zona marginal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma intravascular de linfocitos B
20 grandes, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de linfocitos B grandes con alto contenido de histiocitos/linfocitos T, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma primario cutáneo difuso de linfocitos B grandes (tipo pierna), linfoma difuso de linfocitos B grandes en ancianos positivo para EBV, linfoma difuso de linfocitos B grandes asociado con inflamación, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B grandes positivo para ALK,
25 linfoma plasmablástico, linfoma de linfocitos B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada con HHV8, linfoma de linfocitos B sin clasificar con elementos intermedios entre linfoma difuso de linfocitos B grandes y linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos B sin clasificar con elementos intermedios entre linfoma difuso de linfocitos B grandes y linfoma de Hodgkin clásico, u otros cánceres relacionados con células hematopoyéticas. En un ejemplo de modalidad,
30 el cáncer es AML. En un ejemplo de modalidad, el cáncer es ALL.

En algunas modalidades, puede usarse una célula aislada de acuerdo con la invención, la línea celular derivada de las células aisladas o un anticuerpo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que lo necesite.

También se proporcionan en la presente métodos para el tratamiento de sujetos. En algunas
35 modalidades, el método comprende proporcionar una célula inmunitaria de la invención a un sujeto

que lo necesite. En algunas modalidades, el método comprende una etapa de administrar las células inmunitarias transformadas de la invención a un sujeto que lo necesite. En algunas modalidades, el método comprende administrar un anticuerpo de la invención a un sujeto que lo necesite.

- 5 En una modalidad, los linfocitos T de la invención pueden someterse una fuerte expansión de linfocitos T in vivo y pueden persistir durante un plazo prolongado.

Los métodos de tratamiento de la invención pueden ser para una mejora, una cura o profilaxis. El método de la invención puede ser parte de una inmunoterapia autóloga o parte de un tratamiento de inmunoterapia alogénica. La invención es particularmente adecuada para la inmunoterapia alogénica. Los linfocitos T de donantes pueden transformarse en células no alorreactivas mediante el uso de protocolos estándar y reproducirse según sea necesario, mediante lo cual se producen linfocitos T con CAR, que pueden administrarse a uno o a varios sujetos. Esta terapia con linfocitos T con CAR puede ponerse a disposición como un producto terapéutico “listo para usar”.

- 10 Las células que pueden usarse con los métodos descritos se describieron en la sección que antecede. El tratamiento puede usarse para tratar a sujetos con diagnóstico de cáncer, por ejemplo. Los cánceres que pueden tratarse incluyen, por ejemplo, de modo no taxativo, cánceres que implican linfocitos B, que incluyen cualquiera de los cánceres enumerados anteriormente. Los tipos de cáncer a tratar con los CAR y los linfocitos T con CAR de la invención incluyen, de modo no taxativo, determinadas neoplasias malignas linfoides o leucemias. También se incluyen
15 tumores/cánceres en adultos y tumores/cánceres pediátricos. En algunas modalidades, el tratamiento puede combinarse con una o más terapias contra el cáncer que se seleccionan del grupo de terapia de anticuerpos, quimioterapia, terapia de citocinas, terapia de células dendríticas, terapia génica, terapia de hormonas, terapia de luz láser y terapia de radiación.

- 25 En algunas modalidades, el tratamiento puede administrarse a sujetos que se someten a un tratamiento inmunosupresor. De hecho, la invención se basa, en términos generales, en células o una población de células que se tornaron resistentes a al menos un agente inmunosupresor debido a la inactivación de un gen que codifica un receptor para dicho agente inmunosupresor. En este aspecto, el tratamiento inmunosupresor debería ayudar a la selección y expansión de los linfocitos T de acuerdo con la invención dentro del sujeto. La administración de las células o población de
30 células de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, lo que incluye mediante inhalación de aerosol, inyección, ingesta, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en la presente pueden administrarse a un sujeto por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, mediante inyección intravenosa o intralinfática, o por vía intraperitoneal. En algunas modalidades, las composiciones celulares de
35 la invención se administran mediante inyección intravenosa.

En algunas modalidades, la administración de las células o población de células puede comprender, por ejemplo, la administración de alrededor de 10^4 a alrededor de 10^9 células por kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros de cantidad de células dentro de dicho intervalo. En algunas modalidades, la administración de las células o población de células puede comprender la administración de alrededor de 10^5 a 10^6 células por kg de peso corporal, incluidos todos los valores enteros de cantidad de células dentro de dicho intervalo. Las células o población de células pueden administrarse en una o más dosis. En algunas modalidades, dicha cantidad eficaz de células puede administrarse como una única dosis. En algunas modalidades, dicha cantidad eficaz de células puede administrarse como más de una dosis durante un plazo. El momento de la administración es a criterio del médico tratante y depende de la condición clínica del sujeto. Las células o población de células pueden obtenerse de cualquier fuente, tal como un banco de sangre o un donante. Si bien varían las necesidades individuales, el conocimiento de la técnica comprende la determinación de los intervalos óptimos de cantidades eficaces de un tipo determinado de células para una enfermedad o afección particular. Una cantidad eficaz hace referencia a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosificación administrada depende de la edad, salud y peso del destinatario, tipo de tratamiento simultáneo, de existir, frecuencia del tratamiento y naturaleza del efecto deseado. En algunas modalidades, una cantidad eficaz de células o composición que comprende dichas células se administran por vía parenteral. En algunas modalidades, la administración puede ser una administración intravenosa. En algunas modalidades, la administración puede realizarse directamente mediante inyección dentro de un tumor.

En algunas modalidades de la invención, las células se administran a un sujeto junto con cualquier cantidad de modalidades de tratamiento relevantes (por ejemplo, antes, de forma simultánea o después), que incluyen, de modo no taxativo, tratamientos con agentes tales como terapia de anticuerpos monoclonales, antagonista de CCR2 (por ejemplo, INC-8761), terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, citarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizumab para pacientes con MS o tratamiento con efalizumab para pacientes con psoriasis, u otros tratamientos para pacientes con PML. En algunas modalidades, los linfocitos T con CAR específicos para FLT3 se administran a un sujeto junto con uno o más de los siguientes: un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab o PF-06801591), un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, avelumab, atezolizumab o durvalumab), un anticuerpo anti-OX40 (por ejemplo, PF-04518600), un anticuerpo anti-4-1BB (por ejemplo, PF-05082566), un anticuerpo anti-MCSF (por ejemplo, PD-0360324) un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-TIGIT. En algunas modalidades, se administra a un sujeto un CAR específico para FLT3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 236, junto con un anticuerpo anti-PD-

L1, avelumab. En modalidades adicionales, los linfocitos T de la invención pueden usarse de forma combinada con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes immunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludaribina, 5 ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micoplienólico, esteroides, FR901228, citocinas y/o radiación. Estos fármacos inhiben la calcineurina de fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Henderson, Naya et ál. 1991; Liu, Albers et ál. 1992; Bierer, Hollander et ál. 1993). En modalidades adicionales, los linfocitos T de la invención pueden usarse de forma 10 combinada con inhibidores del receptor tirosina cinasa tales como Midostaurin y Sunitinib, inhibidores de mTOR tales como Rapamacina y Everolimus, moduladores epigenéticos tales como Vormostat, inhibidores de proteasoma tales como Bortezomib, agentes inmunomoduladores tales como lenalidomida, inhibidores de Hedgehog tales como Erismodegib y PF-04449913 o inhibidores de isocitrato deshidrogenasa (IDH) tales como AG-120 y AG-221. En una modalidad adicional, las 15 composiciones celulares de la invención se administran a un sujeto en conjunto con (por ejemplo, antes, de forma simultánea o después) trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos B mediante el uso de agentes quimioterapéuticos tales como fludarabina, terapia de radiación con haces externos (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En algunas modalidades, las composiciones celulares de la invención se administran luego de la terapia 20 ablativa de linfocitos B, tal como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en algunas modalidades, los sujetos pueden someterse a tratamiento estándar con una quimioterapia de dosis elevada seguida por trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas modalidades, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunitarias expandidas de la invención. En algunas modalidades, las células expandidas se 25 administran antes o después de la cirugía.

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para el agotamiento de células inmunitarias modificadas que expresan CAR específicos para FLT3 de un sujeto al que se le administraron dichas células. El agotamiento puede ser mediante inhibición o eliminación.

En un aspecto, un método para el agotamiento de células inmunitarias modificadas que expresan 30 un CAR específico para FLT3 que comprende un epítipo específico para un anticuerpo monoclonal comprende poner en contacto dicha célula inmunitaria modificada con un anticuerpo monoclonal específico para el epítipo.

En algunas modalidades, un método para el agotamiento de un sujeto al que se le administraron células inmunitarias modificadas que expresan un CAR específico para FLT3 que comprende un 35 epítipo específico para un anticuerpo monoclonal comprende administrarle al sujeto un anticuerpo

monoclonal específico para el epítipo. En estas modalidades, la administración del anticuerpo monoclonal específico para el epítipo presente en el dominio extracelular del CAR al sujeto elimina o inhibe la actividad de las células inmunitarias modificadas que expresan CAR del sujeto.

En un aspecto, el agotamiento de las células inmunitarias modificadas que expresan CAR permite la recuperación de una población endógena de células que expresan FLT3.

En un aspecto, la invención hace referencia a un método para promover la recuperación de células endógenas que expresan FLT3 en un sujeto al que se le administraron células inmunitarias modificadas que expresan en la superficie celular un CAR específico para FLT3 que comprende un epítipo específico para un anticuerpo monoclonal, donde el método comprende administrarle al

sujeto un anticuerpo monoclonal específico para el epítipo. En algunas modalidades, las células endógenas que expresan FLT3 son células endógenas de médula ósea que expresan FLT3. En un aspecto, el término “recuperación” hace referencia al aumento de la cantidad de células endógenas que expresan FLT3. La cantidad de células endógenas que expresan FLT3 puede aumentar debido a un aumento de la proliferación de células endógenas que expresan FLT3 y/o

debido a una reducción de la eliminación de células endógenas que expresan FLT3 mediante células inmunitarias modificadas que expresan CAR de FLT3. En algunas modalidades, la administración del anticuerpo monoclonal al sujeto agota las células inmunitarias modificadas que expresan CAR de FLT3 y aumenta la cantidad de células endógenas que expresan FLT3, por ejemplo, células progenitoras de médula ósea endógenas que expresan FLT3, en el sujeto. En una modalidad, la administración del anticuerpo monoclonal al sujeto aumenta la cantidad de células endógenas que expresan FLT3 al menos alrededor de 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, en comparación con la cantidad de células endógenas que expresan FLT3 previo a la administración del anticuerpo monoclonal.

En un aspecto, se proporciona un método para el tratamiento de una afección mediada por FLT3 en un sujeto, donde el método comprende: (a) administrar al sujeto células inmunitarias modificadas que expresan en la superficie celular CAR específicos para FLT3 que comprenden uno o más epítopos específicos para uno o más anticuerpos monoclonales; y (b) agotar posteriormente las células inmunitarias modificadas en el sujeto mediante la administración al sujeto de uno o más anticuerpos monoclonales específicos para el epítipo.

En algunas modalidades, los mAb usados en el método para el agotamiento de células inmunitarias modificadas que expresan CAR se selecciona de alemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, muromonab-CD3, tositumomab, abciximab, basiliximab, brentuximab vedotin, cetuximab, infliximab, rituximab, bevacizumab, certolizumab pegol, daclizumab, eculizumab, efalizumab, gemtuzumab, natalizumab, omalizumab, palivizumab, ranibizumab, tocilizumab, trastuzumab,

vedolizumab, adalimumab, belimumab, canakinumab, denosumab, golimumab, ipilimumab, ofatumumab, panitumumab, QBEND-10, ustekinumab y combinaciones de estos.

En algunas modalidades, dicho epítipo específico para un anticuerpo monoclonal (epítipo específico para mAb) es un mimótopo o epítipo de CD20, por ejemplo, la SEQ ID NO: 229 y el mAb específico para el epítipo es rituximab.

En algunas modalidades, la etapa de administrar un anticuerpo monoclonal al sujeto comprende infundir al sujeto con el anticuerpo monoclonal. En algunas modalidades, la cantidad de mAb específico para el epítipo administrada al sujeto es suficiente para eliminar al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de las células inmunitarias que expresan CAR en el sujeto.

En algunas modalidades, la etapa de administrar un anticuerpo monoclonal al sujeto comprende infundir al sujeto con 375 mg/m² de rituximab, una o varias veces por semana.

En algunas modalidades, cuando las células inmunitarias que expresan un CAR que comprende un epítipo específico para mAb (células inmunitarias que expresan CAR) se agotan en un ensayo de CDC mediante el uso de mAb específico para el epítipo, la cantidad de células inmunitarias viables que expresan CAR disminuye, por ejemplo, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

En algunas modalidades, un fármaco citotóxico se acopla a los mAb específicos para el epítipo que se usan para agotar las células inmunitarias que expresan CAR. Al combinar las capacidades de direccionamiento de los anticuerpos monoclonales con la capacidad de eliminación celular de los fármacos citotóxicos, un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) permite una distinción sensible entre tejido saludable y enfermo en comparación con el uso del fármaco por sí solo. Se recibieron aprobaciones de comercialización para varios ADC; la tecnología para confeccionarlos, particularmente en enlazadores, se presenta de forma abundante en la siguiente técnica previa: (Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Trail et ál. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; patente estadounidense n.º 4,975,278).

En algunas modalidades, el mAb específico para el epítipo a infundir se conjuga de antemano con una molécula capaz de promover una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por lo tanto, el sistema de complemento complementa o contribuye a la capacidad de los anticuerpos de eliminar patógenos del organismo. Con la estimulación mediante uno de varios, se desencadena una cascada de activación como amplificación masiva de la respuesta y activación del complejo de ataque a la membrana de eliminación de células. Pueden usarse distintas moléculas para conjugar el mAb, tales como glicanos [Courtois, A, Gac-Breton, S., Berthou, C, Guezennec, J., Bordron, A. y Boisset, C. (2012), Complement dependent cytotoxicity activity of therapeutic antibody fragments is

Kits

5 La invención proporciona también kits para su uso en los presentes métodos. Los kits de la invención incluyen uno o más recipientes que comprenden un polinucleótido que codifica un CAR específico para FLT3, una célula inmunitaria modificada que comprende un polinucleótido que codifica un CAR específico para FLT3 o un anticuerpo específico para FLT, como se describe en la presente, e instrucciones para su uso, de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención
10 descritos en la presente. En general, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración de la célula inmunitaria modificada para los tratamientos terapéuticos descritos anteriormente.

Las instrucciones relacionadas con el uso de los anticuerpos o las células inmunitarias modificadas como se describe en la presente incluyen, en términos generales, información sobre la
15 dosificación, el cronograma de dosificación y la vía de administración para el tratamiento previsto. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones informáticas (por ejemplo,
20 instrucciones cargadas en un disco de almacenamiento óptico o magnético).

Los kits de la presente invención se encuentran en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, de modo no taxativo, viales, botellas, frascos, envases flexibles (por ejemplo, bolsas Mylar o de plástico selladas) y similares. También se contemplan envases a utilizar junto con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un
25 atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede tener una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección
30 hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un CAR específico para FLT3 o un anticuerpo específico para FLT3. El recipiente puede comprender además un segundo agente farmacéuticamente activo.

Opcionalmente, los kits pueden proporcionar componentes adicionales, tales como soluciones amortiguadoras e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una
35 etiqueta o prospecto en dicho recipiente o asociado con este.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de forma alguna. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las ilustradas y descritas en la presente, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción previa y quedan comprendidas por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Los materiales representativos de la presente invención se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, EUA, el 1.º de junio de 2017. El vector P3E10-VL que tiene el número de acceso de ATCC PTA-124228 es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera de P3E10 y el vector P3E10-VH que tiene el número de acceso de ATCC PTA-124227 es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada de P3E10. El depósito se realizó de conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest sobre Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes y sus Reglamentaciones (Tratado de Budapest). De esta manera se garantiza un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. ATCC pondrá a disposición el depósito de conformidad con los términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Pfizer Inc. y ATCC, lo que garantiza la disponibilidad permanente e ilimitada de la progenie del cultivo del depósito al público tras la emisión de la patente estadounidense pertinente o tras dejar abierta al público cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, lo que ocurra primero, y garantiza la disponibilidad de la progenie a uno que el Comisionado de Patentes y Marcas de Estados Unidos determine que tiene derecho de acuerdo con el título 35 del U.S.C., artículo 122, y las normas del Comisionado de conformidad con este (incluido el título 37 del C.F.R., artículo 1.14 con referencia específica a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o destruye cuando se cultiva en condiciones adecuadas, los materiales serán reemplazados de inmediato tras notificación con otro de la misma naturaleza. La disponibilidad del material depositado no se debe interpretar como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos otorgados en virtud de la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus normas en materia de patentes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Determinación de parámetros cinéticos y afinidad de las interacciones de FLT3 humana/anticuerpos para FLT3 a 37 °C

Este ejemplo determina los parámetros cinéticos y la afinidad de diversos anticuerpos anti-FLT3 a

37 °C. Todos los experimentos se llevaron a cabo en un biosensor de resonancia de plasmones superficiales Biacore T200 (GE Lifesciences, Piscataway NJ).

La preparación de chip sensor se llevó a cabo a 25 °C con un amortiguador de ejecución de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05 % (v/v), pH 7.4. Se confeccionó un chip sensor anti-Fc humano mediante la activación de todas las celdas de flujo de un chip sensor Biacore CM4 con una mezcla 1:1 (v/v) de EDC 400 mM y NHS 100 mM durante 7 minutos, a una velocidad de flujo de 10 µL/min. Se diluyó un reactivo anti-Fc humano (Anti-Fc de IgG humana de cabra, SouthernBiotech con n.º de catálogo 2081-01) a 30 µg/mL en acetato de sodio 10 mM con pH 4.5 y se inyectó en todas las celdas de flujo durante 7 minutos a 20 µL/min. Todas las celdas de flujo se bloquearon con etilendiamina 100 mM en amortiguador de borato 150 mM con pH 8.5 durante 7 minutos a 10 µL/min.

Los experimentos se llevaron a cabo a 37 °C con un amortiguador de ejecución de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05 % (v/v), pH 7.4, 1 mg/mL de BSA. Se capturaron los anticuerpos contra FLT3 de sobrenadantes sin dilución a celdas de flujo posteriores (celdas de flujo 2, 3 y 4) a una velocidad de flujo de 10 µL/min durante 1 minuto. Se capturaron distintos anticuerpos en cada celda de flujo. Se utilizó la celda de flujo 1 como superficie de referencia. Después de la captura de los anticuerpos contra FLT3, se inyectó analito (amortiguador, hFLT3) a 30 µL/min en todas las celdas de flujo durante dos minutos. Después de la inyección de analito, se monitoreó la disociación durante 10 minutos, seguida por la regeneración de todas las celdas de flujo con tres inyecciones de 1 minuto de ácido fosfórico 75 mM. Para cada anticuerpo contra FLT3 capturado, se realizaron las siguientes inyecciones de analito: amortiguador, hFLT3 11 nM, hFLT3 33 nM, hFLT3 100 nM y hFLT3 300 nM. Se recolectaron ciclos de amortiguador para cada anticuerpo contra FLT3 capturado con fines de referencia doble (con referencia doble como se describe en Myszk, D.G. Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.* **12**, 279-284 (1999)). Los sensogramas de referencia doble se ajustaron de forma global en un modelo de unión simple 1:1 *Langmuir* con transporte de masa.

Se muestran en la Tabla 7 los parámetros cinéticos y de afinidad para los anticuerpos anti-FLT3 evaluados. Los anticuerpos que se muestran en la Tabla 7 comparten las mismas regiones de VH y VL con los CAR que se muestran en la Tabla 8 que tienen el mismo nombre.

Tabla 7.

		Formato de IgG				Formato de scFv			
					huFlt3	mFlt3			
dominio	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (min)	K _D (nM)	K _d (nM)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (min)	K _D (nM)

P4F6	1	1,40E+05	3,50E-03	3,3	25	36,1	1,32E+05	1,99E-03	5,8	15,1
P4C7	1	1,60E+05	1,20E-03	9,3	7,7	402,4	1,21E+05	1,64E-03	7	13,6
P3A1	2-3	9,50E+04	6,00E-03	1,9	64	-	1,07E+05	1,67E-03	6,9	15,67
P5A3	2-3	9,80E+04	1,00E-02	1,2	102	19,3	8,10E+04	1,75E-02	0,7	216
P9B5	2-3	4,20E+04	4,70E-04	24,4	11	1,5	3,80E+04	6,87E-04	16,8	18,1
P9F1	2-3	1,80E+05	2,30E-02	0,5	127	-	2,26E+05	2,86E-02	0,4	126,5
P1B4	4	1,80E+05	5,80E-03	2	32	-	1,20E+05	3,27E-03	3,5	27,3
P1B11	4	1,20E+05	5,50E-03	2,1	45	-	8,47E+04	2,57E-03	4,5	30,3
P7H3	4	9,90E+05	1,80E-03	6,6	2	0,9	2,05E+05	1,87E-03	6,2	9,1
P3E10	4	1,80E+05	1,90E-02	0,6	106	-	1,72E+05	1,12E-02	1	65,1
P1A5	4	1,78E+06	3,47E-04	33	0,19	-	2,59E+05	2,92E-04	40	1,1
P4A4	4	1,16E+06	4,69E-04	25	0,4	-				
P1G12	4	6,17E+05	2,92E-04	40	0,47	6,5				
P4E5	4	1,20E+06	1,51E-04	77	0,13	18,9				
P5A4	4	5,53E+05	1,01E-04	114	0,18	-				
P5F7	4	6,36E+05	1,52E-04	76	0,24	-	1,89E+05	1,97E-04	59	1
P4H11	4	6,18E+04	1,44E-02	1	233	-	1,60E+05	9,33E-03	1	58,3
P15F7	5	1,40E+05	5,50E-03	2,1	38	-				
P12B6	5	1,10E+05	9,00E-03	1,3	84	-				
P7D3	5	7,10E+04	5,20E-03	2,2	72	-				
P7A6	5	3,40E+04	3,70E-04	31	11					
P8B6	5	9,30E+04	2,30E-04	51	2,5	-				
P14G2	5	1,40E+05	1,10E-03	10,7	8	-	9,35E+04	3,05E-04	37,9	3,3
P7F9	4	1,10E+05	1,30E-03	8,9	12	13,8	8,70E+04	2,41E-03	4,8	27,7

Ejemplo 2: Generación de linfocitos T con CAR específicos para FLT3

a) Plásmidos

Las siguientes secuencias de CAR de FLT3 optimizadas por codones enumeradas en la Tabla 8 que figura a continuación se sintetizaron y se subclonaron en un vector lentiviral tal como pLVX-EF1a-IRES-Puro (Clontech) mediante el uso de los sitios de restricción EcoRI (5') y MluI (3') (con lo que se elimina el casete IRES-Puro).

Tabla 8: Ejemplos de CAR específicos para FLT3

CAR	Secuencia de aminoácidos de CAR	Componentes
-----	---------------------------------	-------------

P1A5	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASG GVFSRYALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPMLGFANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATLDFGALDYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQAVDSSDL AWYQQKPGQAPRLLIYDAYTRPSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPETEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 233)	péptido señal de CD8 α ; VH de P1A5_VHVL; enlazador de GS; VL de P1A5_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ
P1B4	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASG GVFSRYALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPMLGFANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATLDFGALDYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVNEQL AWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSPPLTFGQGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPETEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 234)	péptido señal de CD8 α ; VH de P1B4_VHVL; enlazador de GS; VL de P1B4_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ
P3A1	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASG GTFSSYDISWVRQAPGQGLEWMGGIIPVSGRANYAQKFQGRVTITTD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVRPTYWPLDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPETEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 235)	péptido señal de CD8 α ; VH de P3A1_VHVL; enlazador de GS; VL de P3A1_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ

P3E10	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG GTFSSYAIQWVRQAPGQGLEWMGGIVGSWGLANYAQKFQGRVTITT DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATSAFGLASWGQGTLLTVSSGG GGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVPSQ LAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 236)	péptido señal de CD8 α ; VH de P3E10_VHVL; enlazador de GS; VL de P3E10_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ
P4C7	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG GTFSSYTISWVRQAPGQGLEWMGGIIPAFGIANYAQKFQGRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAKGGSYSLDYFDIWGQGTLLTVSSG GGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQYVSAS LLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYARSSTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 237)	péptido señal de CD8 α ; VH de P4C7_VHVL; enlazador de GS; VL de P4C7_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ
P4H11	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSSISGGGRSTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLSPSDVGVWGYGFDIWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSNTYLAWYQQKPGQAPRLLIYDTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 238)	péptido señal de CD8 α ; VH de P4H11_VHVL; enlazador de GS; VL de P4H11_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ

P5F7	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSSISGGGRSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLSPSDVGWGYGFDIWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYDTFTRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPTFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRL VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 239)	péptido señal de CD8 α ; VH de P5F7_VHVL; enlazador de GS; VL de P5F7_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ
P7H3	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTRWWWGDAFDHWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIG SKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISR VEAGDEADYYCQVWDSSTAWVFGGGTKLTVLTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRL VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 240)	péptido señal de CD8 α ; VH de P7H3_VHVL; enlazador de GS; VL de P7H3_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ
P8B6	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASG GTFSSYAVSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGIANAYAKFKQGRVTITADT STSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAIEGIGGDLRYDGYDAWGQGTLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSV SHSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASFRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSDPYTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIA QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 241)	péptido señal de CD8 α ; VH de P8B6_VHVL; enlazador de GS; VL de P8B6_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ

P9B5	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGF IFASYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISSGGSTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRV MAGLGYDPFDYWGGTLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSASGTPGQRV TISCSGSSS NIGSNYYVYQQPLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGVVF GGGTKLTVLTTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 242)	péptido señal de CD8 α ; VH de P9B5_VHVL; enlazador de GS; VL de P9B5_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ
P12B6	MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASG GTFMSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGIANYAQKFQGRVTITADK STSTAYMELSSLRSED TAVYYCARETLIPIPFELWGQGLTVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIVSSSYL AWYQQKPGQAPRLIYGASSRASGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPE DFAVYYCQQYGGSPYTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 243)	péptido señal de CD8 α ; VH de P12B6_VHVL; enlazador de GS; VL de P12B6_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ
P14G2	MALPVTALLPLALLHAARPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSNYVMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGATTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGLWAGGIWGGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYDASDLQRGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFA TYYCQQSYNTPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 244)	péptido señal de CD8 α ; VH de P14G2_VHVL; enlazador de GS; VL de P14G2_VHVL; Bisagra de CD8 α ; Dominio de TM de CD8 α ; ISD de 41BB; ISD de CD3 ζ

En algunos experimentos, la secuencia que codifica el CAR se ve precedida por una secuencia que codifica una proteína fluorescente tal como BFP (proteína fluorescente azul, por sus siglas en inglés) y se separa de dicha secuencia mediante una secuencia que codifica un péptido 2A autoescindible. Se produjeron lentivirus mediante el uso de psPAX2, un plásmido de envase de gag-pol de HIV-1, y pMD2.G, un plásmido de expresión de VSV-G.

b) Activación de linfocitos T y transducción lentiviral

Se aislaron linfocitos T sin modificar de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas mediante el uso del kit de aislamiento de linfocitos T Pan (Miltenyi Biotec) y se activaron durante tres días con anticuerpos contra CD2, CD3 y CD28 humanos (kit de activación/expansión de linfocitos T de Miltenyi Biotec). Se produjeron vectores lentivirales (LV, por sus siglas en inglés) mediante transfección transitoria de células HEK-293T/17 subconfluentes (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC)) en placas de 6 pocillos. En resumen, se transfectaron los plásmidos pLVX, psPAX2 y pMD2.G en una relación 4:3:1, respectivamente, mediante el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Al día siguiente, el medio se reemplazó con medio de cultivo de linfocitos T (suero AB humano al 5 % en medio X-vivo-15 (Lonza)), y 48 horas después de la transfección se cosechó el sobrenadante de LV y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0.45 μm (Millipore). Los linfocitos T activados se colocaron a razón de 0.25×10^6 células/mL en medio de cultivo de linfocitos T con 40 ng/ml de IL-2 y se transdujeron con la adición de un volumen igual de sobrenadante de LV fresco. Se usaron en estos experimentos LV con las siguientes construcciones de CAR: P1A5, P1B4, P3A1, P3E10, P4C7, P4H11, P7H3, P9B5, P12B6 y P14G2. Las células se cultivaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante tres días y se utilizaron para análisis de citometría de flujo o se expandieron en medio fresco de linfocitos T con 20 ng/ml de IL-2.

c) Medición de la eficacia de transducción mediante citometría de flujo

Para determinar la eficacia de transducción de las distintas construcciones lentivirales de CAR de FLT3, se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo en los linfocitos T 72 horas después de la transducción. En resumen, las células individuales se agruparon mediante el uso de parámetros de dispersión hacia adelante y lateral, y la eficacia de transducción se calculó como porcentaje de células positivas para BFP. En otros casos, las células que expresan CAR se detectaron mediante tinción con el anticuerpo anti-CD20 rituximab, que se une a los epítomos de CD20 en la molécula de CAR, seguido por anti-IgG humano conjugado con FITC. La FIG. 1 muestra que los linfocitos T activados se transdujeron de forma eficaz con las distintas construcciones de CAR de FLT3 con diversas eficacias (30 % a 70 %).

d) Los linfocitos T con CAR de FLT3FLT3 se diferencian durante el cultivo pero mantienen un porcentaje elevado de subconjuntos de linfocitos T de memoria

La expresión de los marcadores de activación CD25 y 4-1BB (CD137) en los linfocitos T con CAR durante el cultivo se ha asociado con el agotamiento de linfocitos T y una mayor diferenciación hacia el fenotipo efector de memoria (Long et ál., 2015). En este experimento, los linfocitos T transducidos con los CAR de P1A5, P1B4, P3A1, P3E10, P4C7, P4H11, P7H3, P9B5, P12B6 y

P14G2 se tiñeron con los anticuerpos de CD25 y CD137 diez días después de la estimulación y se analizaron mediante citometría de flujo. El grado de activación de linfocitos T se determinó mediante el porcentaje de linfocitos T positivos para CD25 y 4-1BB. Se incluyó una población de linfocitos T sin transducción (NT) para comparación (FIG. 2). La expresión de algunos CAR de FLT3FLT3 (P1A5, P12B6 y P14G2) se asoció con un estado “activado” (FIG. 2), mientras que la expresión de otros CAR de FLT3FLT3, que incluyeron P9B5, P3E10, P4C7 y P3A1, dio como resultado niveles de marcadores de activación comparables con los de las células no transducidas (FIG. 2). Los niveles mayores de la expresión del marcador de activación indican una mayor diferenciación de linfocitos T con CAR, lo que puede evaluarse al día 15 después de la estimulación al medir la expresión de CD62L y CD45RO en su superficie celular. En este experimento, los linfocitos T con CAR se tiñeron con estos marcadores mediante el uso de anticuerpos específicos y se clasificaron en cuatro categorías o subconjuntos distintos con un grado creciente de diferenciación: 1) células madre de memoria (Tscm) CD62L^{ALTA} CD45RO^{BAJA}; 2) células de memoria central (Tcm) CD62L^{ALTA} CD45RO^{BAJA}; células efectoras de memoria (Tem) CD62L^{BAJA} CD45RO^{ALTA}; y células efectoras CD62L^{BAJA} CD45RO^{ALTA}. La FIG. 3 muestra gráficas de FACS representativas para linfocitos T con CAR P9B5 (diferenciación baja) y linfocitos T con CAR P14G2 (diferenciación alta) y la composición de subconjunto de linfocitos T de todos los linfocitos T con CAR de FLT3FLT3 distintos al día 15 después de la estimulación. Los linfocitos T con CAR que presentan un fenotipo “activado” también mostraron un fenotipo más diferenciado (es decir, mayor porcentaje de células Tem y menor porcentaje de células Tscm) al final del cultivo (FIG. 3). En particular, la expresión de los CAR de FLT3 P9B5, P3A1, P7H3 y P3E10 se asoció con un porcentaje elevado de células de memoria de células madre y de memoria central, lo que se ha correlacionado con una mayor persistencia y eficacia antitumoral en sujetos con ALL y CLL (Xu et ál., *Blood*. 2014;123(24):3750-3759).

e) Proliferación in vitro y ensayo de actividad de eliminación a largo plazo

La capacidad de los linfocitos T con CAR de proliferar y lisar células objetivo que expresan el antígeno cognado es una forma eficaz de evaluar su actividad in vitro. Para monitorear la viabilidad de las células objetivo mediante luminiscencia, las células Molm13 que expresan FLT3 se transdujeron de forma estable para expresar el gen de luciferasa. Estas células objetivo Luc⁺ se incubaron luego con linfocitos T con CAR de FLT3 y se midió la actividad de eliminación y la proliferación de los linfocitos T con CAR mediante luminiscencia y conteo de células viables, respectivamente. Para un ensayo más riguroso diseñado para estresar las células efectoras (linfocitos T con CAR), se agregaron periódicamente nuevas células objetivo al cultivo inicial y se determinó mediante luminiscencia la actividad de eliminación a largo plazo de los linfocitos T con

CAR al final del cultivo (FIG. 4). De forma congruente con la mayor capacidad proliferativa de los linfocitos T de memoria de células madre y de memoria central, las poblaciones de linfocitos T con CAR P9B5, P3A1, P7H3, y P3E10 mostraron una mayor expansión dependiente del objetivo y actividad citotóxica a largo plazo *in vitro*, mientras que los linfocitos T con CAR con un grado mayor de diferenciación tales como P12B6 y P14G2 se expandieron de forma deficiente en presencia de las células objetivo y tuvieron una actividad menor de eliminación.

f) Actividad de linfocitos T con CAR específicos para FLT3 en un ensayo de ratón ortotópico

Este ejemplo ilustra el tratamiento de AML con linfocitos T con CAR de FLT3 con el modelo ortotópico de Eo1. Se llevó a cabo un estudio de eficacia *in vivo* de linfocitos T con CAR de FLT3 con células Eo1, que expresaban luciferasa y GFP, en un modelo ortotópico. Se inyectaron tres mil células Eo1 Luc2AGFP por vía intravenosa a través de la vena de la cola en animales hembra CB17/SCID de 6-8 semanas. La inyección intraperitoneal de D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, IL) (200 μ L por animal a 15 mg/mL), seguida por anestesia con isofluorano y posterior imagenología de bioluminiscencia (BLI) de cuerpo completo permitieron monitorear la carga tumoral. Se capturaron imágenes bioluminescentes emitidas por la interacción entre la luciferasa expresada por las células tumorales y luciferina a través de imagenología con un IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, MA) y se cuantificaron como flujo total (fotones/seg) mediante el uso de Living Image 4.4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA).

Cuando el flujo total alcanzó un promedio de 30E6 para todos los animales (día 10 después del implante del tumor), los animales se dividieron de forma aleatoria en tres grupos. A cada grupo se le administró una de las siguientes células: 1) linfocitos T no transducidos utilizados como control, 2) linfocitos T con CAR de FLT3 que expresan P3E10 ("P3E10 V1") o 3) linfocitos T con CAR de FLT3 que expresan P3A1 ("P3A1 v1"). Todas las células 1-3 poseen TCR α . Los linfocitos T con CAR de FLT3 se prepararon como se describió en el ejemplo que antecede. Las construcciones de CAR de FLT3 P3E10 y P3A1 se muestran en la Tabla 8 que antecede. Se administró una única dosis de 2.5 o 5 millones de células de control (NT) o linfocitos T con CAR de FLT3 (P3E10 o P3A1) a través de inyección de bolo en la vena de la cola. Los animales se sacrificaron cuando perdieron más del 15 % del peso corporal total, un punto final para los modelos ortotópicos de Eo1.

Los resultados del estudio se resumen en la FIG. 5. Una única dosis de 5 millones de linfocitos T con CAR de FLT3 P3E10 o P3A1 o 2.5 millones de linfocitos T con CAR de FLT3 P3E10 tuvo como resultado un flujo total menor en los días 13-43 después del implante del tumor en comparación con el control negativo. Por lo tanto, el tratamiento con los linfocitos T con CAR de FLT3 inhibió la evolución del tumor en comparación con el control negativo.

Estos resultados demuestran que los linfocitos T con CAR de FLT3 son eficaces para la inhibición de la evolución del tumor.

Ejemplo 3: Agotamiento de linfocitos T con CAR específicos para FLT3 que expresan epítomos de CD20

a) Los linfocitos T con CAR específicos para FLT3 que expresan epítomos de CD20 son sensibles a la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en presencia de rituximab

Se evaluó la sensibilidad de los linfocitos T con CAR específicos para FLT3 al complemento en presencia de un anticuerpo anti-CD20 *in vitro* mediante el uso de un ensayo de CDC. Para este experimento, los linfocitos T transducidos con una construcción lentiviral para la expresión de un CAR de FLT3 con epítomos de CD20 en el dominio experimento se mezclaron con 25 % de complemento (AbD serotec) en presencia o ausencia de rituximab (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 4 horas. El agotamiento de linfocitos T con CAR de FLT3 se determinó mediante análisis de citometría de flujo con proteína FLT3 biotinilada. La FIG. 6 muestra que las células que expresan el CAR de FLT3 y los epítomos de CD20 se agotaron de forma eficaz en presencia del anticuerpo y el complemento, mientras que los linfocitos T con CAR específicos para FLT3 que no expresan los epítomos de CD20 se vieron afectados de forma mínima.

Estos resultados demuestran que los linfocitos T con CAR específicos para FLT3 que expresan epítomos de CD20 pueden agotarse *in vitro* en presencia de rituximab y complemento.

b) El agotamiento de linfocitos T con CAR de FLT3 después de la administración de rituximab permite la recuperación de progenitores de médula ósea que expresan FLT3 en ratones NSG

Se evaluó en ratones la capacidad del anticuerpo anti-CD20 rituximab de mediar el agotamiento de linfocitos T con CAR específicos para FLT3 que expresan epítomos de CD20 y facilitar la recuperación. En este experimento, los ratones fueron tratados con linfocitos T que expresan ya sea un CAR de FLT3 que puede unirse a la proteína FLT3 de ratón en la superficie de los progenitores de médula ósea (T con CAR de FLT3 de ratón α) y que comprenden un epítopo de CD20 reconocido por rituximab o un CAR de control, con unión insignificante a la proteína FLT3 de ratón. Se usó un análisis de citometría de flujo de las células de la médula ósea para demostrar la actividad citotóxica de los linfocitos T con CAR contra progenitores hematopoyéticos que expresan FLT3, lo que se ve como una reducción de progenitores en comparación con ratones que recibieron linfocitos T con CAR de control o con los ratones sin tratamiento (FIG. 7, Panel B). Después de la confirmación de la actividad de eliminación de los linfocitos T con CAR, se le proporcionó a los ratones rituximab durante cuatro días consecutivos y los linfocitos T con CAR

residuoales circulantes se enumeraron mediante citometría de flujo al día 13. La FIG. 7, Panel C muestra que los linfocitos T con CAR de FLT3 en la sangre de estos ratones se agotaron en comparación con el grupo de control, que no recibió rituximab. Finalmente, el análisis de citometría de flujo de las células de la médula ósea demostró que solamente los ratones que recibieron rituximab (día 20) mostraron una recuperación de la médula ósea (FIG. 7, Panel D).

Este experimento demuestra que el agotamiento dependiente de rituximab de los linfocitos T con CAR de FLT3 que expresan epítomos de CD20 mitiga el daño a los tejidos que expresan FLT3 tales como la médula ósea, lo que permite una recuperación rápida de la médula ósea de células progenitoras residuales.

Si bien las indicaciones divulgadas se describieron con referencia a diversas aplicaciones, métodos, kits y composiciones, se apreciará que es posible realizar diversos cambios y modificaciones sin apartarse de las indicaciones de la presente y de la invención reivindicada que figura más adelante. Los ejemplos que anteceden se proporcionan para ilustrar las indicaciones descritas y no se pretende que limiten el alcance de lo indicado en la presente. Si bien las indicaciones de la presente se describieron en términos de estos ejemplos de modalidades, el experto en la técnica comprenderá fácilmente que son posibles numerosas variaciones y modificaciones de estos ejemplos de modalidades sin experimentación indebida. Todas estas variaciones y modificaciones se encuentran dentro del alcance de las indicaciones actuales.

Todas las referencias citadas en la presente, que incluyen patentes, solicitudes de patente, documentos, libros de texto y similares, y las referencias citadas en la presente se incorporan mediante esta referencia en su totalidad, en la medida en que todavía no se haya realizado. En caso de que uno o más de los materiales similares y bibliografía incorporados difieran o contradigan la presente solicitud, lo que incluye, de modo no taxativo, términos definidos, uso de términos, técnicas descritas, o similares, prevalecerá la solicitud.

La descripción y los Ejemplos que anteceden detallan determinadas modalidades específicas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Sin embargo, cabe destacar que, sin importar qué tan detallado parezca el texto que antecede, la invención puede ponerse en práctica de muchas formas y debería interpretarse la invención de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y todo equivalente de estas.