

RECEPTORES QUIMÉRICOS Y METODOS DE USO DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 62/317.068, presentada el 1 de abril de 2016, la cual se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 30 de marzo de 2017, se llama K-1029_02_SL.txt y tiene un tamaño de 265.854 bytes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] La lectina tipo C-1 (CLL-1, también conocida como CLEC-1, CLEC12A, MICL, lectina asociada a células dendríticas-1 (DCAL-1), y DCAL-2) es un receptor de glicoproteína y miembro de una familia de receptores de tipo lectina de tipo C implicados en la regulación de la proliferación celular y la regulación inmune. CLL-1 se expresa en células hematopoyéticas, principalmente en células inmunes innatas incluyendo monocitos, granulocitos, células dendríticas, así como células progenitoras mieloides. Van Rhenen *et al.*, Blood 2007: 110 (7). CLL-1 se ha implicado en la regulación de la proliferación y diferenciación de células mieloides (Bakker *et al.*, Cancer Res. 64:8443-8450 (2004); Marshall *et al.*, J. Biol. Chem. 279:14792-14802 (2004)), y está presente en células de leucemia mieloide aguda (mielógena) (AML), así como en células madre leucémicas (Zhao *et al.*, Haematologica 2010, 95 (1): 71-78).

[0004] Por consiguiente, CLL-1 ha estado implicada en múltiples enfermedades, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia mieloide aguda (mielógena) (AML), leucemia mieloide (mielógena) crónica, leucemia mielomonocítica crónica (CMML), leucemia mielomonocítica juvenil, leucemia mieloide crónica atípica, leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia monocítica aguda, leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroide aguda, leucemia megacarioblástica aguda, síndrome mielodisplásico (MDS), trastorno mieloproliferativo, neoplasia mieloide, sarcoma mieloide), Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), o combinaciones de los mismos.

[0005] La CLL–1 puede desempeñar además un papel en enfermedades inflamatorias o autoinmunes tales como artritis reumatoide, psoriasis, alergias, asma, enfermedad de Crohn, IBD, IBS, fibromialgia, mastocitosis y enfermedad celíaca.

[0006] La proteína CLL–1 humana comprende un polipéptido de la siguiente secuencia de aminoácidos:

MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLLL
 IGLGVLASMFHVTCLKIEMKKMNKLQNISEELQRNISLQLMSNMNISNKIRNLST
 TLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYFLSDDVQTWQESKMA
 CAAQNASLLKINNKNLEFIKSQSRSYDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSA
 WVIRNAPDLNNMYCGYINRLYVQYYHCTYKKRMICEKMANPVQLGSTYFRE
 A (SEC. ID. NO. 140).

[0007] La información de secuencias adicional está contenida en el listado de Uniprot de CLL–1 en: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5QGZ9>, así como en la secuencia de referencia de NCBI NP_612210.4 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_612210.4).

[0008] Cuando se hace referencia a CLL–1, se apreciará que la referencia a la misma abarca sus fragmentos, así como polipéptidos relacionados, que incluyen, pero no se limitan a, variantes alélicas, variantes de empalme, variantes derivadas, variantes de sustitución, variantes de delección, y/o variantes de inserción incluyendo la adición de una metionina N–terminal, polipéptidos de fusión y homólogos interespecies. En ciertas formas de realización, un polipéptido de CLL–1 incluye residuos terminales, tales como, pero sin limitarse a, residuos de secuencia líder, residuos objetivo, residuos de metionina amino–terminal, residuos de lisina, residuos de etiqueta y/o residuos de proteína de fusión.

[0009] Ciertos anticuerpos para CLL–1 se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 8.536.310 y en la Patente de los Estados Unidos N° 9.163.090.

[0010] Se ha demostrado que las células inmunes diseñadas poseen cualidades deseadas en tratamientos terapéuticos, particularmente en oncología. Dos tipos principales de células inmunitarias diseñadas son aquellas que contienen receptores de antígenos quiméricos (denominados "CAR" o "CAR–T") y receptores de células T ("TCR"). Estas células diseñadas están manipuladas para dotarlas de

especificidad de antígeno mientras que conservan o mejoran su capacidad para reconocer y matar a una célula objetivo. Los receptores de antígenos quiméricos pueden comprender, por ejemplo, (i) un componente específico del antígeno ("molécula de unión al antígeno"), (ii) un dominio extracelular, (iii) uno o más dominios coestimuladores, y (iv) uno o más dominios activadores. Cada dominio puede ser heterogéneo, es decir, estar compuesto por secuencias derivadas de (o correspondientes a) cadenas de proteínas diferentes. Las células inmunitarias que expresan el receptor de antígeno quimérico (tales como células T) pueden utilizarse en diversas terapias, incluyendo terapias contra el cáncer. Se apreciará que pueden utilizarse dominios costimuladores para potenciar la activación de células que expresan CAR contra antígenos objetivo, y por lo tanto aumentar la potencia de inmunoterapia adoptiva.

[0011] Ciertos CAR para CLL-1 se han descrito en, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. 20160051651 (PCT US2015/041337).

[0012] Las células T se pueden manipular para poseer especificidad para uno o más objetivos deseados. Por ejemplo, las células T se pueden transducir con ADN u otro material genético que codifica una molécula de unión a antígeno, tal como uno o más fragmentos variables de cadena sencilla ("scFv") de un anticuerpo, en conjunción con una o más moléculas de señalización y/o uno o más dominios activantes, tales como CD3 zeta.

[0013] Además de la capacidad de las células T-CAR para reconocer y destruir las células objetivo, la terapia con células T exitosa se beneficia de la capacidad de las células T-CAR de persistir y mantener la capacidad para proliferar en respuesta al antígeno.

[0014] Los receptores de células T (TCR) son moléculas encontradas en la superficie de células T que son responsables de reconocer fragmentos de antígeno como péptidos unidos a moléculas de complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). El TCR se compone de dos cadenas de proteínas diferentes – en aproximadamente el 95% de los TCR humanos, el TCR consiste en una cadena alfa (α) y beta (β). En aproximadamente el 5% de las células T humanas, el TCR consiste en cadenas gamma y delta (γ/δ). Cada cadena está compuesta por dos dominios extracelulares: una región variable (V) y una región constante (C), ambas de la superfamilia de inmunoglobulinas. Al igual que en otras inmunoglobulinas, los dominios variables de la cadena α de TCR y de la cadena β (o cadenas gamma y delta (γ/δ)) tienen cada

uno tres regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Cuando el TCR se relaciona con péptido antigénico y MHC (péptido/MHC), la célula T se activa, lo que le permite atacar y destruir la célula objetivo.

[0015] Sin embargo, las terapias actuales han mostrado niveles variables de eficacia con efectos secundarios no deseados. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar terapias nuevas y mejoradas para tratar enfermedades y trastornos relacionados con CLL-1.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0016] La invención se refiere a células inmunitarias manipuladas (tales como CAR o TCR), moléculas de unión a antígenos (incluyendo pero sin limitarse a, anticuerpos, scFvs, cadenas pesadas y/o ligeras y CDR de estas moléculas de unión a antígeno) con especificidad para CLL-1 y a polinucleótidos codificantes para los anteriores.

[0017] La invención se refiere además a una nueva secuencia (bisagra) CD28 extracelular útil como dominios coestimuladores en estas células.

[0018] Los receptores de antígenos quiméricos codificados por los polinucleótidos de la invención típicamente comprenden: (i) una molécula de unión al antígeno específico de CLL-1, (ii) un dominio extracelular (que puede comprender una bisagra), (iii) uno o más dominio coestimulador y (iv) uno o más dominios activantes. Se apreciará que cada dominio puede ser heterogéneo, comprendiendo por lo tanto secuencias derivadas de (o correspondientes a) cadenas de proteínas diferentes.

[0019] La invención se refiere además a polinucleótidos aislados que codifican los receptores de antígenos quiméricos, y vectores que comprenden los polinucleótidos. Cualquier vector conocido en la técnica puede ser adecuado para la presente invención. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral. En algunas realizaciones, el vector es un vector retroviral (tal como pMSVG1), un vector de ADN, un vector de virus de la leucemia murina, un vector SFG, un plásmido, un vector de ARN, un vector adenovírico, un vector baculoviral, un vector viral de Epstein Barr, un vector papovaviral, un vector viral vaccinia, un vector viral herpes

simplex, un vector asociado a adenovirus (AAV), un vector lentiviral (tal como pGAR), o cualquier combinación de los mismos. La secuencia pGAR es la siguiente:

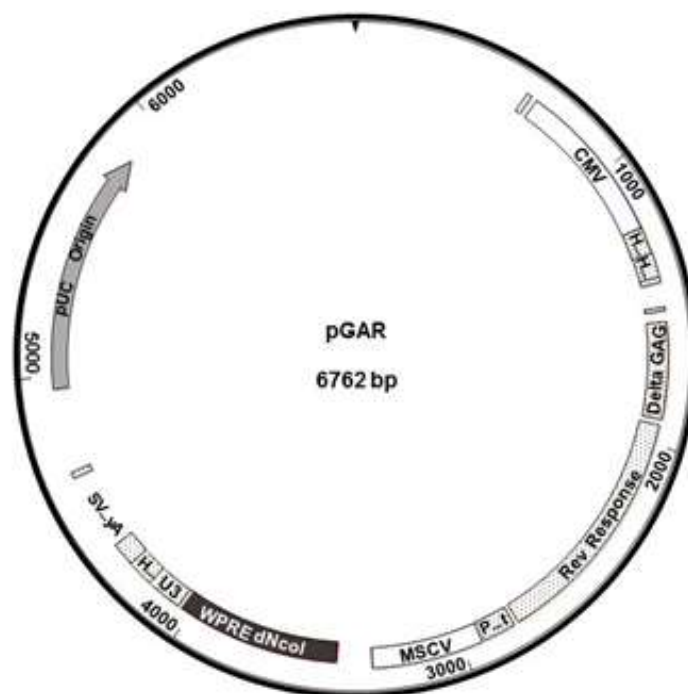
[0020] CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTG
 GTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCT
 TTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCAAG
 CTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCT
 CGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCC
 CTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG
 GACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTT
 GATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT
 TTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTGCCA
 TTCGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGGCCTC
 TTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAG
 TTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
 TGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGACCCGGGGATGGCGCGCCAGTA
 ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACAT
 AACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCAT
 TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCAT
 TGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
 AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
 GCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGG
 CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTTGCA
 GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTC
 CACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACT
 TTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGC
 GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGGTC
 TCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAA
 CCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGT
 GCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT
 CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAA
 AGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGC
 GCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTG
 ACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAG
 CGGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA
 AAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAAC
 GATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAAT
 ACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCA

TTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAA
 AGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAG
 ACCACCGCACAGCAAGCCGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATAT
 GAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAAC
 CATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAA
 AAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAG
 GAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAAT
 TATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGC
 GCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGC
 AAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATT
 TGGGGTTGCTCTGGAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTA
 GTTGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGA
 GTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAG
 AATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAA
 TGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAA
 ATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTG
 TACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAG
 ACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGA
 AGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATC
 TCGACGGTATCGGTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAG
 TGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA
 TTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAATTTTATCGCGATCGCGGAATGAAAG
 ACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGAAGGC
 ATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGGAACAG
 AGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTG
 CCCC GGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTC
 AGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAA
 AATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGT
 TCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACT
 CGGCGCGCCAGTCCTTCGAAGTAGATCTTTGTCGATCCTACCATCCACTCGA
 CACACCCGCCAGCGGCCGCTGCCAAGCTTCCGAGCTCTCGAATTAATTCAC
 GGTACCCACCATGGCCTAGGGAGACTAGTCGAATCGATATCAACCTCTGGAT
 TACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTTACG
 CTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTAT
 GGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGG
 AGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTG
 ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCG
 GGACTTTCGCTTTCCTCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCT

GCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCG
 TGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTTCATGGCTGCTCGCCTGTGTTG
 CCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCA
 ATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTC
 CGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCT
 CCCC GCCTGGTTAATTAAAGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCT
 GTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCGAATTC
 ACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTA
 GACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTT
 AAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGT
 TGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAA
 AATCTCTAGCAGGCATGCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACA
 AACCACA ACTAG AATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATG
 CTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACA
 ATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTG
 GCGCGCCATCGTCGAGGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGAGCTTGGCG
 TAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCC
 ACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATG
 AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCG
 GGAAACCTGTGCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGA
 GGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTG
 CGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTA
 ATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA
 AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTT
 TCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTC
 AGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG
 GAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACC
 TGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTG
 TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA
 CGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCT
 TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
 TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA
 GTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCT
 CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
 AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTAC
 GCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCT
 GACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAT
 CAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAA

TCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT
 GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACT
 CCCCCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAG
 TGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGC
 AATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTT
 ATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGT
 TCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGG
 TGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTCAACGATC
 AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTC
 GGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGG
 TTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTT
 TCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGC
 GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATA
 GCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC
 CTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA
 CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAA
 AACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATG
 TTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA
 TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAG
 GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

[0021] El mapa del vector PGAR se expone a continuación:



[0022] Los vectores ejemplares adicionales adecuados incluyen, por ejemplo, pBABE-puro, pBABE-neo ADNcTgrande, pBABE-hygro-hTERT, pMKO.1 GFP, MSCV-IRES-GFP, pMSCV PIG (plásmido vacío Puro IRES GFP), pMSCV-loxp-dsRed-loxp -eGFP-Puro-WPRE, MSCV IRES Luciferasa, pMIG, MDH1-PGK-GFP_2.0, TtRMPVIR, pMSCV-IRES-mCherry FP, pRetroX GFP T2A Cre, pRXTN, pLncEXP y pLXIN-Luc.

[0023] Las células inmunitarias ejemplares incluyen, pero no se limitan a, células T, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, células que expresan TCR, células dendríticas o células NK-T. Las células T pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas. En otras formas de realización, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las células inmunes de las descritas en el presente documento.

[0024] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden al menos una de las siguientes: SEC. ID. NO: 27; SEC. ID. NO: 31; SEC. ID. NO: 35; SEC. ID. NO: 39; SEC. ID. NO: 43; SEC. ID. NO: 47; SEC. ID. NO: 61; SEC. ID. NO: 65; SEC. ID. NO: 69; SEC. ID. NO: 83; SEC. ID. NO: 87; SEC. ID. NO: 91; SEC. ID. NO: 105; SEC. ID. NO: 109; SEC. ID. NO: 113; SEC. ID. NO: 117; SEC. ID. NO: 121; y SEC. ID. NO: 125.

[0025] En ciertas formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que tienen al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96% al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntico a los polinucleótidos expuestos en el presente documento.

[0026] La invención se refiere además a vectores que comprenden estos polinucleótidos, así como células transducidas utilizando estos vectores.

[0027] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR) que comprenden una molécula de unión a antígeno que se une

específicamente a CLL-1, en donde la molécula de unión a antígeno comprende una CDR3 de cadena pesada variable (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC. ID. NO: 19, 53, 75 y 97. También están incluidos en la invención los receptores de antígeno quiméricos que no tienen más de 8 sustituciones de aminoácidos en los mismos. Los polinucleótidos pueden comprender además un dominio de activación. En formas de realización preferidas, el dominio de activación es CD3, de modo más preferente CD3 zeta, de modo más preferente la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC. ID. NO: 9.

[0028] En otras formas de realización, la invención incluye un dominio costimulador que comprende el dominio de señalización (u otra porción adecuada) de CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (alfa, beta, delta, épsilon, gamma, zeta), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD 33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 14; TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor gamma Fc, molécula MHC de clase I, TNF, TNFr, integrina, molécula de activación linfocítica de señalización, BTLA, receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, ligando CD83, o fragmentos o combinaciones de los mismos. Los dominios costimuladores preferidos se enumeran a continuación.

[0029] En formas de realización adicionales, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) o receptor de células T (TCR), en donde dicho CAR o TCR comprende una molécula de unión al antígeno que se une específicamente a CLL-1, y en donde la molécula de unión al antígeno comprende una CDR3 de cadena ligera variable (V_L) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC. ID. NO: 24, 58, 80 y 102. El polinucleótido puede comprender además un

dominio de activación. El polinucleótido puede comprender además un dominio coestimulador.

[0030] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) o receptor de células T (TCR) que comprende una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a CLL-1, en donde la cadena pesada de la molécula de unión a antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 17), CDR2 (SEC. ID. NO: 18) y CDR3 (SEC. ID. NO: 19) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 22), CDR2 (SEC. ID. NO: 23), y CDR3 (SEC ID NO: 24).

[0031] En ciertas formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que tienen al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntico a las secuencias anteriores.

[0032] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) o receptor de células T (TCR) que comprende una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a CLL-1, en donde la cadena pesada de la molécula de unión a antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 51), CDR2 (ID SEC NO: 52) y CDR3 (ID SEC NO: 53) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 56), CDR2 (SEC. ID. NO: 57) y CDR3 (SEC. ID. NO: 58).

[0033] En ciertas formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que tienen al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntico a las secuencias anteriores.

[0034] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) o receptor de células T (TCR) que comprende una molécula de unión a antígeno que se une

específicamente a CLL-1, en donde la cadena pesada de la molécula de unión a antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 73), CDR2 (SEC. ID. NO: 74), y CDR3 (SEC. ID. NO: 75) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 78), CDR2 (SEC. ID. NO: 79) y CDR3 (SEC. ID. NO: 80).

[0035] En ciertas formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que tienen al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntico a las secuencias anteriores.

[0036] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) o receptor de células T (TCR) que comprende una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a CLL-1, en donde la cadena pesada de la molécula de unión a antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 95), CDR2 (SEC. ID. NO: 96) y CDR3 (SEC. ID. NO: 97) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 100), CDR2 (SEC. ID. NO: 101), y CDR3 (SEC. ID. NO: 102).

[0037] En ciertas formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que tienen al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntico a las secuencias anteriores.

[0038] En formas de realización adicionales, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR) que comprende una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a CLL-1, y en donde la molécula de unión a antígeno comprende:

- (a) una región determinante de la complementariedad de la región variable de la cadena pesada (VH) (CDR) 1 que comprende la secuencia de aminoácidos GX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉ (SEC. ID. NO: 134),

en donde X_2 es G, F, o Y; X_3 es S o T; X_4 es I, F, o L; X_5 es S o T; X_6 no está presente o S; X_7 no está presente o G; X_8 no está presente o E o G; y X_9 es F, L, o Y;

- (b) una región determinante de la complementariedad de la región variable de la cadena pesada (VH) (CDR) 2 que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (SEC. ID. NO: 135), en donde X_1 es D, H, S, o Y; X_2 es H, P, o Y; X_3 es D, E, o S; X_4 es D o G; X_5 es G o S; y X_6 no está presente de D o E;
- (c) una región determinante de la complementariedad de la región variable de la cadena pesada (VH) (CDR) 3, que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}DY$ (SEC. ID. NO: 136), en donde X_1 es E o L; X_2 es R, S, o V; X_3 es R o Y; X_4 es C, G, o S; X_5 no está presente o G o I; X_6 no está presente o G; X_7 no está presente o D; X_8 no está presente o C; X_9 no está presente o W o Y; X_{10} no está presente o P o S; X_{11} no está presente o G o Y; y X_{12} es F o R;
- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1ASQX_5X_6X_7X_8X_9LX_{11}$ (SEC. ID. NO: 137), en donde X_1 es Q o R; X_5 es D o S; X_6 es I o V; X_7 es N o S; X_8 es N o S; X_9 es F, L, o Y; y X_{11} es N o T;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1ASX_4X_5X_6X_7$ (SEC. ID. NO: 138), en donde X_1 es D o G; X_4 es N, S, o T; X_5 es L o R; X_6 es A, E, o K; y X_7 es S o T; y/o
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_3X_4X_5X_6PX_8T$ (SEC. ID. NO: 139), en donde X_3 es S o Y; X_4 es D, G, o Y; X_5 es N, S, o T; X_6 es L, T, o Y; y X_8 es F o I.

[0039] La invención se refiere además a métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto las moléculas de unión al antígeno, los CAR, los TCR, los polinucleótidos, los vectores, las células o las composiciones de acuerdo con la invención. Las enfermedades

adecuadas para el tratamiento incluyen, pero no se limitan a, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML), leucemia mielomonocítica juvenil, leucemia mieloide crónica atípica, leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroide aguda, leucemia megacarioblástica aguda, síndrome mielodisplásico (SMD), trastorno mieloproliferativo, neoplasia mieloide, sarcoma mieloide), neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN) o combinaciones de las mismas. Otras enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes tales como artritis reumatoide, psoriasis, alergias, asma, enfermedad de Crohn, IBD, IBS, fibromialgia, mastocitosis y enfermedad celíaca.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0040] La Figura 1 muestra la expresión de CLL-1 en diferentes líneas celulares de cáncer.

[0041] La Figura 2 muestra la expresión de CAR CLL-1 determinada por la proteína L 6 horas después de la electroporación del ARNm.

[0042] La Figura 3 muestra los resultados de un ensayo de liberación de citoquinas de diferentes constructos de célula T-CAR CLL-1 24 horas después de la electroporación del ARNm.

[0043] La Figura 4 muestra la actividad citolítica de diferentes constructos de célula T-CAR CLL-1 24 horas después de la electroporación del ARNm.

[0044] La Figura 5 muestra la actividad citolítica de diferentes constructos de célula T-CAR CLL-1 24 horas después de la electroporación del ARNm.

[0045] La Figura 6 muestra la expresión de CAR CLL-1 determinada por la proteína L al día 12 después de la transducción.

[0046] La Figura 7 muestra el ensayo de liberación de citoquinas a partir de célula T-CAR CLL-1 16 horas después del co-cultivo con diferentes líneas celulares objetivo.

[0047] La Figura 8 muestra la actividad citolítica de célula T-CAR CLL-1 16 horas y 40 horas después del co-cultivo con diferentes líneas celulares objetivo.

[0048] Las Figuras 9A–9D establecen alineaciones de secuencia de las moléculas de unión al antígeno CLL–1 de la invención. Las CDR se anotan en cajas.

[0049] La Figura 10 presenta resultados de bioluminiscencia en ratones NSG tratados con CAR de acuerdo con la invención.

DESCRPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0050] Se apreciará que los receptores de antígenos quiméricos (CAR o CAR–T) y los receptores de células T (TCR) son receptores manipulados genéticamente. Estos receptores manipulados pueden ser fácilmente insertados y expresados por células inmunes, incluyendo las células T de acuerdo con las técnicas conocidas en el arte. Con un CAR, se puede programar un solo receptor para reconocer un antígeno específico y, cuando está unido a ese antígeno, activar la célula inmune para atacar y destruir la célula que lleva ese antígeno. Cuando estos antígenos existen en las células tumorales, una célula inmunitaria que expresa el CAR puede dirigirse y matar a la célula tumoral.

[0051] Los CAR pueden ser manipulados para unirse a un antígeno (tal como un antígeno de superficie celular) incorporando una molécula de unión al antígeno que interactúa con ese antígeno dirigido. De modo preferente, la molécula de unión al antígeno es un fragmento de anticuerpo del mismo, y de modo más preferente uno o más fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla ("scFv"). Un scFv es un fragmento de anticuerpo de cadena única que tiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo unido entre sí. Véanse las Patentes de los Estados Unidos Nº 7.741.465 y 6.319.494, así como Eshhar *et al.*, Cancer Immunol Immunotherapy (1997) 45: 131–136. Un scFv retiene la capacidad del anticuerpo progenitor para interactuar específicamente con el antígeno objetivo. Los scFvs son preferidos para su uso en receptores de antígenos quiméricos porque se pueden manipular para expresarse como parte de una cadena única junto con los otros componentes de CAR. *Id.* Véase también Krause *et al.*, J. Exp. Med., Volumen 188, Nº 4, 1998 (619 – 626); Finney *et al.*, *Journal of Immunology*, 1998, 161: 2791 – 2797. Se apreciará que la molécula de unión al antígeno está típicamente contenida dentro de la porción extracelular del CAR de tal manera que es capaz de reconocer y unirse al antígeno de interés. Se contemplan CAR biespecíficos y multiespecíficos

dentro del alcance de la invención, con especificidad para más de un objetivo de interés.

Dominios Coestimuladores.

[0052] Los receptores antígenos quiméricos pueden incorporar dominios coestimuladores (señalización) para aumentar su potencia. Véanse las Patentes de los Estados Unidos N° 7.741.465 y 6.319.494, así como Krause *et al.* y Finney *et al.* (supra), Song *et al.*, Blood 119: 696 – 706 (2012); Kalos *et al.*, Sci Transl. Med. 3:95 (2011); Porter *et al.*, N. Engl. J. Med. 365: 725 – 33 (2011), y Gross *et al.*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56: 59 – 83 (2016). Por ejemplo, CD28 es una proteína coestimuladora que se encuentra naturalmente en las células T. Una variedad de moléculas coestimuladoras se exponen en el presente documento, pero se apreciará que también se incluyen dentro del alcance de la presente invención moléculas coestimuladoras adicionales.

[0053] La secuencia de aminoácidos nativa completa de CD28 se describe en la Secuencia de Referencia NCBI: NP_006130.1. La secuencia completa de ácido nucleico CD28 nativo se describe en la Secuencia de Referencia NCBI: NM_006139.1.

[0054] Se han utilizado ciertos dominios CD28 en receptores antígenos quiméricos. De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto ahora que un constructo novedoso extracelular CD28 (bisagra), denominado "CD28T", proporciona inesperadamente ciertos beneficios cuando se utiliza en un constructo CAR. Este constructo demuestra la capacidad de retener (y en ocasiones exceder) las propiedades de CAR que contienen CD28, a pesar del truncamiento (eliminación) de múltiples aminoácidos de la secuencia extracelular de CD28. Estos beneficios incluyen la producción de citocina equivalente o superior, actividad citolítica equivalente o superior, y/o niveles de expresión de CAR equivalentes o superiores.

[0055] La secuencia nucleotídica de la molécula CD28T, incluyendo el dominio extracelular, y los dominios transmembrana e intracelular CD28 se expone en la SEC. ID. NO. 1

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCA
CCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTG
GTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTT
TTATAATCTTCTGGGTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATT

ACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAG
CCTTACGCACCACCTAGAGATTTCGCTGCCTATCGGAGC

[0056] La secuencia de aminoácidos correspondiente se expone en la SEC. ID. NO. 2:

LDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII
FWVRSK RSRLHSDYM NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAYRS

[0057] La secuencia de nucleótidos de la porción extracelular de CD28T se expone en la SEC. ID. NO. 3:

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCAAGCA
CCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA

[0058] La secuencia de aminoácidos correspondiente del dominio extracelular de CD28T se expone en la SEC. ID. NO. 4: LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP

[0059] La secuencia nucleotídica del dominio transmembrana CD28 se expone en la SEC. ID. NO. 5):

TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCG
TCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT

[0060] La secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana CD28 se expone en

SEC. ID. NO. 6: FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFII FWV

[0061] La secuencia nucleotídica del dominio de señalización intracelular CD28 se expone en la SEC. ID. NO. 7:

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCC
ACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTA
GAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGC

[0062] La secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular CD28 se expone en la SEC. ID. NO. 8:

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0063] Las secuencias CD28 adicionales adecuadas para su uso en la invención incluyen la secuencia de nucleótidos CD28 expuesta en la SEC. ID. NO. 11:

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGG
TACCATCATTACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTCTTCCCC
GGGCCATCAAAGCCC

[0064] La secuencia de aminoácidos correspondiente se expone en la SEC. ID. NO. 12:

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEPGPSKP

[0065] Se apreciará que la invención se refiere a moléculas de unión a antígenos, CAR, TCR y similares que comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico aislada de SEC. ID. NO. 1 o SEC. ID. NO. 3. Se apreciará además que la invención se refiere a moléculas de unión a antígenos, CAR, TCR y similares en donde la porción extracelular consiste en al menos una secuencia de ácido nucleico aislada de SEC. ID. NO. 1 o SEC. ID. NO. 3. Además, se apreciará que la invención se refiere a moléculas de unión a antígenos, CAR, TCR y similares en donde la porción extracelular consiste esencialmente de al menos una secuencia de ácido nucleico aislada de SEC. ID. NO. 1 o SEC. ID. NO. 3.

[0066] Se apreciará que la invención se refiere a moléculas de unión a antígenos, CAR, TCR y similares que comprenden al menos una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO. 2 o SEC. ID. NO. 4. Se apreciará además que la invención se refiere a moléculas de unión a antígenos, CAR, TCR y similares en donde la porción extracelular consiste en al menos una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO. 2 o SEC. ID. NO. 4. También se apreciará que la invención se refiere a moléculas de unión a antígenos, CAR, TCR y similares en donde la porción extracelular consiste esencialmente en al menos una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NO. 2 o SEC. ID. NO. 4.

[0067] Otra fuente adecuada de dominios extracelulares y/o transmembrana puede derivarse de (o corresponder a) algunos o todos de CD8. La secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular y transmembrana de CD8 adecuado se expone en la SEC. ID. NO. 13:

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTG
 TTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCA
 GCTCCTACCATCGCTTCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCTTGCCGA
 CCGGCCGCAGGGGGCGCTGTTTCATACCAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGA
 TATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTC
 CCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGAAC

[0068] La secuencia de aminoácidos correspondiente se expone en la SEC.
 ID. NO. 14:

AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG
 GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN

[0069] Se apreciará que dominios costimuladores adecuados dentro del alcance de la invención pueden derivarse de (o corresponder a) por ejemplo, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (alfa, beta, delta, épsilon, gamma, zeta), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD 33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (Miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 14; TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor gamma Fc, molécula MHC de clase I, TNF, TNFr, integrina, molécula de activación linfocítica de señalización, BTLA, receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFTR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alpha, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, ligando CD83, o fragmentos o combinaciones de los mismos. Se apreciará que moléculas costimuladoras adicionales, o sus fragmentos, no enumerados anteriormente están dentro del alcance de la invención.

Activación de dominios.

[0070] El CD3 es un elemento del receptor de células T en células T nativas, y se ha demostrado que es un elemento de activación intracelular importante en CAR. En una forma de realización preferida, el CD3 es CD3 zeta, cuya secuencia de nucleótidos se expone en SEC. ID. NO. 9:

AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCA
GAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACG
TTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGA
CGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGAT
GGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGA
AAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATAC
TTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG

[0071] El aminoácido correspondiente de CD3 zeta intracelular se expone en la SEC. ID. NO. 10:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR

Orientación de Dominio Relativa a la Célula

[0072] Estructuralmente, se apreciará que los dominios descritos en el presente documento corresponden a ubicaciones relativas a una célula inmune u otra. Estos dominios pueden así formar parte del dominio (i) "bisagra" o extracelular (EC), (ii) del dominio transmembrana (TM), y/o (iii) del dominio intracelular/citoplásmico (IC). El componente intracelular comprende frecuentemente, en parte, un dominio de activación tal como una porción de un miembro de la familia CD3, de modo preferente CD3 zeta. Este dominio es capaz de activar la célula T tras la unión de la molécula de unión al antígeno a su objetivo. Se apreciará que el dominio intracelular típicamente comprende además una o más moléculas coestimuladoras como se describe en el presente documento.

[0073] "Activación" o "Estimulación" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una respuesta primaria inducida por unión de una molécula de activación con su ligando afín, en donde la unión media un evento de transducción de señal.

[0074] Una "molécula activadora" o "molécula estimulante" se refiere a una molécula en una célula T, por ejemplo, el complejo TCR/CD3 que se une específicamente con un ligando estimulante relacionado presente en una célula presente en el antígeno. En el presente documento se describen moléculas activadoras adecuadas.

[0075] Una "molécula coestimuladora" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula que proporciona una señal que media una respuesta de células T, incluyendo, pero sin limitarse a, proliferación, activación, diferenciación y similares. Las moléculas coestimuladoras pueden proporcionar una señal además de la señal primaria proporcionada por una molécula activadora como se describe en el presente documento.

[0076] Las moléculas coestimuladoras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, todas o porciones de CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (alfa, beta, delta, épsilon, gamma, zeta), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral 14; TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor gamma Fc, molécula MHC de clase I, TNF, TNFr, integrina, molécula de activación linfocítica de señalización, BTLA, receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CD80, ICAM-1, GITR, BAFTR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, ligando CD83, o fragmentos o combinaciones de los mismos. Se apreciará que la región bisagra puede contener parte o la totalidad de un miembro de la familia de inmunoglobulinas tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM o su fragmento.

[0077] En algunas formas de realización, el dominio extracelular se posiciona entre la molécula de unión al antígeno y el dominio transmembrana.

[0078] Los constructos CAR ejemplares de acuerdo con la invención se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre del Constructo	scFv	Dominio de la Bisagra	Dominio de Activación
24C1 CD28T	24C1	CD28T	CD3 zeta
24C1 CD28	24C1	CD28	CD3 zeta
24C1 CD8	24C1	CD8	CD3 zeta
24C8 CD28T	24C8	CD28T	CD3 zeta
24C8 CD28	24C8	CD28	CD3 zeta
24C8 CD8	24C8	CD8	CD3 zeta
20C5.1 CD28T	20C5.1	CD28T	CD3 zeta
20C5.1 CD28	20C5.1	CD28	CD3 zeta
20C5.1 CD8	20C5.1	CD8	CD3 zeta
20C5.2 CD28T	20C5.2	CD28T	CD3 zeta
20C5.2 CD28	20C5.2	CD28	CD3 zeta
20C5.2 CD8	20C5.2	CD8	CD3 zeta

[0079] Como se ha indicado, las células T manipuladas de la invención comprenden una molécula de unión al antígeno (tal como un scFv), un dominio extracelular (que puede comprender un dominio “bisagra”), un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio intracelular puede comprender al menos en parte un dominio de activación, de modo preferente compuesto por un miembro de la familia CD3 tal como CD3 zeta, CD3 épsilon, CD3 gamma o porciones de los mismos.

[0080] Se apreciará además que la molécula de unión al antígeno (por ejemplo, uno o más scFvs) está manipulada de tal manera que se encuentra en la porción extracelular de la molécula/constructo, de tal manera que es capaz de reconocer y unirse a su objetivo u objetivos.

[0081] **Dominio Extracelular.** Los dominios extracelulares de uso particular en esta invención pueden derivarse de (es decir, comprender) todos o algunos de

CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador de células T inducible (ICOS), antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1, CDI-Ia/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor gamma Fc, molécula MHC de clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquinas, integrinas, Moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores de células NK de activación, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alpha, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, o cualquier combinación de los mismos. El dominio extracelular puede derivarse de una fuente natural o de una fuente sintética.

[0082] Los dominios extracelulares comprenden a menudo la porción de bisagra, a veces denominada como la región "espaciadora". Se puede emplear una diversidad de bisagras de acuerdo con la invención, incluyendo porciones o derivados de las moléculas descritas en el presente documento.

[0083] En ciertas formas de realización, la región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntico a las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular expuestas en el presente documento.

[0084] En ciertas formas de realización, la región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos

aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntico a las secuencias de aminoácidos de nucleótidos extracelulares expuestas en el presente documento.

Dominio transmembrana.

[0085] El CAR puede ser diseñado con un dominio transmembrana que está fusionado con el dominio extracelular del CAR. Puede estar similarmente fusionado al dominio intracelular del CAR. En algunos casos, el dominio transmembranal puede seleccionarse o modificarse mediante la sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de los mismos o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o de una fuente sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína enlazada a la membrana o transmembrana. Las regiones transmembranas de uso particular en esta invención pueden derivarse de (comprenden o corresponden a) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador de células T inducibles (ICOS), antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1, CDI-la/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor gamma Fc, molécula MHC de clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquina, integrinas, Moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores de células NK de activación, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGBI, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, o cualquier combinación de los mismos.

[0086] Opcionalmente, los enlazadores cortos pueden formar enlaces entre cualquiera o algunos de los dominios extracelulares, transmembrana e intracelulares del CAR.

[0087] En otras formas de realización, el dominio transmembrana en el CAR de la invención es un dominio transmembrana CD8. En una forma de realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la porción transmembrana de la secuencia de ácido nucleico de la SEC. ID. NO: 13. En otra forma de realización, el dominio transmembrana CD8 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos transmembrana contenida en la SEC. ID. NO: 14.

[0088] En ciertas formas de realización, el dominio transmembrana en el CAR de la invención es el dominio transmembrana CD28. En una forma de realización, el dominio transmembrana CD28 comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC. ID. NO: 5. En una forma de realización, el dominio transmembrana CD28 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 6. En otra forma de realización, el dominio transmembrana CD28 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 6.

[0089] **Dominio intracelular (citoplásmico).** El dominio intracelular (citoplásmico) de las células T manipuladas de la invención puede proporcionar la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmune. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede referirse a la actividad citolítica o actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citoquinas.

[0090] Se apreciará que las moléculas intracelulares adecuadas incluyen (es decir, comprenden), pero no se limitan a dominios de señalización derivados de (o correspondientes a) CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), coestimulador de células T inducibles (ICOS), antígeno asociado a la función linfocitaria-1 (LFA-1, CDI-Ia/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor gamma Fc, molécula MHC de clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína de inmunoglobulina, receptor de citoquina, integrinas, Moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), receptores de células NK de activación, BTLA, un receptor de ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI Ia, LFA-1, ITGAM, CDI

Ib, ITGAX, CDI Ic, ITGBI, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, un ligando que se une específicamente con CD83, o cualquier combinación de los mismos.

[0091] En una forma de realización preferida, el dominio intracelular/citoplasmático del CAR puede ser diseñado para comprender el dominio CD3 zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio o dominios intracelulares deseados útiles en el contexto del CAR de la invención. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR puede comprender una porción de cadena zeta CD3 y una porción de una molécula de señalización coestimuladora. Las secuencias de señalización intracelular dentro de la porción de señalización intracelular del CAR de la invención pueden estar enlazadas entre sí en un orden aleatorio o especificado.

[0092] En otra forma de realización preferida, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de activación de CD3 zeta y un dominio de señalización de CD28. En otra forma de realización, el dominio intracelular está diseñado para comprender el dominio de activación de CD3 zeta y un dominio de señalización de 4-1BB. En otra forma de realización, el dominio intracelular en el CAR está diseñado para comprender una porción de CD28 y CD3 zeta, en donde el CD28 intracelular comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC. ID. NO: 7 y la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC. ID. NO. 8. La secuencia de ácido nucleico CD3 zeta se expone en la SEC. ID. NO: 9, y la secuencia de aminoácidos se expone en la SEC. ID. NO. 8.

[0093] Se apreciará que una orientación preferida de los CAR de acuerdo con la invención comprende una molécula de unión al antígeno (tal como scFv) en tándem con un dominio extracelular y/o bisagra, un dominio coestimulador y un dominio de activación. Se apreciará además que se pueden utilizar múltiples dominios en tándem.

[0094] En algunas formas de realización, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que comprenden un promotor unido operativamente a un primer polinucleótido que codifica una molécula de unión al antígeno, al menos una molécula coestimuladora y un dominio de activación. En algunas formas de

realización, el constructo de ácido nucleico está contenido dentro de un vector viral. En algunas formas de realizaciones, el vector viral se selecciona del grupo que consiste en vectores retrovirales, vectores del virus de leucemia murina, vectores SFG, vectores adenovirales, vectores lentivirales, vectores de virus adeno–asociados (AAV), vectores de virus Herpes y vectores de virus vaccinia. En algunas formas de realización, el ácido nucleico está contenido dentro de un plásmido.

[0095] En algunas formas de realización, la célula inmune manipulada es una célula T, linfocito infiltrante de tumor (TIL), célula NK, célula que expresa TCR, célula dendrítica, o célula NK–T. En algunas formas de realización, la célula se obtiene o se prepara a partir de sangre periférica. En algunas formas de realización, la célula se obtiene o se prepara a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunas formas de realización, la célula se obtiene o se prepara a partir de la médula ósea. En algunas formas de realización, la célula se obtiene o se prepara a partir de sangre de cordón umbilical. En algunas formas de realización, la célula es una célula humana. En algunas formas de realización, la célula es transfectada o transducida por el vector de ácido nucleico utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en electroporación, sonoporación, biolística (por ejemplo, Gene Gun), transfección de lípidos, transfección de polímero, nanopartículas o poliplexes.

[0096] En algunas formas de realización, los receptores de antígeno quiméricos se expresan en las células inmunitarias manipuladas que comprenden los ácidos nucleicos de la presente solicitud. Estos receptores de antígeno quiméricos de la presente solicitud pueden comprender, en algunas formas de realización, (i) una molécula de unión a antígeno (tal como un scFv), (ii) una región transmembrana, y (iii) una molécula o región de activación de células T.

[0097] Debe entenderse además que siempre que se describan aquí aspectos con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan otros aspectos análogos descritos en términos de "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en".

[0098] Además, los términos "aproximadamente" o "que comprende esencialmente de" se refieren a un valor o composición que está dentro de un intervalo de error aceptable para el valor o composición particular determinado por un experto en la técnica, el cual dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor o la composición, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente de" puede significar

dentro de 1 o más de 1 desviación estándar por la práctica en la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente de" puede significar un intervalo de hasta 10% (es decir, $\pm 10\%$). Por ejemplo, aproximadamente 3 mg pueden incluir cualquier número entre 2,7 mg y 3,3 mg (para el 10%). Además, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces de un valor. Cuando se proporcionan valores o composiciones particulares en la solicitud y reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se supondrá que el significado de "aproximadamente" o "que comprende esencialmente de" está dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor o composición particular.

Moléculas de Unión al Antígeno

[0099] Las moléculas de unión al antígeno están dentro del alcance de la invención. Una "molécula de unión al antígeno" como se usa en el presente documento significa cualquier proteína que se une a un antígeno objetivo especificado. En la presente solicitud, el antígeno objetivo especificado es la proteína CLL-1 o su fragmento. Las moléculas de unión al antígeno incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y partes de unión de los mismos, tales como fragmentos inmunológicamente funcionales. Los peptidocuerpos (es decir, las moléculas de fusión Fc que comprenden dominios de unión a péptidos) son otro ejemplo de moléculas de unión a antígeno adecuadas.

[0100] En ciertas formas de realización, la invención se refiere a una molécula de unión al antígeno que comprende:

- (a) una región determinante de la complementariedad de la región variable de la cadena pesada (VH) (CDR) 1 que comprende la secuencia de aminoácidos $GX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (SEC. ID. NO: 134), en donde X_2 es G, F, o Y; X_3 es S o T; X_4 es I, F, o L; X_5 es S o T; X_6 no está presente o S; X_7 no está presente o G; X_8 no está presente o E o G; y X_9 es F, L, o Y;
- (b) una región determinante de la complementariedad de la región variable de la cadena pesada (VH) (CDR) 2 que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (SEC. ID. NO: 135), en donde X_1 es D, H, S, o Y; X_2 es H, P, o Y; X_3 es D, E, o S; X_4 es D o G; X_5 es G o S; y X_6 no está presente de D o E;
- (c) una región determinante de la complementariedad de la región variable de la cadena pesada (VH) (CDR) 3, que comprende la secuencia de

aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}DY$ (SEC. ID. NO: 136), en donde X_1 es E o L; X_2 es R, S, o V; X_3 es R o Y; X_4 es C, G, o S; X_5 no está presente o G o I; X_6 no está presente o G; X_7 no está presente o D; X_8 no está presente o C; X_9 no está presente o W o Y; X_{10} no está presente o P o S; X_{11} no está presente o G o Y; y X_{12} es F o R;

- (d) una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1ASQX_5X_6X_7X_8X_9LX_{11}$ (SEC. ID. NO: 137), en donde X_1 es Q o R; X_5 es D o S; X_6 es I o V; X_7 es N o S; X_8 es N o S; X_9 es F, L, o Y; y X_{11} es N o T;
- (e) una CDR2 de región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos $X_1ASX_4X_5X_6X_7$ (SEC. ID. NO: 138), en donde X_1 es D o G; X_4 es N, S, o T; X_5 es L o R; X_6 es A, E, o K; y X_7 es S o T; y/o
- (f) una CDR3 de región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_3X_4X_5X_6PX_8T$ (SEC. ID. NO: 139), en donde X_3 es S o Y; X_4 es D, G, o Y; X_5 es N, S, o T; X_6 es L, T, o Y; y X_8 es F o I.

[0101] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a CLL-1, en donde la cadena pesada de la molécula de unión a antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 17), CDR2 (SEC. ID. NO: 18), y la CDR3 (SEC. ID. NO: 19) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 22), CDR2 (SEC. ID. NO: 23) y CDR3 (SEC. ID. NO: 24).

[0102] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a CLL-1, en donde la cadena pesada de molécula de unión a antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 51), CDR2 (SEC. ID. NO: 52) y CDR3 (SEC. ID. NO: 53) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 56), CDR2 (SEC. ID. NO: 57) y CDR3 (SEC. ID. NO: 58).

[0103] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a CLL-1, en donde la cadena pesada de la molécula de unión a antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 73), CDR2 (SEC. ID. NO: 74) y CDR3 (SEC. ID. NO: 75) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 78), CDR2 (SEC. ID. NO: 79) y CDR3 (SEC. ID. NO: 80).

[0104] En otras formas de realización, la invención se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a CLL-1, en donde la cadena pesada de molécula de unión a antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 95), CDR2 (SEC. ID. NO: 96), y la CDR3 (SEC. ID. NO: 97) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEC. ID. NO: 100), CDR2 (SEC. ID. NO: 101) y CDR3 (SEC. ID. NO: 102).

[0105] En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica una molécula de unión a antígeno anti-CLL-1 que compite de modo cruzado con uno o más anticuerpos descritos en la presente memoria o una molécula de unión a antígeno de la misma codificada por el polinucleótido. En una forma de realización, la invención se dirige a polinucleótidos aislados que codifican una molécula de unión a antígeno anti-CLL-1 del mismo que se une al mismo epítipo que una o más de las moléculas de unión a antígeno descritas en el presente documento.

[0106] En algunas formas de realización, la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno en una célula tumoral. En algunas formas de realización, la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno en una célula implicada en una enfermedad hiperproliferativa o a un antígeno viral o bacteriano. En formas de realización adicionales, la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo de fragmento del mismo, incluyendo una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del mismo. En otras formas de realización, la molécula de unión al antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv).

[0107] La expresión "fragmento inmunológicamente funcional" (o "fragmento") de una molécula de unión al antígeno es una especie de molécula de unión al antígeno que comprende una porción (independientemente de cómo se obtiene o sintetiza esa parte) de un anticuerpo que carece de al menos algunos de los aminoácidos presentes en una cadena de longitud completa pero que todavía es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Dichos fragmentos son biológicamente activos porque se unen al antígeno objetivo y pueden competir con otras moléculas de unión al antígeno, incluyendo anticuerpos intactos, para la unión a un epítipo dado. En algunas formas de realización, los fragmentos son fragmentos neutralizantes. En algunas formas de realización, los fragmentos pueden bloquear o reducir la actividad de CLL-1. En un aspecto, dicho fragmento retendrá al menos una CDR presente en la cadena ligera o pesada de longitud completa, y en algunas

formas de realización comprenderá una sola cadena pesada y/o cadena ligera o porción de la misma. Estos fragmentos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante, o pueden producirse por escisión enzimática o química de moléculas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos intactos.

[0108] Los fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales incluyen, pero no se limitan a, fragmentos scFv, fragmentos Fab (Fab', F (ab')₂ y similares), una o más CDR, un diacuerpo (dominio variable de cadena pesada en el mismo polipéptido como un dominio variable de cadena ligera, conectado a través de un enlazador peptídico corto que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena), anticuerpos de dominio y anticuerpos de cadena única. Estos fragmentos se pueden derivar de cualquier fuente de mamífero, incluyendo pero no limitándose a humanos, ratones, ratas, camélidos o conejos. Como apreciará un experto en la técnica, una molécula de unión al antígeno puede incluir componentes no proteicos.

[0109] Las variantes de las moléculas de unión al antígeno están también dentro del alcance de la invención, por ejemplo, cadenas pesadas variables y/o ligeras variables que tienen al menos 70–80%, 80–85%, 85–90%, 90–95%, 95–97%, 97–99%, o por encima de 99% de identidad con las secuencias de aminoácidos de las secuencias descritas en el presente documento. En algunos casos, tales moléculas incluyen al menos una cadena pesada y una cadena ligera, mientras que en otros casos las formas variantes contienen dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas (o sub–partes de las mismas). Un experto en la técnica será capaz de determinar variantes adecuadas de las moléculas de unión al antígeno como se expone en el presente documento utilizando técnicas bien conocidas. En ciertas formas de realización, un experto en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad dirigiendo regiones que no se cree que son importantes para la actividad.

[0110] En ciertas formas de realización, la estructura polipeptídica de las moléculas de unión al antígeno se basa en anticuerpos, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en este documento "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos (a veces referidos en el presente documento como "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de los

mismos, respectivamente. En algunas formas de realización, la molécula de unión al antígeno comprende o consta de avímeros.

[0111] En algunas formas de realización, una molécula de unión a antígeno a CLL-1 se administra como parte de un CAR, TCR u otra célula inmune. En tales células inmunes, la molécula de unión al antígeno a CLL-1 puede estar bajo el control de la misma región promotora, o un promotor separado. En ciertas formas de realización, los genes que codifican agentes proteicos y/o una molécula de unión a antígeno para CLL-1 pueden estar en vectores separados.

[0112] La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión a antígeno para CLL-1 junto con un diluyente, portador, solubilizador, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En ciertas formas de realización, las composiciones farmacéuticas incluirán más de una molécula de unión a antígeno diferente a CLL-1. En ciertas formas de realización, las composiciones farmacéuticas incluirán más de una molécula de unión a antígeno para CLL-1 en donde las moléculas de unión a antígeno para CLL-1 se unen a más de un epítipo. En algunas formas de realización, las diversas moléculas de unión a antígeno no competirán entre sí para unirse a CLL-1.

[0113] En otras formas de realización, la composición farmacéutica puede seleccionarse para administración parenteral, para inhalación, o para administración a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la capacidad de un experto en la técnica. En ciertas formas de realización, se usan buffers para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8. En ciertas formas de realización, cuando se contempla la administración parenteral, una composición terapéutica puede estar en forma de una solución acuosa libre de pirógenos, parenteralmente aceptable que comprende una molécula de unión a antígeno deseada para CLL-1, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas formas de realización, un vehículo para inyección parenteral es agua destilada estéril en la cual una molécula de unión a antígeno para CLL-1, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se formula como una solución isotónica estéril, adecuadamente conservada. En ciertas formas de realización, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido

poliglicólico), perlas o liposomas que pueden proporcionar la liberación controlada o sostenida del producto que puede ser entonces suministrado a través de una inyección depósito. En ciertas formas de realización, se pueden utilizar dispositivos de administración de fármacos implantables para introducir la molécula deseada.

[0114] En algunas formas de realización, la molécula de unión al antígeno se utiliza como una herramienta de diagnóstico o de validación. La molécula de unión al antígeno puede utilizarse para analizar la cantidad de CLL-1 presente en una muestra y/o sujeto. En algunas formas de realización, la molécula de unión al antígeno de diagnóstico no es neutralizante. En algunas formas de realización, las moléculas de unión al antígeno descritas en el presente documento se utilizan o proporcionan en un kit de ensayo y/o método para la detección de CLL-1 en tejidos o células de mamífero con el fin de detectar/diagnosticar una enfermedad o trastorno asociado con cambios en los niveles de CLL-1. El kit puede comprender una molécula de unión a antígeno que se une a CLL-1, junto con medios para indicar la unión de la molécula de unión a antígeno con CLL-1, si está presente, y opcionalmente niveles de proteína de CLL-1.

[0115] Las moléculas de unión al antígeno se entenderán más en vista de las definiciones y descripciones que siguen.

[0116] Una región "Fc" comprende dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios CH1 y CH2 de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos por dos o más enlaces disulfuro y por interacciones hidrófobas de los dominios CH3.

[0117] Un "fragmento Fab" comprende una cadena ligera y el CH1 y regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un "fragmento Fab" comprende una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio CH1 y también la región entre los dominios CH1 y CH2, de manera que puede formarse un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')₂. Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de tal manera que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento F(ab')₂ está así compuesto de dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

[0118] La "región Fv" comprende las regiones variables tanto de las cadenas pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes.

[0119] "Fragmento variable de cadena sencilla" ("scFv", también denominado "anticuerpo de cadena sencilla") se refiere a moléculas Fv en las que las regiones variables de cadena pesada y ligera se han conectado por un enlazador flexible para formar una única cadena polipeptídica, que forma una región de unión al antígeno. Véase la Solicitud PCT WO88/01649 y las Patentes de los Estados Unidos N° 4.946.778 y 5.260.203, cuyas descripciones se incorporan como referencia en su totalidad.

[0120] Una "molécula de unión al antígeno bivalente" comprende dos sitios de unión al antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades de antígeno. Las moléculas de unión al antígeno bivalente pueden ser biespecíficas. Una "molécula de unión al antígeno multiespecífica" es una molécula que se dirige a más de un antígeno o epítipo. Una molécula de unión a antígeno "biespecífica", "doble-específica" o "bifuncional" es una molécula o anticuerpo de unión a antígeno híbrido, respectivamente, que tiene dos sitios de unión a antígeno diferentes. Los dos sitios de unión de una molécula de unión a antígeno biespecífica se unirán a dos epítopos diferentes, los cuales pueden residir en los mismos o diferentes objetivos de proteínas.

[0121] Se dice que una molécula de unión al antígeno "se une específicamente" a su antígeno objetivo cuando la constante de disociación (K_d) es $\sim 1 \times 10^{-7}$ M. La molécula de unión al antígeno se une específicamente al antígeno con "alta afinidad" cuando la K_d es $1-5 \times 10^{-9}$ M, y con "afinidad muy alta" cuando la K_d es $1-5 \times 10^{-10}$ M. En una forma de realización, la molécula de unión al antígeno tiene una K_d de 10^{-9} M. En una forma de realización, la velocidad de desconexión es $< 1 \times 10^{-5}$. En otras formas de realización, las moléculas de unión al antígeno se unirán a la CLL-1 humana con una K_d de entre aproximadamente 10^{-7} M y 10^{-13} M, y en incluso otra realización las moléculas de unión al antígeno se unirán con una K_d $1,0-5 \times 10^{-10}$.

[0122] En algunas formas de realización, el anticuerpo o moléculas de unión al antígeno de la presente invención se unen específicamente a CLL-1 (por ejemplo, hCLL-1). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-CLL-1 o molécula de unión a antígeno de la presente invención se une a CLL-1 humana con una K_D

menor de 1×10^{-6} M, menor de 1×10^{-7} M, menor de 1×10^{-8} M, o menor de 1×10^{-9} M. En una forma de realización particular, el anticuerpo anti-CLL-1 o moléculas de unión al antígeno se une a CLL-1 humana con una K_D de menos de 1×10^{-7} M. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-CLL-1 o las moléculas de unión al antígeno se unen a CLL-1 humana con una K_D de menos de 1×10^{-8} M. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CLL-1 o moléculas de unión a antígeno se unen a CLL-1 humana con una K_D de aproximadamente 1×10^{-7} M, aproximadamente 2×10^{-7} M, aproximadamente 3×10^{-7} M, aproximadamente 4×10^{-7} M, aproximadamente 5×10^{-7} M, aproximadamente 6×10^{-7} M, aproximadamente 7×10^{-7} M, aproximadamente 8×10^{-7} M, aproximadamente 9×10^{-7} M, aproximadamente 1×10^{-8} M, aproximadamente 2×10^{-8} M, aproximadamente 3×10^{-8} M, aproximadamente 4×10^{-8} M, aproximadamente 5×10^{-8} M, aproximadamente 6×10^{-8} M, aproximadamente 7×10^{-8} M, aproximadamente 8×10^{-8} M, aproximadamente 9×10^{-8} M, aproximadamente 1×10^{-9} M, aproximadamente 2×10^{-9} M, aproximadamente 3×10^{-9} M, aproximadamente 4×10^{-9} M, aproximadamente 5×10^{-9} M, aproximadamente 6×10^{-9} M, aproximadamente 7×10^{-9} M, aproximadamente 8×10^{-9} M, aproximadamente 9×10^{-9} M, aproximadamente 1×10^{-10} M, o aproximadamente 5×10^{-10} M. En ciertas formas de realización, la K_D se calcula como el cociente de k_{off}/k_{on} , y k_{on} y k_{off} se determinan utilizando un anticuerpo monovalente, tal como un fragmento Fab, como se mide, por ejemplo, con la tecnología de resonancia de plasmón de superficie BIAcore®. En otras formas de realización, la K_D se calcula como el cociente de k_{off}/k_{on} , y se determinan las k_{on} y k_{off} utilizando un anticuerpo bivalente, tal como un fragmento Fab, como se mide, por ejemplo, mediante la tecnología de resonancia de plasmón de superficie BIAcore®.

[0123] En otras formas de realización, el anticuerpo anti-CLL-1 o molécula de unión al antígeno se une a CLL-1-Fc humano con una K_D menor de 1×10^{-9} M, menor de 3×10^{-9} M, menor de 5×10^{-9} M, menor de 1×10^{-10} M, menor de 3×10^{-10} M, o menor de 5×10^{-10} M. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-CLL-1 o las moléculas de unión al antígeno se unen a CLL-1-Fc cyno con una K_D inferior a 1×10^{-5} M, inferior a 1×10^{-6} M, inferior a 1×10^{-7} M, inferior a 1×10^{-8} M, inferior a 1×10^{-9} M, o inferior a 1×10^{-10} .

[0124] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CLL-1 o molécula de unión a antígeno se une a CLL-1 humana con una tasa de asociación (k_{on}) de menos de $1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $2 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $4 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,

menos de $7 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $3 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $4 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $6 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $7 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $8 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $9 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $2 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $3 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $4 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $6 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $7 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $8 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de $9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o menos de $1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En ciertas formas de realización, la k_{on} se determina utilizando un anticuerpo monovalente, tal como un fragmento Fab, como se mide, por ejemplo, con la tecnología de resonancia de plasmón de superficie BIAcore®. En otras formas de realización, la k_{on} se determina utilizando un anticuerpo bivalente como se mide, por ejemplo, con la tecnología de resonancia de plasmón de superficie BIAcore®.

[0125] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CLL-1 o molécula de unión a antígeno se une a CLL-1 humana con una tasa de disociación (k_{off}) de menos de $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de $2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de $3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de $4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de $6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de $7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de $8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de $9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, o menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. En ciertas formas de realización, la k_{off} se determina utilizando un anticuerpo monovalente, tal como un fragmento Fab, como se mide, por ejemplo, mediante la tecnología de resonancia de plasmón de superficie BIAcore®. En otras formas de realización, la k_{off} se determina utilizando un anticuerpo bivalente según se mide, por ejemplo, mediante la tecnología de resonancia de plasmón de superficie BIAcore®.

[0126] Se dice que una molécula de unión al antígeno es "selectiva" cuando se une a un objetivo más fuertemente de lo que se une a un segundo objetivo.

[0127] El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta de cualquier isotipo, o un fragmento de la misma que puede competir con el anticuerpo intacto para la unión específica al antígeno objetivo, e incluye, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos y biespecíficos. Un "anticuerpo" es una especie de una molécula de unión al antígeno como se define en

el presente documento. Un anticuerpo intacto comprenderá generalmente al menos dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, pero en algunos casos puede incluir menos cadenas tales como anticuerpos que se producen naturalmente en camélidos que pueden comprender solamente cadenas pesadas. Los anticuerpos pueden derivarse únicamente de una única fuente, o pueden ser quiméricos, es decir, diferentes porciones del anticuerpo pueden derivarse a partir de dos anticuerpos diferentes como se describe más adelante. Las moléculas de unión al antígeno, anticuerpos o fragmentos de unión pueden producirse en hibridomas, mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. A menos que se indique lo contrario, el término “anticuerpo” incluye, además de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, derivados, variantes, fragmentos y muteínas de los mismos, ejemplos de los cuales se describen a continuación. Además, a menos que se excluyan explícitamente, los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en el presente documento "anticuerpos miméticos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos (a veces denominados en el presente documento "conjugados de anticuerpo") y fragmentos de los mismos, respectivamente.

[0128] Las regiones variables típicamente exhiben la misma estructura general de regiones de marco relativamente conservadas (FR) unidas por las 3 regiones hipervariables (es decir, "CDR"). Las CDR de las dos cadenas de cada par están típicamente alineadas por las regiones de marco, que pueden permitir la unión a un epítipo específico. Desde N-terminal hasta C-terminal, tanto las regiones variables de cadena ligera como las de cadena pesada comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Por convención, las regiones CDR en la cadena pesada se denominan típicamente HC CDR1, CDR2 y CDR3. Las regiones CDR en la cadena ligera se denominan típicamente LC CDR1, CDR2 y CDR3. La asignación de aminoácidos a cada dominio está típicamente de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia o la definición de AbM.

[0129] El término "numeración de Kabat" y términos similares se reconocen en la técnica y se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (véase, por

ejemplo, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382–391 y Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91–3242). Utilizando el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena pesada de anticuerpo están típicamente presentes en las posiciones de aminoácidos 31 a 35, que opcionalmente pueden incluir uno o dos aminoácidos adicionales, después de 35 (referido en el esquema de numeración Kabat como 35A y 35B) (CDR1), posiciones de aminoácidos 50 a 65 (CDR2) y posiciones de aminoácidos 95 a 102 (CDR3). Utilizando el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena ligera de anticuerpo están típicamente presentes en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), posiciones de aminoácidos 50 a 56 (CDR2) y posiciones de aminoácidos 89 a 97 (CDR3). En una forma de realización específica, las CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento se han determinado de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat.

[0130] En ciertos aspectos, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, que se refiere a la localización de bucles estructurales de inmunoglobulina (*véase, por ejemplo*, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901–917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927–948; Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799–817; Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175–82; y Patente de los Estados Unidos No. 7.709.226). Típicamente, cuando se utiliza la convención de numeración de Kabat, el bucle de Chothia CDR–H1 está presente en los aminoácidos de cadena pesada 26 a 32, 33 o 34, el bucle de CDR–H2 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 52 a 56 y el bucle Chothia CDR–H3 está presente en los aminoácidos de cadena pesada 95 a 102, mientras que el bucle de Chothia CDR–L1 está presente en los aminoácidos de la cadena ligera 24 a 34, el bucle de Chothia CDR–L2 está presente en los aminoácidos de cadena ligera 50 a 56, y el bucle de Chothia CDR–L3 está presente en los aminoácidos de cadena ligera 89 a 97. El extremo del bucle de Chothia CDR–H1 cuando se numeran utilizando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B, si no está presente 35A o 35B, el bucle termina en 32, si sólo está presente 35A, el bucle termina en 33, si ambos 35A y 35B están presentes, el bucle termina en 34).

[0131] En una forma de realización específica, las CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento se han determinado de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia.

[0132] Están comúnmente en uso varias definiciones de las CDR: numeración Kabat, numeración Chothia, numeración AbM o numeración de contacto. La definición de AbM es un compromiso entre los dos utilizados por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. La definición de contacto se basa en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles.

Tabla 2: Numeración de CDR

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24—L34	L24—L34	L24—L34	L30—L36
L2	L50—L56	L50—L56	L50—L56	L46—L55
L3	L89—L97	L89—L97	L89—L97	L89—L96
H1	H31—H35B (Numeración Kabat)	H26—H35B	H26—H32..34	H30—H35B
H1	H31—H35 (Numeración Chothia)	H26—H35	H26—H32	H30—H35
H2	H50—H65	H50—H58	H52—H56	H47—H58
H3	H95—H102	H95—H102	H95—H102	H93—H101

[0133] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cadena pesada" cuando se utiliza en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, por ejemplo, alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), basado en la secuencia de aminoácidos del dominio constante, que dan lugar a clases de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo subclases de IgG, por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

[0134] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cadena ligera" cuando se utiliza en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, por ejemplo, kappa (κ) o lambda (λ) basado en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera son bien conocidas en la técnica. En formas de realización específicas, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

[0135] El término “región variable” o “dominio variable” se refiere a una porción de las cadenas ligeras y/o pesadas de un anticuerpo, incluyendo típicamente aproximadamente 120 a 130 aminoácidos amino–terminales en la cadena pesada y aproximadamente 100 a 110 aminoácidos amino–terminales en la cadena ligera. La región variable de un anticuerpo determina típicamente la especificidad de un anticuerpo particular para su objetivo.

[0136] La variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de los dominios variables de anticuerpos o moléculas de unión al antígeno; se concentra en sub–dominios de cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera. Estos subdominios se denominan "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) como se describe adicionalmente en el presente documento. Las porciones más conservadas (es decir, no hipervariables) de los dominios variables se denominan regiones "marco" (FRM o FR) y proporcionan un andamio para las seis CDR en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de origen natural comprenden cada uno cuatro regiones FRM (FR1, FR2, FR3 y FR4), que adoptan en gran medida una configuración de hoja β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y en algunos casos forman parte de la estructura de la hoja β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por la FRM y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno (véase Kabat et al., descrito más adelante en el presente documento).

[0137] Típicamente, las CDR forman una estructura de bucle que puede clasificarse como una estructura canónica. El término "estructura canónica" se refiere a la conformación de la cadena principal que es adoptada por los bucles de unión al antígeno (CDR). A partir de estudios estructurales comparativos, se ha encontrado que cinco de los seis bucles de unión al antígeno tienen sólo un limitado repertorio de conformaciones disponibles. Cada estructura canónica puede ser caracterizada por los ángulos de torsión de la cadena principal del polipéptido. Los bucles correspondientes entre los anticuerpos pueden, por lo tanto, tener estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la alta variabilidad de la secuencia de aminoácidos en la mayor parte de los bucles (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia *et al.*, Nature, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, J. Mol. Biol., 1996, 263: 800). Además, existe una relación entre la estructura de bucle adoptada y las secuencias de aminoácidos que la rodean. La conformación de una clase

canónica particular está determinada por la longitud del bucle y los residuos de aminoácidos que residen en las posiciones clave dentro del bucle, así como dentro del marco conservado (es decir, fuera del bucle). Por lo tanto, la asignación a una clase canónica particular puede hacerse basándose en la presencia de estos restos de aminoácidos clave.

[0138] El término "estructura canónica" también puede incluir consideraciones en cuanto a la secuencia lineal del anticuerpo, por ejemplo, tal como se cataloga por Kabat (Kabat *et al.*, en el presente documento). El esquema de numeración de Kabat (sistema) es un estándar ampliamente adoptado para numerar los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo de una manera consistente y es el esquema preferido aplicado en la presente invención como también se menciona en otra parte del presente documento. También se pueden utilizar consideraciones estructurales adicionales para determinar la estructura canónica de un anticuerpo. Por ejemplo, las diferencias no reflejadas completamente por la numeración de Kabat pueden ser descritas por el sistema de numeración de Chothia *et al.* y/o revelado por otras técnicas, por ejemplo, cristalografía y modelado computacional bidimensional o tridimensional. Por consiguiente, una secuencia de anticuerpo dada puede colocarse en una clase canónica que permita, entre otras cosas, identificar secuencias de chasis apropiadas (por ejemplo, basándose en el deseo de incluir una variedad de estructuras canónicas en una genoteca). La numeración de Kabat de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo y las consideraciones estructurales descritas por Chothia *et al.* (en el presente documento) y sus implicaciones para la interpretación de aspectos canónicos de la estructura del anticuerpo, se describen en la bibliografía. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Para una revisión de la estructura del anticuerpo, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow *et al.*, 1988.

[0139] La CDR3 de la cadena ligera y, particularmente, la CDR3 de la cadena pesada pueden constituir los determinantes más importantes en la unión del antígeno dentro de las regiones variables de la cadena ligera y pesada. En algunos constructos de anticuerpos, la CDR3 de cadena pesada parece constituir el área principal de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Los esquemas de selección *in vitro* en los que la CDR3 sola es variada se pueden utilizar para variar las propiedades de unión de un anticuerpo o determinar qué residuos contribuyen a la unión de un antígeno. Por lo tanto, CDR3 es típicamente la fuente más grande de

diversidad molecular dentro del sitio de unión a anticuerpos. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como dos residuos de aminoácidos o mayores de 26 aminoácidos.

[0140] Como se usa en el presente documento, los términos “región constante” y “dominio constante” son intercambiables y tienen un significado común en la técnica. La región constante es una porción de anticuerpo, por ejemplo, una porción carboxilo terminal de una cadena ligera y/o pesada que no está directamente implicada en la unión de un anticuerpo al antígeno, pero que puede exhibir diversas funciones efectoras, tales como la interacción con el receptor Fc. La región constante de una molécula de inmunoglobulina tiene generalmente una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a un dominio variable de inmunoglobulina.

[0141] "Afinidad de unión" se refiere generalmente a la intensidad de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1: 1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse y/o expresarse de varias maneras conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, constante de disociación de equilibrio (K_D) y constante de asociación de equilibrio (K_A). La K_D se calcula a partir del cociente de k_{off}/k_{on} , mientras que K_A se calcula a partir del cociente de k_{on}/k_{off} . K_{on} se refiere a la constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, un anticuerpo a un antígeno, y k_{off} se refiere a la disociación de, por ejemplo, un anticuerpo a un antígeno. Las k_{on} y k_{off} se pueden determinar por técnicas conocidas por un experto en la materia, tales como BIAcore® o KinExA.

[0142] El término "neutralizar" se refiere a una molécula de unión al antígeno, scFv, o anticuerpo, respectivamente, que se une a un ligando y previene o reduce el efecto biológico de ese ligando. Esto puede hacerse, por ejemplo, bloqueando directamente un sitio de unión en el ligando o uniéndose al ligando y alterando la capacidad del ligando de unirse a través de medios indirectos (tales como alteraciones estructurales o energéticas en el ligando). En algunas formas de realización, el término también puede designar una molécula de unión al antígeno que impide a la proteína a la que está unida a realizar una función biológica.

[0143] El término "objetivo" o "antígeno" se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de estar unida por una molécula de unión al antígeno. En ciertas formas de realización, un objetivo puede tener uno o más epítomos.

[0144] El término "competir" cuando se utiliza en el contexto de moléculas de unión a antígeno que compiten por el mismo epítipo significa competencia entre moléculas de unión a antígeno como se determina mediante un ensayo en el que la molécula de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional del mismo) que se está probando impide o inhibe (por ejemplo, reduce) la unión específica de una molécula de unión a antígeno de referencia a un antígeno. Numerosos tipos de ensayos de unión competitiva se pueden utilizar para determinar si molécula de unión a un antígeno compete con otra, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo de enzima directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competición sandwich (Stahli *et al.*, 1983, *Methods in Enzymology* 9:242–253); solid phase direct biotin–avidin EIA (Kirkland *et al.*, 1986, *J. Immunol.* 137:3614–3619), ensayo de marcación directa en fase sólida, ensayo en sándwich marcado directo en fase sólida (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA de etiqueta directa en fase sólida usando marcador 1–125 (Morel *et al.*, 1988, *Molec. Immunol.*, 25: 7 – 15); EIA de biotina – avidina directa en fase sólida (Cheung, *et al.*, 1990, *Virology* 176: 546 – 552); y RIA marcada directa (Moldenhauer *et al.*, 1990, *Scand. J. Immunol.*, 32: 77 – 82).

[0145] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “epítipo” se refiere a una región localizada de un antígeno al que un anticuerpo puede unirse específicamente. Un epítipo puede ser, por ejemplo, aminoácidos contiguos de un polipéptido (epítipo contiguo o lineal) o un epítipo puede, por ejemplo, unirse a partir de dos o más regiones no contiguas de un polipéptido o polipéptidos (epítipo conformacional, no lineal, discontinuo, o no contiguo). En ciertas formas de realización, el epítipo al que se une un anticuerpo se puede determinar mediante, por ejemplo, espectroscopía de RMN, estudios de cristalografía de difracción de rayos X, ensayos de ELISA, intercambio de hidrógeno/deuterio acoplado con espectrometría de masas (por ejemplo, cromatografía líquida espectrometría de masas por electropulverización), ensayos de exploración de oligo–péptidos basados en arreglo, y/o mapeo de mutagénesis (por ejemplo, mapeo de mutagénesis dirigida al sitio). Para la cristalografía de rayos X, la cristalización puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, *e.g.*,

Giegé R. *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339–350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1–23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269–1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300–6303). Los cristales de anticuerpo: antígeno se pueden estudiar utilizando técnicas de difracción de rayos X bien conocidas y se pueden refinar utilizando programas informáticos tales como X-PLOR (Yale University, 1992, distributed by Molecular Simulations, Inc.; véase, por ejemplo *Meth Enzymol* (1985) volúmenes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. 2004/0014194), y BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37–60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361–423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316–1323). Los estudios de mapeo de mutagénesis se pueden llevar a cabo utilizando cualquier método conocido por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Champe M *et al.*, (1995) *J Biol Chem* 270: 1388–1394 and Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081–1085 para una descripción de técnicas de mutagénesis, incluyendo técnicas de mutagénesis de exploración de alanina.

[0146] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "etiqueta" o "marcado" se refiere a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos de biotina que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). En ciertas formas de realización, la etiqueta o marcador también pueden ser terapéuticos. En la técnica se conocen varios métodos de etiquetado de polipéptidos y glicoproteínas y se pueden utilizar.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

[0147] Utilizando inmunoterapia adoptiva, las células T nativas pueden ser (i) retiradas de un paciente, (ii) manipuladas genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a al menos un antígeno tumoral (iii) expandidas *ex vivo* en una mayor población de células T manipuladas, y (iv) reintroducidas en el paciente. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 7.741.465 y 6.319.494, Eshhar *et al.* (Cancer Immunol, *supra*); Krause *et al.* (*supra*); Finney *et al.* (*supra*). Después de reintroducir las células T manipuladas en el paciente, median una respuesta inmune contra las células que expresan el antígeno tumoral. Véase, por ejemplo, Krause *et al.*, *J. Exp. Med.*, Volumen 188, N° 4, 1998 (619 – 626). Esta respuesta inmune incluye la secreción de IL–2 y otras

citoquinas por las células T, la expansión clonal de células T que reconocen el antígeno tumoral y la muerte específica mediada por células T de células objetivo positivas. Véase Hombach *et al.*, Journal of Immun. 167: 6123–6131 (2001).

[0148] El término "linfocito", tal como se utiliza en el presente documento, incluye células asesinas naturales (NK), células T o células B. Las células NK son un tipo de linfocito citotóxico (células tóxicas) que representan un componente principal del sistema inmune inherente. Las células NK rechazan tumores y células infectadas por virus. Funciona a través del proceso de apoptosis o muerte celular programada. Se les llamó "asesinas naturales" porque no requieren activación para matar células. Las células T desempeñan un papel importante en la inmunidad mediada por células (sin compromiso de anticuerpos). Sus receptores de células T (TCR) se diferencian de otros tipos de linfocitos. El timo, un órgano especializado del sistema inmunológico, es el principal responsable de la maduración de las células T. Existen seis tipos de células T, a saber: células T auxiliares (por ejemplo, células CD4+), células T citotóxicas (también conocidas como CT, linfocitos T citotóxicos, CTL, células T asesinas, células T citolíticas, células T CD8+ o células T asesinas), células T de memoria ((i) células madre T_{SCM}, como las células vírgenes, son CD45RO–, CCR7+, CD45RA+, CD62L+ (L–selectina), CD27+, CD28+ e IL–7Rα+, pero también expresan grandes cantidades de CD95, IL–2Rβ, CXCR3 y LFA–1, y muestran numerosos atributos funcionales distintivos de las células de memoria); (ii) células T_{CM} de memoria central expresan L–selectina y CCR7, segregan IL–2, pero no IFNγ o IL–4, y (iii) las células TEM de memoria efectora, sin embargo, no expresan L–selectina o CCR7 pero producen citoquinas efectoras como IFNγ e IL–4), células T reguladoras (Treg, células T supresoras o células T reguladoras CD4+ CD25+), células T asesinas naturales (NKT) y células T Delta Gamma. Las células B, por otro lado, desempeñan un papel principal en la inmunidad humoral (con la participación de anticuerpos). Produce anticuerpos y antígenos y desempeña el papel de las células presentadoras de antígeno (APC) y se convierte en células B de memoria tras la activación por interacción antigénica. En los mamíferos, las células B inmaduras se forman en la médula ósea, de donde se deriva su nombre.

[0149] El término "manipulado genéticamente" o "manipulado" se refiere a un método para modificar el genoma de una célula, incluyendo, pero sin limitarse a, suprimir una región codificante o no codificante o una porción de la misma o insertar una región codificante o una porción del mismo. En algunas formas de realización, la célula que se modifica es un linfocito, por ejemplo, una célula T, que puede obtenerse de un paciente o un donante. La célula puede modificarse para expresar

una construcción exógena, tal como, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR), que se incorpora en el genoma de la célula.

[0150] Una "respuesta inmune" se refiere a la acción de una célula del sistema inmune (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK), macrófagos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas y neutrófilos) y macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o el hígado (incluyendo Abs, citoquinas y complemento) que resulta en la selección selectiva de objetivo, unión, daño, destrucción y/o eliminación del cuerpo de un vertebrado de patógenos invasores, células o tejidos infectados con agentes patógenos, células cancerosas u otras células anormales o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

[0151] El término "inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto afectado o en riesgo de contraer o sufrir una recurrencia de una enfermedad por un método que comprende inducir, potenciar, suprimir o modificar de otro modo una respuesta inmune. Los ejemplos de inmunoterapia incluyen, pero no se limitan a, terapias con células T. La terapia con células T puede incluir terapia con células T adoptivas, inmunoterapia con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), terapia celular autóloga, terapia celular autóloga de ingeniería (eACT) y trasplante alogénico de células T. Sin embargo, un experto en la técnica reconocería que los métodos de acondicionamiento descritos en el presente documento mejorarían la eficacia de cualquier terapia de células T trasplantadas. Los ejemplos de terapias de células T se describen en las Publicaciones de Patente de EE.UU. N° 2014/0154228 y 2002/0006409, Patente de Estados Unidos N° 5.728.388 y Publicación Internacional N° WO 2008/081035.

[0152] Las células T de la inmunoterapia pueden provenir de cualquier fuente conocida en la técnica. Por ejemplo, las células T pueden diferenciarse *in vitro* de una población de células madre hematopoyéticas, o las células T pueden obtenerse de un sujeto. Las células T pueden obtenerse a partir, por ejemplo, de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre de cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido esplénico y tumores. Además, las células T pueden derivarse de una o más líneas de células T disponibles en la técnica. Las células T también pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como aféresis y/o separación FICOLL™. Los métodos adicionales de aislamiento de

células T para una terapia con células T se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos N° 2013/0287748, que se incorpora en el presente documento como referencias en su totalidad.

[0153] El término "terapia celular autóloga manipulada", que puede abreviarse como "eACT™", también conocida como transferencia de células adoptivas, es un proceso mediante el cual las propias células T de un paciente son recogidas y posteriormente alteradas genéticamente para reconocer y dirigir uno o más antígenos expresados en la superficie celular de una o más células tumorales específicas o malignidades. Las células T pueden ser manipuladas para expresar, por ejemplo, receptores de antígeno quiméricos (CAR) o receptor de células T (TCR). Las células T positivas (+) de CAR se manipulan para expresar un fragmento variable de cadena única extracelular (scFv) con especificidad para un antígeno de tumor particular ligado a una parte de señalización intracelular que comprende al menos un dominio coestimulador y al menos un dominio de activación. El dominio coestimulador puede derivarse de (o corresponder a), por ejemplo, CD28, y el dominio activante puede derivarse de (o corresponder a), por ejemplo, CD3–zeta. En ciertas formas de realización, el CAR está diseñado para tener dos, tres, cuatro, o más dominios coestimuladores.

[0154] El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que será posteriormente reintroducido. Por ejemplo, el método de terapia celular autóloga modificado (eACT™) descrito en el presente documento implica la recolección de linfocitos de un paciente, los cuales son manipulados para expresar, por ejemplo, un constructo de CAR, y luego se administran de nuevo al mismo paciente.

[0155] El término "alogénico" se refiere a cualquier material derivado de un individuo que se introduce a continuación a otro individuo de la misma especie, por ejemplo, trasplante de células T alogénicas.

[0156] En algunos aspectos, la invención por lo tanto comprende un método para tratar o prevenir una afección asociada con niveles de CLL–1 no deseados y/o elevados en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de al menos una molécula de unión al antígeno aislada, CAR, o TCR descritos en el presente documento.

[0157] Se proporcionan métodos para tratar enfermedades o trastornos, incluyendo cáncer. En algunas formas de realización, la invención se refiere a la creación de una respuesta inmune mediada por células T en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de las células inmunes manipuladas de la presente solicitud al sujeto. En algunas formas de realización, la respuesta inmune mediada por células T se dirige contra una célula o células objetivo. En algunas formas de realización, la célula inmune manipulada comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR), o un receptor de células T (TCR). En algunas formas de realización, la célula objetivo es una célula tumoral. En algunos aspectos, la invención comprende un método para tratar o prevenir una neoplasia maligna, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de al menos una molécula de unión a antígeno aislada descrita en el presente documento. En algunos aspectos, la invención comprende un método para tratar o prevenir una enfermedad maligna, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de al menos una célula inmune, en donde la célula inmune comprende al menos un receptor de antígeno quimérico, receptor de células T, y/o molécula de unión a antígeno aislada tal como se describe en el presente documento.

[0158] En algunos aspectos, la invención comprende una composición farmacéutica que comprende al menos una molécula de unión al antígeno como se describe en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además un agente activo adicional.

[0159] Las moléculas de unión al antígeno, CAR, TCR, células inmunitarias y similares de la invención se pueden utilizar para tratar enfermedades mieloides que incluyen pero no se limitan a leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (CMML), leucemia mielomonocítica juvenil, leucemia mieloide crónica atípica, leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroide aguda, leucemia megacarioblástica aguda, síndrome mielodisplásico (SMD), trastorno mieloproliferativo, neoplasia mieloide, sarcoma mieloide), Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), o combinaciones de las mismas. Otras enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes tales como artritis reumatoide, psoriasis, alergias, asma, enfermedad de Crohn, IBD, IBS, fibromialgia, mastocitosis y enfermedad celíaca.

[0160] Se apreciará que las dosis objetivo para las células de CAR⁺/ CAR-T⁺/ TCR⁺ pueden variar desde 1×10^6 – 2×10^{10} células/kg, de modo preferente 2×10^6 células/kg, de modo más preferente. Se apreciará que las dosis por encima y por debajo de este intervalo pueden ser apropiadas para ciertos sujetos, y los niveles de dosis apropiados pueden ser determinados por el proveedor de atención médica según sea necesario. Además, pueden proporcionarse dosis múltiples de células de acuerdo con la invención.

[0161] También se proporcionan métodos para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una célula manipulada de la presente invención al sujeto, en donde la célula comprende un receptor de antígeno quimérico, un receptor de células T o un receptor de antígeno quimérico basado en receptor de células T que comprende una molécula de unión a antígeno se une a un antígeno en el tumor. En algunas formas de realización, el sujeto tiene un tumor sólido, o una neoplasia maligna de la sangre tal como linfoma o leucemia. En algunas formas de realización, la célula manipuladas se administra a un lecho de tumor. En algunas formas de realización, el cáncer está presente en la médula ósea del sujeto. En algunas formas de realización, las células manipuladas son células T autólogas. En algunas formas de realización, las células manipuladas son células T alogénicas. En algunas formas de realización, las células manipuladas son células T heterólogas. En algunas formas de realización, las células manipuladas de la presente solicitud se transfectan o transducen *in vivo*. En otras formas de realización, las células manipuladas se transfectan o transducen *ex vivo*. Como se usa en el presente documento, el término "célula *in vitro*" se refiere a cualquier célula que se cultive *ex vivo*. En particular, una célula *in vitro* puede incluir una célula T.

[0162] Los métodos pueden comprender además la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos. En ciertas formas de realización, el agente quimioterapéutico es un quimioterapéutico productor de linfopenia (precondicionamiento). Los regímenes de tratamiento de preacondicionamiento beneficiosos, junto con biomarcadores beneficiosos correlativos, se describen en las Solicitudes de Patentes Provisionales de Estados Unidos 62/262.143 y 62/167.750 que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad aquí. Éstos describen, por ejemplo, métodos para acondicionar a un paciente que necesita una terapia de células T que comprende administrar al paciente dosis beneficiosas especificadas de ciclofosfamida (entre 200 mg/m²/día y 2000 mg/m²/día) y dosis especificadas de fludarabina (entre 20 mg/m²/día y 900 mg/m²/día). Un régimen de dosis preferido implica tratar a un paciente que comprende administrar diariamente

al paciente aproximadamente 500 mg/m²/día de ciclofosfamida y aproximadamente 60 mg/m²/día de fludarabina durante tres días antes de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de células T manipuladas al paciente.

[0163] En otras formas de realización, la molécula de unión a antígeno, células transducidas (o manipuladas de otra manera) (tales como CAR o TCR) y el agente quimioterapéutico se administran cada una en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección en el sujeto.

[0164] En ciertas formas de realización, las composiciones que comprenden células efectoras inmunitarias que expresan CAR que se describen en la presente invención pueden administrarse conjuntamente con cualquier número de agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXANTM); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloramina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinás, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluoruracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitioetano, testolactona; anti-suprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecimiento de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina;

diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK®; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2, 2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. paclitaxel (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados de ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™, (alitretinoína); ONTAK™ (denileukin diftitox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes anti hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Las combinaciones de agentes quimioterapéuticos también se administran cuando es apropiado, incluyendo, pero sin limitarse a CHOP, es decir, ciclofosfamida (Cytosan®), Doxorubicina (hidroxdoxorubicina), Vincristina (Oncovin®) y Prednisona.

[0165] En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico se administra al mismo tiempo o dentro de una semana después de la administración de la célula, polipéptido o ácido nucleico manipulados. En otras formas de realización, el agente quimioterapéutico se administra de 1 a 4 semanas o de 1 semana a 1 mes, 1 semana a 2 meses, 1 semana a 3 meses, 1 semana a 6 meses, 1 semana a 9 meses, o 1 semana a 12 meses después de la administración de la célula, polipéptido o ácido nucleico manipulados. En otras formas de realización, el agente quimioterapéutico se administra al menos 1 mes antes de administrar la célula, polipéptido o ácido nucleico. En algunas formas de realización, los métodos comprenden además administrar dos o más agentes quimioterapéuticos.

[0166] Se puede utilizar una variedad de agentes terapéuticos adicionales en conjunción con las composiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, agentes terapéuticos adicionales potencialmente útiles incluyen inhibidores de PD-1 tales como nivolumab (Opdivo®), pembrolizumab (Keytruda®), pembrolizumab, pidilizumab y atezolizumab.

[0167] Otros agentes terapéuticos adecuados para uso en combinación con la invención incluyen, pero sin limitación, ibrutinib (Imbruvica®), ofatumumab (Arzerra®), rituximab (Rituxan®), bevacizumab (Avastin®), trastuzumab (Herceptin®), trastuzumab emtansina (KADCYLA®), imatinib (Gleevec®), cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix®), catumaxomab, ibritumomab, ofatumumab, tositumomab, brentuximab, alemtuzumab, gemtuzumab, erlotinib, gefitinib, vandetanib, afatinib, lapatinib, Nuralinib, axitinib, masitinib, pazopanib, sunitinib, sorafenib, toceranib, lestaurtinib, axitinib, cediranib, lenvatinib, nintedanib, pazopanib, regorafenib, semaxanib, sorafenib, sunitinib, tivozanib, toceranib, vandetanib, entrectinib, cabozantinib, imatinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib, radotinib, bosutinib, lestaurtinib, ruxolitinib, pacritinib, cobimetinib, selumetinib, trametinib, binimetinib, alectinib, ceritinib, crizotinib, aflibercept, adipotido, denileucina diftitox, inhibidores mTOR tales como Everolimus y Temsirolimus, inhibidores de hedgehog tales como sonidegib y vismodegib, inhibidores de CDK tales como inhibidor de CDK (palbociclib).

[0168] En formas de realización adicionales, la composición que comprende un sistema inmune que contiene CAR se puede administrar con un agente antiinflamatorio. Los agentes antiinflamatorios o fármacos incluyen, pero no se limitan a, esteroides y glucocorticoides (incluyendo betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluyendo aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicamentos anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato. Los ejemplos de AINE incluyen ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2 y sialilatos. Los ejemplos de analgésicos incluyen acetaminofeno, oxicodona, tramadol de hidrocloruro de propoxifeno. Los ejemplos de glucocorticoides incluyen cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona o prednisona. Los ejemplos de modificadores de respuesta biológica incluyen moléculas dirigidas contra marcadores de superficie celular (por ejemplo, CD4, CD5, etc.), inhibidores de citoquinas, tales como antagonistas de TNF (por ejemplo, etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®))

e infliximab (REMICADE®), inhibidores de quimioquinas e inhibidores de moléculas de adhesión. Los modificadores de respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales así como formas recombinantes de moléculas. Los DMARD ejemplares incluyen azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, oro (auranofina) e Intramuscular) y minociclina.

[0169] En ciertas formas de realización, las composiciones descritas en el presente documento se administran conjuntamente con una citoquina. La "citoquina", como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de citoquinas son linfoquinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen las hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humano, la hormona de crecimiento humano N-metionilo y la hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático (HGF); factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); prolactina; lactógeno placentario; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso (NGF) tales como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento tipo insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón-alfa, beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófago (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y CSL de granulocito (G-CSF); IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante, y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

[0170] En algunos aspectos, la invención comprende una molécula de unión al antígeno que se une a CLL-1 con una K_d que es menor que 100 pM. En algunas formas de realización, la molécula de unión al antígeno se une con una K_d que es

menor que 10 pM. En otras formas de realización, la molécula de unión al antígeno se une con una K_d que es menor que 5 pM.

Métodos de Elaboración

[0171] Se puede utilizar una variedad de técnicas conocidas para fabricar los polinucleótidos, polipéptidos, vectores, moléculas de unión al antígeno, células inmunitarias, composiciones y similares de acuerdo con la invención.

[0172] Antes de la manipulación *in vitro* o modificación genética de las células inmunes descritas en el presente documento, las células pueden obtenerse de un sujeto. En algunas formas de realización, las células inmunitarias comprenden células T. Las células T pueden obtenerse de varias fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica (PBMC), médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido de bazo y tumores. En ciertas formas de realización, las células T pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recogida del sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la materia, tales como separación FICOLL™. De modo preferente, las células pueden obtenerse a partir de la sangre circulante de un individuo mediante aféresis. El producto de aféresis contiene típicamente linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En ciertas formas de realización, las células recogidas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción de plasma y se colocan en un buffer o medio apropiado para su posterior procesamiento. Las células pueden lavarse con PBS. Como se apreciará, se puede usar una etapa de lavado, tal como utilizando una centrífuga de flujo semiautomático – por ejemplo, el procesador de células Cobe™ 2991, el Baxter CytoMate™, o similares. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una diversidad de buffers biocompatibles, u otra solución salina con o sin buffer. En ciertas formas de realización, los componentes no deseados de la muestra de aféresis se pueden eliminar.

[0173] En ciertas formas de realización, se aíslan células T de PBMC por lisis de los glóbulos rojos y agotamiento de los monocitos, por ejemplo, utilizando centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™. Una subpoblación específica de células T, como las células T CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ y CD45RO⁺ puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positivas o negativas conocidas en la técnica. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa puede lograrse con una combinación de

anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método para uso en el presente documento es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpo monoclonal incluye típicamente anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. La citometría de flujo y la clasificación celular se pueden utilizar también para aislar poblaciones de células de interés para su uso en la presente invención.

[0174] Las PBMC se pueden utilizar directamente para la modificación genética con las células inmunitarias (tales como CAR o TCR) utilizando métodos como se describen en el presente documento. En ciertas formas de realización, después de aislar PBMC, los linfocitos T pueden aislarse adicionalmente y tanto los linfocitos T citotóxicos como los linfocitos T auxiliares pueden clasificarse en subpoblaciones de células T naïve, de memoria y efectoras antes o después de la modificación genética y/o expansión.

[0175] En algunas formas de realización, las células CD8⁺ se clasifican adicionalmente en células naïve, de memoria central y efectoras mediante la identificación de antígenos de superficie celular que están asociados con cada uno de estos tipos de células CD8⁺. En algunas formas de realización, la expresión de marcadores fenotípicos de células T de memoria central incluye CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y CD127 y son negativas para la granzima B. En algunas formas de realización, las células T de memoria central son células T CD45RO⁺, CD62L⁺, CD8⁺. En algunas formas de realización, las células T efectoras son negativas para CD62L, CCR7, CD28 y CD127, y positivas para granzima B y perforina. En ciertas formas de realización, las células T CD4⁺ se clasifican además en subpoblaciones. Por ejemplo, las células T auxiliares CD4⁺ se pueden clasificar en células naïve, de memoria central, y efectoras identificando poblaciones de células que tienen antígenos de superficie celular.

[0176] Las células inmunes, tales como células T, pueden modificarse genéticamente después del aislamiento utilizando métodos conocidos, o las células inmunitarias pueden activarse y expandirse (o diferenciarse en el caso de progenitores) *in vitro* antes de ser modificadas genéticamente. En otra forma de realización, las células inmunitarias, tales como las células T, se modifican

genéticamente con los receptores de antígeno quiméricos descritos en el presente documento (por ejemplo, se transducen con un vector viral que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican un CAR) y luego se activan y/o expanden *in vitro*. Los métodos para activar y expandir las células T son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 6.905.874; Patente de los Estados Unidos N° 6.867.041; Patente de los Estados Unidos N° 6.797.514; y PCT WO2012/079000, cuyo contenido se incorpora en la presente en su totalidad como referencia. Generalmente, tales métodos incluyen poner en contacto PBMC o células T aisladas con una molécula estimuladora y una molécula coestimuladora, tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una perla u otra superficie, en un medio de cultivo con citoquinas apropiadas, tales como IL-2. Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma perla sirven como una célula presentadora de antígeno "sustituto" (APC). Un ejemplo es el sistema Dynabeads®, un sistema activador/estimulador CD3/CD28 para la activación fisiológica de células T humanas. En otras formas de realización, las células T pueden activarse y estimularse para proliferar con células alimentadoras y anticuerpos y citoquinas apropiados utilizando métodos tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos N° 6.040.177; Patente de los Estados Unidos N° 5.827.642; y WO2012129514, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

[0177] Ciertos métodos para fabricar los constructos y las células inmunitarias manipuladas de acuerdo con la invención se describen en la solicitud PCT PCT/US15/14520, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Métodos adicionales de fabricación de los constructos y células se pueden encontrar en la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N° 62/244036 cuyo contenido se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

[0178] Se apreciará que las PBMC pueden incluir además otros linfocitos citotóxicos tales como células NK o células NKT. Un vector de expresión que lleva la secuencia codificante de un receptor quimérico como se describe en el presente documento puede introducirse en una población de células T donantes humanas, células NK o células NKT. Las células T transducidas con éxito que llevan el vector de expresión pueden clasificarse utilizando citometría de flujo para aislar células T positivas para CD3 y luego propagarse adicionalmente para aumentar el número de estas células T que expresan CAR además de la activación celular utilizando anticuerpos anti-CD3 e IL-2 u otros métodos conocidos en la técnica como se

describe en otra parte del presente documento. Se utilizan procedimientos estándar para la crioconservación de células T que expresan el CAR para su almacenamiento y/o preparación para su uso en un sujeto humano. En una forma de realización, la transducción, cultivo y/o expansión *in vitro* de células T se llevan a cabo en ausencia de productos derivados de animales no humanos tales como suero fetal de ternero y suero fetal bovino.

[0179] Para la clonación de polinucleótidos, el vector puede introducirse en una célula huésped (una célula huésped aislada) para permitir la replicación del propio vector y, de este modo, amplificar las copias del polinucleótido contenido en el mismo. Los vectores de clonación pueden contener componentes de secuencia incluyen generalmente, sin limitación, un origen de replicación, secuencias promotoras, secuencias de iniciación de transcripción, secuencias potenciadoras y marcadores seleccionables. Estos elementos se pueden seleccionar según sea apropiado por una persona con conocimientos ordinarios en la técnica. Por ejemplo, el origen de replicación puede seleccionarse para promover la replicación autónoma del vector en la célula huésped.

[0180] En ciertas formas de realización, la presente descripción proporciona células huésped aisladas que contienen el vector proporcionado en el presente documento. Las células huésped que contienen el vector pueden ser útiles en la expresión o clonación del polinucleótido contenido en el vector. Las células huésped adecuadas pueden incluir, sin limitación, células procarióticas, células fúngicas, células de levadura, o células eucariotas superiores tales como células de mamífero. Las células procariotas adecuadas para este propósito incluyen, sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram–negativos o Gram–positivos, por ejemplo Enterobacteriaceae tales como Escherichia, por ejemplo E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Salmonella typhimurium, Serratia, por ejemplo, Serratia marcescans y Shigella, así como Bacilos tales como B. subtilis y B. licheniformis, Pseudomonas tales como P. aeruginosa y Streptomyces.

[0181] El vector puede introducirse en la célula huésped utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, el suministro mediado por DEAE–dextrano, el método de precipitado de fosfato cálcico, la administración mediada por lípidos catiónicos, la transfección mediada por liposomas, la electroporación, el bombardeo con microproyectiles, la administración de genes mediada por receptores, la administración mediada por polilisina, histona, quitosano y péptidos. Los métodos estándar para la transfección y transformación de

células para la expresión de un vector de interés son bien conocidos en la técnica. En una forma de realización adicional, se puede utilizar una mezcla de diferentes vectores de expresión para modificar genéticamente una población donante de células efectoras inmunitarias en las que cada vector codifica un CAR diferente según se describe en el presente documento. Las células efectoras inmunitarias transducidas resultantes forman una población mixta de células manipuladas, con una proporción de las células manipuladas que expresan más de un CAR diferente.

[0182] En una forma de realización, la invención proporciona un método para almacenar células genéticamente manipuladas que expresan CAR o TCR que se dirigen a una proteína CLL-1. Esto implica la crioconservación de las células inmunitarias de tal manera que las células permanezcan viables tras la descongelación. Una fracción de las células inmunitarias que expresan los CAR puede ser crioconservada por métodos conocidos en la técnica para proporcionar una fuente permanente de tales células para el tratamiento futuro de pacientes afligidos con una malignidad. Cuando es necesario, las células inmunológicas transformadas crioconservadas pueden descongelarse, crecer y expandirse para obtener más células de este tipo.

[0183] Tal como se utiliza en el presente documento, "criopreservar" se refiere a la conservación de células por enfriamiento a temperaturas bajo cero, tales como (típicamente) 77 Kelvin o -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido). A menudo se utilizan agentes crioprotectores a temperaturas inferiores a cero para evitar que las células se preserven de los daños debidos a la congelación a bajas temperaturas o al calentamiento a temperatura ambiente. Los agentes criopreservadores y las velocidades óptimas de enfriamiento pueden proteger contra lesiones celulares. Los agentes crioprotectores que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido (DMSO) (Lovelock & Bishop, *Nature* (1959); 183: 1394–1395; Ashwood-Smith, *Nature* (1961); 190: 1204–1205), glicerol, polivinilpirrolidina (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1960); 85: 576), y polietilenglicol (Sloviter & Ravdin, *Nature* (1962); 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es de $1^{\circ}\text{--}3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

[0184] El término "sustancialmente puro" se utiliza para indicar que un componente dado está presente a un nivel alto. El componente es deseablemente el componente predominante presente en una composición. Preferentemente, está presente en un nivel de más de 30%, de más del 50%, de más del 75%, de más del 90%, o incluso de más del 95%, estando dicho nivel determinado sobre una base de

peso seco/peso seco con respecto a la composición total considerada. A niveles muy elevados (por ejemplo, a niveles de más del 90%, de más del 95% o más del 99%), el componente puede considerarse en “forma pura”. Las sustancias biológicamente activas de la presente invención (CAR, TCR, polipéptidos aislados, moléculas de ácido nucleico aisladas, moléculas de unión a antígenos, restos) se pueden proporcionar en una forma que está sustancialmente libre de uno o más contaminantes con los que la sustancia podría estar asociada de otro modo. Cuando una composición está sustancialmente libre de un contaminante dado, el contaminante estará a un nivel bajo (por ejemplo, a un nivel de menos de 10%, menos de 5%, o menos de 1% sobre la base de peso seco/peso seco que se estableció anteriormente).

[0185] En algunas formas de realización, las células se formulan cosechándolas primero de su medio de cultivo y luego lavando y concentrando las células en un sistema de medio y contenedor adecuado para la administración (un portador “farmacéuticamente aceptable”) en una cantidad efectiva para el tratamiento. Los medios de infusión adecuados pueden ser cualquier formulación de medio isotónico, típicamente solución salina normal, Normosol™ R (Abbott) o Plasma–Lyte™ A (Baxter), pero también 5% de dextrosa en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión puede complementarse con albúmina de suero humana.

[0186] Las cantidades de tratamiento deseadas de las células en la composición son generalmente al menos 2 células (por ejemplo, al menos 1 célula T de memoria central CD8⁺ y al menos 1 subconjunto de células T auxiliares CD4⁺) o es más típicamente mayor que 10² células y hasta 10⁶, hasta e incluyendo 10⁸ o 10⁹ células y puede ser más de 10¹⁰ células. El número de células dependerá del uso deseado para el que se pretende la composición y del tipo de células incluidas en el mismo. La densidad de las células deseadas es típicamente superior a 10⁶ células/ml y generalmente es superior a 10⁷ células/ml, generalmente 10⁸ células/ml o mayor. El número clínicamente relevante de células inmunitarias puede distribuirse en infusiones múltiples que acumulan igual o exceden las células 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹, o 10¹². En algunos aspectos de la presente invención, en particular porque todas las células infundidas serán redirigidas a un antígeno objetivo particular (CLL–1), pueden administrarse números más bajos de células, en el intervalo de 10⁶/kilogramo (10⁶ – 10¹¹ por paciente). Los tratamientos CAR pueden administrarse varias veces a dosis dentro de estos intervalos. Las células pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas para el paciente sometido a terapia.

[0187] Las poblaciones de células que expresan CAR de la presente invención pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones celulares. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población celular que expresa CAR o TCR, tal como células T, como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender buffers tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan de modo preferente para administración intravenosa.

[0188] Las composiciones farmacéuticas (soluciones, suspensiones o similares) pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, de modo preferente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites fijos tales como mono- o diglicéridos sintéticos que pueden servir como el solvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; buffers tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es de modo preferente estéril.

[0189] Se apreciará que los eventos adversos pueden minimizarse mediante la transducción de las células inmunes (que contienen uno o más CAR o TCR) con un gen suicida. También puede ser deseable incorporar un interruptor "activable" o "acelerador" inducible en las células inmunitarias. Las técnicas adecuadas incluyen el uso de caspasa-9 inducible (Solicitud de Patente estadounidense 2011/0286980) o una timidina quinasa, antes, después o al mismo tiempo, cuando las células se transducen con el constructo de CAR de la presente invención. Los métodos adicionales para introducir genes suicidas y/o conmutadores "activables" incluyen

TALENS, dedos de zinc, ARNi, ARNsi, ARNsh, tecnología antisentido y otras técnicas conocidas en la técnica.

[0190] De acuerdo con la invención, se pueden incorporar en el presente documento técnicas adicionales de encendido/apagado u otros tipos de técnicas de conmutación de control. Estas técnicas pueden emplear el uso de dominios de dimerización y activadores opcionales de tal dimerización en el dominio. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, las descritas por Wu *et al.*, Science 2014 350 (6258) utilizando sistemas de dimerización FKBP/Rapalog en ciertas células, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. La tecnología de dimerización adicional se describe en, por ejemplo, Fegan et al. Chem. Rev. 2010, 110, 3315–3336 así como en las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.830.462; 5.834.266; 5.869.337; y 6.165.787, cuyos contenidos también se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Otros pares de dimerización pueden incluir ciclosporina-A/ciclofilina, receptor, receptor de estrógeno/estrógeno (opcionalmente utilizando tamoxifeno), receptor de glucocorticoides/glucocorticoides, receptor de tetraciclina/tetraciclina, receptor de vitamina D/vitamina D. Otros ejemplos de tecnología de dimerización pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 2014/127261, WO 2015/090229, US 2014/0286987, US 2015/0266973, US 2016/0046700, US Patente No. 8.486.693, US 2014/0171649 y US 2012/0130076, cuyo contenido se incorpora adicionalmente como referencia en el presente documento en su totalidad.

[0191] Se entenderá que las descripciones en el presente documento son sólo ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la invención como se reivindica. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario.

[0192] Los encabezamientos de sección utilizados en el presente documento son únicamente para propósitos de organización y no deben ser interpretados como limitativos del objeto descrito. Todos los documentos o partes de documentos citados en esta solicitud, incluyendo pero sin limitarse a patentes, solicitudes de patente, artículos, libros y tratados, se incorporan expresamente como referencia en su totalidad para cualquier propósito. Como se utiliza de acuerdo con la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

[0193] En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente lo contrario.

[0194] El término "actividad CLL-1" incluye cualquier efecto biológico de CLL-1. En ciertas formas de realización, la actividad de CLL-1 incluye la capacidad de CLL-1 para interactuar o unirse a un sustrato o receptor.

[0195] El término "polinucleótido", "nucleótido" o "ácido nucleico" incluye tanto los polímeros de nucleótidos de cadena sencilla como de doble cadena. Esto incluye de modo preferente polinucleótidos aislados, nucleótidos o ácidos nucleicos como se definen en el presente documento. Los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquiera de los dos tipos de nucleótidos. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como bromouridina y derivados de inosina, modificaciones de ribosa tales como 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de enlaces internucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforo-diselenoato, fosforo-aniltioato, fosforaniladato y fosforoamidato.

[0196] El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido que comprende 200 o menos nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, por ejemplo, para uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido. Un oligonucleótido puede incluir un marcador, que incluye un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, un hapteno o un marcador antigénico, para ensayos de detección. Los oligonucleótidos se pueden utilizar, por ejemplo, como cebadores de PCR, cebadores de clonación o sondas de hibridación.

[0197] El término "secuencia de control" se refiere a una secuencia polinucleotídica que puede afectar a la expresión y procesamiento de las secuencias codificantes a las que está ligada. La naturaleza de tales secuencias de control puede depender del organismo huésped. En formas de realización particulares, las secuencias de control para procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión ribosómica y una secuencia de terminación de la transcripción. Por ejemplo, las secuencias de control para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden

uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencia de terminación de la transcripción. Las "secuencias de control" pueden incluir secuencias líder (péptidos señal) y/o secuencias de compañero de fusión.

[0198] En algunas formas de realización, el polinucleótido de la presente invención codifica un CAR o un TCR puede comprender además una secuencia o péptido líder (también denominado en el presente documento como un "péptido señal"). En ciertas formas de realización, el péptido líder comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100% idéntico a la secuencia de aminoácidos MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEC. ID. NO: 144). En algunas formas de realización, el péptido líder comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. NO: 144.

[0199] Tal como se utiliza en el presente documento, "unido operativamente" significa que los componentes a los que se aplica el término están en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes bajo condiciones adecuadas.

[0200] El término "vector" significa cualquier molécula o entidad (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) utilizada para transferir información de codificación de proteínas a una célula huésped. El término "vector de expresión" o "constructo de expresión" se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan (junto con la célula huésped) la expresión de una o más regiones de codificación heterólogas unidas operativamente a la misma. Un constructo de expresión puede incluir, pero no se limita a, secuencias que afectan o controlan la transcripción, la traducción y, si los intrones están presentes, afectan al empalme del ARN de una región codificante unida operativamente a la misma.

[0201] El término "célula huésped" se refiere a una célula que se ha transformado, o es capaz de ser transformada, con una secuencia de ácido nucleico y por lo tanto expresa un gen de interés. El término incluye la progenie de la célula parental, independientemente de que la progenie sea idéntica en morfología o en composición genética a la célula parental original, siempre y cuando el gen de interés esté presente.

[0202] El término “transformación” se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener nuevo ADN o ARN. Por ejemplo, una célula se transforma donde se modifica genéticamente desde su estado nativo mediante la introducción de nuevo material genético mediante transfección, transducción u otras técnicas. Después de la transfección o transducción, el ADN transformante se puede recombinar con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, o puede mantenerse transitoriamente como un elemento episomal sin ser replicado, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha “transformado establemente” cuando el ADN transformante se replica con la división de la célula.

[0203] El término “transfección” se refiere a la captación de ADN extraño o exógeno por una célula. Una serie de técnicas de transfección son bien conocidas en la técnica y se describen en el presente documento. Véase, por ejemplo, Graham *et al.*, 1973, Virology 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *supra*; Davis *et al.*, 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu *et al.*, 1981, Gene 13:197.

[0204] El término “transducción” se refiere al proceso mediante el cual se introduce ADN extraño en una célula a través de un vector viral. Véase Jones *et al.*, (1998). Genetics: principles and analysis. Boston: Jones & Bartlett Publ.

[0205] Los términos “polipéptido” o “proteína” se refieren a una macromolécula que tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína, incluyendo supresiones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa, y de modo preferente no más de 8 sustituciones de aminoácidos en la misma. De modo preferente, los polipéptidos o proteínas se aíslan como se define en el presente documento. Los términos “polipéptido” y “proteína” abarcan específicamente moléculas, anticuerpos o secuencias que se unen a antígenos de CLL-1, que tienen delecciones de, adiciones a, y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la proteína de unión al antígeno, y de modo preferente no más de 8 sustituciones de aminoácidos. El término “fragmento polipeptídico” se refiere a un polipéptido aislado que tiene una delección amino terminal, una delección carboxilo terminal y/o una delección interna en comparación con la proteína nativa de longitud completa. Dichos fragmentos también pueden contener aminoácidos modificados en comparación con la proteína nativa. Los fragmentos de polipéptidos útiles incluyen

fragmentos inmunológicamente funcionales de moléculas de unión al antígeno. Los fragmentos útiles incluyen, pero no se limitan a, una o más regiones CDR, dominios variables de una cadena pesada y/o ligera, una porción de otras porciones de una cadena de anticuerpos, y similares.

[0206] El término "aislado" significa (i) libre de al menos algunas otras proteínas con las que normalmente se encontraría, (ii) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (iii) separados de al menos aproximadamente 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está asociado en la naturaleza, (iv) asociados operativamente (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el cual no está asociado en la naturaleza, o (v) no ocurre en la naturaleza.

[0207] Una "variante" de un polipéptido (por ejemplo, una molécula de unión al antígeno o un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos se insertan en, se delecionan y/o se sustituyen en la secuencia de aminoácidos relativa a otra secuencia polipeptídica. Las variantes incluyen proteínas de fusión.

[0208] El término "identidad" hace referencia a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas polipeptídicas o dos o más moléculas de ácido nucleico, según se determina alineando y comparando las secuencias. "Porcentaje de identidad" significa el porcentaje de residuos idénticos entre los aminoácidos o nucleótidos en las moléculas comparadas y se calcula basándose en el tamaño de la más pequeña de las moléculas que se comparan. Para estos cálculos, los huecos en alineaciones (si los hay) son dirigidos de modo preferente por un modelo matemático particular o programa informático (es decir, un "algoritmo").

[0209] Para calcular el porcentaje de identidad, las secuencias que se comparan están típicamente alineadas de una manera que da la coincidencia más grande entre las secuencias. Un ejemplo de un programa informático que se puede utilizar para determinar el porcentaje de identidad es el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux *et al.*, 1984, Nucl. Acid Res. 12: 387, Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.). El algoritmo de ordenador informático GAP se utiliza para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los que se ha de determinar el porcentaje de identidad de secuencia. Las secuencias están alineadas para la adaptación óptima de su respectivo aminoácido o nucleótido

(el "intervalo combinado", según lo determinado por el algoritmo). En ciertas formas de realización, una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff *et al.*, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5: 345–352 para la matriz de comparación PAM 250, Henikoff *et al.*, 1992, Proc. Nat. Acad. USA 89: 10915–10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62) también se utiliza por el algoritmo.

[0210] Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales (por ejemplo, de origen natural) y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology – A Synthesis (2ª Edición, Golub y Gren, Eds., Sinauer Assoc., Sunderland, Mass. (1991)), que se incorpora en el presente documento como referencia para cualquier propósito. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos alfa-, alfa-disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, .gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetilisina, eN-acetil lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, .sigma.-N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos utilizada en el presente documento, la dirección de la izquierda es la dirección del terminal amino y la dirección de la derecha es la dirección del extremo carboxi, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

[0211] Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden abarcar residuos de aminoácidos que no ocurren naturalmente, que se incorporan típicamente por síntesis de péptidos químicos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácidos. Los residuos de origen natural pueden dividirse en clases basadas en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- A) hidrofóbico: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- B) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- C) ácido: Asp, Glu;
- D) básico: His, Lys, Arg;
- E) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- F) aromático: Trp, Tyr, Phe.

[0212] Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases para un miembro de otra clase. Dichos residuos sustituidos se pueden introducir, por ejemplo, en regiones de un anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3

<u>Residuos Originales</u>	<u>Sustituciones Ejemplares</u>	<u>Sustituciones Preferidas</u>
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino–butírico	Arg
	Acid, Gln, Asn	
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala,	Leu
	Tyr	
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr

Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe,	Leu
	Ala, Norleucina	

[0213] El término “derivado” se refiere a una molécula que incluye una modificación química distinta a la inserción, deleción o sustitución de aminoácidos (o ácidos nucleicos). En ciertas formas de realización, los derivados comprenden modificaciones covalentes, incluyendo, pero no limitándose a, unión química con polímeros, lípidos u otros restos orgánicos o inorgánicos. En ciertas formas de realización, una molécula de unión a antígeno químicamente modificada puede tener una vida media circulante mayor que una molécula de unión a antígeno que no está modificada químicamente. En algunas formas de realización, una molécula de unión al antígeno derivada se modifica covalentemente para incluir una o más uniones poliméricas solubles en agua, incluyendo, pero sin limitarse a, polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol.

[0214] Los análogos de péptidos se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido patrón. Estos tipos de compuesto no péptido se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber y Freidinger, TINS, pág. 392 (1985); y Evans et al., J. Med. Chem. Chem., 30: 1229 (1987), que se incorporan en el presente documento como referencia para cualquier propósito.

[0215] Una "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis eficaz", "cantidad eficaz" o "dosificación terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico, por ejemplo, células T CAR manipuladas, es cualquier cantidad que, cuando se utiliza sola o en combinación con otro agente terapéutico, protege a un sujeto contra la aparición de una enfermedad o promueve una regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas o una prevención de impedimento o discapacidad debido a la afección de la enfermedad.

La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad se puede evaluar utilizando una variedad de métodos conocidos por el experto en la materia, tales como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas modelo animal predictivos de eficacia en seres humanos, o ensayando la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

[0216] Los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente e incluyen sujetos humanos y no humanos, así como aquellos con trastornos formalmente diagnosticados, aquellos sin trastornos reconocidos formalmente, los que reciben atención médica, los que están en riesgo de desarrollar los trastornos, etc.

[0217] El término "tratar" y "tratamiento" incluye tratamientos terapéuticos, tratamientos profilácticos y aplicaciones en los que se reduce el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno u otro factor de riesgo. El tratamiento no requiere el curado completo de un trastorno y abarca formas de realización en las que se reducen los síntomas o los factores de riesgo subyacentes. El término "prevenir" no requiere la eliminación del 100% de la posibilidad de un evento. Más bien, denota que la probabilidad de la ocurrencia del evento se ha reducido en presencia del compuesto o método.

[0218] Se pueden utilizar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación pueden realizarse de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se consiguen comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora en el presente documento como referencia para cualquier propósito.

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

[0219] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento como referencia en la misma medida que si cada publicación individual, patente o solicitud de patente estuviera específicamente e individualmente indicada para

incorporarse como referencia. Sin embargo, la cita de una referencia en el presente documento no debe interpretarse como un reconocimiento de que dicha referencia es técnica anterior a la presente invención. En la medida en que cualquiera de las definiciones o términos proporcionados en las referencias incorporadas como referencia difieran de los términos y discusión proporcionados en el presente documento, los presentes términos y definiciones controlan.

[0220] Se considera que la memoria descriptiva escrita anteriormente es suficiente para permitir que un experto en la técnica practique la invención. La descripción anterior y los ejemplos detallan ciertas formas de realización preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Sin embargo, se apreciará que, no importa cuán detallada sea la aparición de lo anterior en el texto, la invención se puede practicar de muchas maneras y la invención se debe interpretar de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

[0221] Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos llevados a cabo y los resultados obtenidos, se proporcionan con fines ilustrativos solamente y no se deben interpretar como limitativos de la presente invención.

EJEMPLO 1

[0222] Determinación de la actividad de CAR CLL–1 por electroporación de ARNm en PBMC humanas. Los plásmidos que codifican un promotor T7, un constructo CAR y una secuencia estabilizadora de globina beta se linealizaron mediante digestión durante la noche de 10 ug de ADN con EcoRI y BamHI (NEB). El ADN se digirió después durante 2 horas a 50°C con proteinasa K (Thermo Fisher™, 600 U/ml) purificado con fenol/cloroformo y se precipitó mediante el agregado de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol. Los gránulos se secaron entonces, se resuspendieron en agua libre de ARNasa/ADNasa y se cuantificaron. Se utilizó entonces 1 ug del ADN lineal para generar la transcripción *in vitro* utilizando el mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra (Thermo Fisher™) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se purificó adicionalmente utilizando el kit MEGAClear (Thermo Fisher™) siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificó utilizando NanoDrop™. La integridad del ARNm se evaluó mediante corrida en un gel de agarosa.

[0223] Se evaluaron diferentes líneas celulares de cáncer para la expresión de CLL–1. Se tiñeron las células Namalwa (ATCC), U937 (ATCC), HL–60 (ATCC), EoL–1 (Sigma), KG1a (ATCC) y MV4; 11 (ATCC) con anticuerpo anti–CLL–1 conjugado

con PE Pharmingen™) en buffer de tinción (BD Pharmingen™) durante 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer de tinción con yoduro de propidio (BD Pharmingen™) antes de la adquisición de datos. Las muestras fueron luego adquiridas por citometría de flujo y los datos analizados y trazados en histogramas utilizando FlowJo™. Los resultados para la expresión de CLL-1 se pueden ver en la FIGURA 1.

[0224] Se aislaron PBMC de *leukopaks* de donantes sanos (Hemacare™) utilizando una centrifugación de densidad de ficoll-paque según las instrucciones del fabricante. Las PBMC se estimularon utilizando OKT3 (50 ng/ml, Miltenyi Biotec™) en medio R10 + IL-2 (300IU/ml, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). Siete días después de la estimulación, las células T se lavaron dos veces en Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific™) y se resuspendieron a una concentración final de $2,5 \times 10^7$ células/ml en Opti-MEM. Se utilizaron 10 µg de ARNm por electroporación. La electroporación de células se realizó utilizando un sistema Gemini X2 (Harvard Apparatus BTX™) configurado para suministrar un solo pulso de 400 V durante 0,5 ms en cubetas de 2 mm (Harvard Apparatus BTX™). Las células se transfirieron inmediatamente a medio R10 + IL-2 y se dejaron recuperar. Las células se mantuvieron a $0,5-2,0 \times 10^6$ células/ml antes del uso en ensayos de actividad.

[0225] Seis horas después de la electroporación del ARNm, las células T se tiñeron con Proteína L biotinilada (Thermo Scientific™) en buffer de tinción (BD Pharmingen™) durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron luego y se tiñeron con PE Streptavidin (BD Pharmingen™) en buffer de tinción durante 30 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer de tinción con yoduro de propidio (BD Pharmingen™) antes de la adquisición de datos. Los resultados para la detección de CAR se muestran en la FIGURA 2.

[0226] Las células efectoras se cultivaron con células objetivo en una relación E: T 1: 1 en medio R10 6 horas después de la electroporación del ARNm. Las líneas celulares ensayadas incluyeron Namalwa, U937, HL-60, EoL-1, KG1a y MV4;11. Dieciséis horas después del post-cocultivo, los sobrenadantes se analizaron por Luminex (EMD Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante y la viabilidad celular objetivo se evaluó mediante análisis citométrico de flujo de la absorción de yoduro de propidio (PI). Los resultados correspondientes al ensayo de liberación de citoquinas se pueden encontrar en la FIGURA 3. Los resultados del ensayo de actividad citolítica se pueden encontrar en la FIGURA 4 y en la FIGURA 5.

EJEMPLO 2

[0227] Determinación de la actividad de CAR CLL–1 por transducción lentiviral de PBMC humanas. Se utilizó un vector de transferencia lentiviral de tercera generación que contenía el constructo CAR CLL–1 diferente, junto con la Mezcla de Empaque Lentiviral ViraPower™ (Life Technologies™) para generar sobrenadantes lentivirales. Brevemente, se generó una mezcla de transfección mezclando 15 ug de ADN y 22,5 ul de polietilenimina (Polysciences™, 1 mg/ml) en 600 ul de medio OptiMEM™. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Simultáneamente, se tripsinizaron células 293T (ATCC), se contaron y se colocaron en placas un total de 10×10^6 células totales en un matraz T75 a lo largo de la mezcla de transfección. Tres días después de la transfección, los sobrenadantes se recogieron y se filtraron a través de un filtro de 0,45 um y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

[0228] Se aislaron PBMC de *leukopaks* de donantes sanos (Hemacare™) utilizando una centrifugación de densidad de ficoll–paque según las instrucciones del fabricante. Las PBMC se estimularon utilizando OKT3 (50 ng/ml, Miltenyi Biotec™) en medio R10 + IL–2 (300IU/ml, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). Cuarenta y ocho horas después de la estimulación, las células se transducen utilizando lentivirus a un MOI = 10. Las células se mantuvieron a $0,5\text{--}2,0 \times 10^6$ células/ml antes del uso en ensayos de actividad.

[0229] Al día 12 después de la estimulación, las células T se tiñeron con Proteína L biotinilada (Thermo Scientific™) en buffer de tinción (BD Pharmingen™) durante 30 minutos a 4°C . Las células se lavaron luego y se tiñeron con PE Streptavidin (BD Pharmingen™) en tampón de tinción durante 30 minutos a 4°C . Las células FUERON lavadas y resuspendidas en buffer de tinción con yoduro de propidio (BD Pharmingen™) antes de la adquisición de datos. Los resultados para la detección de CAR se muestran en la FIGURA 6.

[0230] Las células efectoras se cultivaron con células objetivo a una relación E:T de 1:1 en medio R10 12 días después de la estimulación de células T. Las líneas celulares ensayadas incluyeron Namalwa, U937, HL–60, EoL–1, KG1a y MV4;11. 16 horas después del post–cocultivo, los sobrenadantes fueron analizados por Luminex (EMD Millipore™) siguiendo las instrucciones del fabricante y la viabilidad de la célula objetivo se evaluó mediante análisis citométrico de flujo de la captación de yoduro de propidio (PI). Los resultados correspondientes al ensayo de

liberación de citoquinas se pueden encontrar en la FIGURA 7. Los resultados del ensayo de actividad citolítica se pueden encontrar en la FIGURA 8.

EJEMPLO 3

[0231] En este estudio se utilizaron ratones NSG Jackson hembra (NOD.Cg-*Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*) de 5 a 6 semanas de edad. Los ratones fueron alimentados con una dieta irradiada de roedores Harlan 2918.15 y agua *ad libitum*. Los ratones fueron alojados en la jaula ventilada desechable Innovive™ con lecho de mazorca de maíz dentro de Biobubble® Clean Rooms que proporcionan H.E.P.A aire filtrado en el ambiente de la burbuja a 100 cambios completos de aire por hora. Todos los tratamientos, determinaciones de peso corporal y medidas de tumores se llevaron a cabo en el entorno de burbujas. El ambiente fue controlado a un rango de temperatura de 70°± 2°F y un rango de humedad de 30–70%. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de conformidad con todas las leyes, reglamentos y directrices de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y con la aprobación del Comité de Uso y Cuidado de los Animales del Molecular Imaging, Inc.

Preparación de Células TumORAles

[0232] Se obtuvieron células U937–luc en Solución de Preservación Lifer®. Las células se centrifugaron a 200 rcf durante 8 minutos a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se volvió a suspender el sedimento en solución salina tamponada con fosfato (DPBS) fría de Dulbecco mediante pipeteo. Se diluyó una alícuota de la suspensión celular homogénea en una solución de azul de tripano y se contó utilizando un contador de células automatizado Luna™. La suspensión de células se centrifugó a 200 rcf durante 8 minutos a 4°C. El sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se volvió a suspender en medio libre de suero frío para generar las concentraciones finales de células que no contenían tripano/ml. La suspensión celular se mantuvo en hielo húmedo durante la implantación. Los animales de ensayo se implantaron con células de 1,00E+ 06 por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola el día 0 en 0,2 ml utilizando una aguja de calibre 27 y una jeringa.

Preparación de Célula T de CAR

[0233] Se obtuvieron células T de acuerdo con la invención, se congelaron en hielo seco y se almacenaron en nitrógeno líquido. El día del tratamiento, los crioviales suministrados se retiraron del almacenamiento criogénico y se descongelaron en un baño de agua a 37°C. Para cada grupo, las células T proporcionadas se combinaron en un único tubo cónico de 50 ml con RPMI 1640

caliente suplementado con FBS al 10%. Los tubos crioviales se enjuagaron con RPMI 1640 caliente con FBS al 10% para minimizar la pérdida de células para alcanzar un volumen total de 50 ml en cada tubo cónico. Cada tubo cónico de 50 ml se centrifugó a 200 rcf durante 8 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se aspiraron y los sedimentos celulares se resuspendieron en 10 ml de DPBS a temperatura ambiente. Se diluyó una alícuota de la suspensión celular homogénea en una solución de azul de tripano y se contó manualmente utilizando un hemocitómetro. Las suspensiones celulares se centrifugaron de nuevo a 200 rcf durante 8 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se aspiraron y los sedimentos celulares se resuspendieron a temperatura ambiente con DPBS para generar las concentraciones finales requeridas. Las suspensiones celulares se mantuvieron sobre hielo húmedo durante la administración del tratamiento.

Imágenes de Bioluminiscencia

[0234] La obtención de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* (BLI) se realizó utilizando un Espectro IVIS (Perkin Elmer, Hopkinton, MA). Los animales se formaron imágenes hasta 5 a la vez bajo ~ 1–2% de anestesia con gas isoflurano. A cada ratón se le inyectó IP 150 mg/kg (15 mg/ml) de D–luciferina y se formaron imágenes en las posiciones prona, y luego supina, 10 minutos después de la inyección. Se utilizó el binario grande a pequeño del chip CCD, y el tiempo de exposición ajustado (2 segundos a 2 minutos) para obtener al menos varios cientos de conteos por imagen, y además para evitar la saturación del chip CCD. Las imágenes BLI se recogieron en los días 3, 11, 18 y 25. Las imágenes se analizaron utilizando el software Living Image versión 4.5 (Perkin Elmer, Hopkinton, MA). Todo el cuerpo de volumen fijo ROIs se colocaron en las imágenes prona y supina para cada animal individual, y etiquetados sobre la base de la identificación de los animales. La radiancia total expresada en fotones/s (p/s) fue calculada y exportada para todos los ROIs para facilitar los análisis entre grupos. Las ROI pronas y supinas se sumaron en conjunto para estimar la carga tumoral de todo el cuerpo.

Tratamiento

[0235] Todos los ratones se clasificaron en grupos de estudio basados en la estimación derivada de BLI de la carga de tumor del cuerpo entero. Los ratones se distribuyeron para asegurar que la carga tumoral media para todos los grupos estaba dentro del 10% de la carga tumoral media global para la población del estudio. El tratamiento con células T de CAR empezó el día 3. Todos los ratones se dosificaron con un volumen fijo de 0,2 ml. Los resultados se exponen en la Figura 10.

Evaluación de los Efectos Secundarios

[0236] Todos los animales se observaron para determinar signos clínicos al menos una vez al día. Los animales se pesaron cada día del tratamiento. Los pesos corporales individuales se registraron 3 veces por semana.

[0237] Las siguientes secuencias ejemplificarán adicionalmente la invención.

[0238] CD28T ADN Extracelular, transmembrana, intracelular

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCA
AGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTC
TGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCT
CGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCC
GCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGG
CCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTC
GCTGCCTATCGGAGC (SEC. ID. NO. 1)

[0239] CD28T Extracelular, transmembrana, intracelular AA

LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYLLVT
VAFIIFWVRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPP
RDFAAYRS (SEC. ID. NO. 2)

[0240] CD28T ADN – Extracelular

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTACGTGAAGGGCA
AGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA
(SEC. ID. NO. 3)

[0241] CD28T AA – Extracelular

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP (SEC. ID. NO. 4)

[0242] CD28 ADN Dominio Transmembrana

TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCT
GCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT (SEC. ID. NO. 5)

[0243] CD28 AA Dominio Transmembrana

FWVLVVVGGV LACYSLVTV AFHFWV (SEC. ID. NO. 6)

[0244] CD28 ADN Dominio Intracelular

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGA
CTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGC
ACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGC (SEC. ID. NO. 7)

[0245] CD28 AA Dominio Intracelular

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEC. ID.
NO. 8)

[0246] CD3 zeta ADN

AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGG
GCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAG
AGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGG
GTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATG
AGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCAT
GAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCA
GGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATG
CAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID. NO. 9)

[0247] CD3 zeta AA

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 10)

[0248] CD3 zeta variante AA

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 146)

[0249] CD28 ADN

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTA
ACGGTACCATCATTACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCC
CTCTTCCCCGGGCCATCAAAGCCC (SEC. ID. NO. 11)

[0250] CD28 AA

IEVMYPPPYL DNEKSNGTII HVKGKHLCPs PLFPGPSKP (SEC. ID. NO. 12)

[0251] CD8 ADN dominio transmembrana y extracelular

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACC
AGTGTTCCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCA
CCTACCCAGCTCCTACCATCGCTTCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCC
AGAGGCTTGCCGACCGGCCGCAGGGGGCGCTGTTCATACCAGAGG
ACTGGATTTCGCCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGA
ACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAA
TCACAGGAAC (SEC. ID. NO. 13)

[0252] CD8 AA Dominio transmembrana y extracelular

AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR
PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
(SEC. ID. NO. 14)

[0253] Clon 24C1 HC ADN

CAGGTGCAGCTGCAGGAATCCGGACCGGGGCTGGTGAAGCCCAGC
GAGACTCTGAGTCTCACGTGTACAGTTTCTGGAGGTAGCATTAGCT
CCTACTATTGGTCATGGATAAGGCAGCCCCCGGGAAGGGATTGGA
ATGGATCGGCTATATTTACTACAGTGGGAGCACCAATTACAACCCC
TCACTGAAGTCTAGAGTTACAATCAGCGTTGACACCTCAAAGAATC
AGTTCAGTTTGAAATTGTCTAGCGTCACAGCAGCTGATACAGCCGT
CTATTATTGTGTTTCTCTGGTCTATTGCGGTGGGGATTGTTACAGTG
GCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTTACAGTTTCTTCC
(SEC. ID. NO. 15)

[0254] Clon 24C1 HC AA (CDR Subrayadas)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIG
Y
IYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLV
YCGGDCYSGFDYWGQGTLLVTVSS (SEC. ID. NO. 16)

[0255] Clon 24C1 HC AA CDR1: GGSISSY (SEC. ID. NO. 17)

[0256] Clon 24C1 HC AA CDR2: YYSGS (SEC. ID. NO. 18)

[0257] Clon 24C1 HC AA CDR3: LVYCGGDCYS GFDY (SEC. ID. NO. 19)

[0258] Clon 24C1 LC ADN

GACATCCAGTTGACACAGAGCCCCGAGTTCCTTGTCCGCCTCCGTCG
GGGATAGAGTGTCAATTTACCTGTCAGGCCTCTCAGGATATTAATAA
CTTTCTGAATTGGTATCAGCAAAAGCCCCGAAAGGCACCCAAGCTG
TTGATTTACGACGCCAGTAACCTGGAGACAGGCGTGCCCTCCCCGGT
TTAGTGGTAGCGGAAGCGGTACGGATTTTACCTTTACTATCAGCTCT
CTCCAACCCGAAGACATTGCAACCTACTATTGTCAACAATATGGAA
ACCTGCCTTTTACATTTGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATTAAGCG
G (SEC. ID. NO. 20)

[0259] Clon 24C1 LC AA (CDR Subrayadas)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWYQQKPGKAPKLLIY
DASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQYGNLPFTFG
GGTKVEIKR (SEC. ID. NO. 21)

[0260] Clon 24C1 LC CDR1 AA: QASQDINNFLN (SEC. ID. NO. 22)

[0261] Clon 24C1 LC CDR2 AA: DASNLET (SEC. ID. NO. 23)

[0262] Clon 24C1 LC CDR3 AA: QQYGNLPFT (SEC. ID. NO. 24)

[0263] Clon 24C1 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCGCAGGTCCAAGTCAAGAAAGCGGACCCGG
ACTGGTGAAGCCTTCTGAGACACTTAGTCTGACGTGCACGGTCAGT
GGCGGCTCCATCTCCTCCTATTATTGGTCATGGATACGACAACCCCC
AGGTAAGGGCCTGGAATGGATTGGCTATATCTACTATTCAGGAAGC
ACGAACTACAATCCCAGCCTGAAGTCCCGAGTGACAATTTTCAGTAG
ATACCAGTAAAAACCAAGTTCAGTCTTAACTGTCAAGCGTGACAGC
TGCCGACACCGCTGTGTATTACTGCGTCTCACTGGTGTATTGTGGAG

GGGATTGTTATAGCGGGTTCGATTATTGGGGACAGGGAACCCTGGT
 GACTGTATCTTCCGGCGGCGGCGGCTCAGGGGGTGGCGGTAGTGGC
 GGTGGGGGTTCGATATTCAACTGACACAATCCCCAGCTCACTCA
 GCGCCAGCGTGGGGGACAGGGTTAGCTTTACCTGTCAAGCCTCTCA
 GGATATAAATAACTTTCTGAACTGGTATCAACAGAAGCCTGGGAAG
 GCGCCCAAACCTCCTGATCTATGATGCGTCCAACCTGGAAACTGGCG
 TGCCTTCACGCTTTAGCGGCTCTGGCAGTGGTACAGACTTCACTTTT
 ACCATCTCTTCACTTCAGCCGGAGGACATCGCCACATATTACTGTCA
 ACAGTACGGAACTTGCCCTTTACTTTTGGAGGCGGCACCAAAGTT
 GAAATCAAAAGGGCCGCTGCCCTGGATAACGAAAAGAGCAATGGG
 ACTATAATACATGTTAAAGGAAAACACCTGTGTCCATCTCCCCTGTT
 CCCTGGACCGTCAAAGCCATTTTGGGTGCTCGTGGTTGTCGGTGGC
 GTTCTCGCCTGTTATAGCTTGCTGGTGACAGTAGCCTTCATTATCTT
 TTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATG
 AATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGC
 CTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAA
 GTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAAC
 CAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGAC
 GTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAA
 CCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAG
 AAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGA
 GAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTC
 AGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCC
 TGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 25)

[0264] Clon 24C1 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido Señal en **negrita**)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG
 GSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSK
 NQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGLVTVSS
 GGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLN
 WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA
 TYYCQQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP
 PLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY
 MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN
 QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK

DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA
LHMQALPPR (SEC. ID. NO. 26)

[0265]

Clon 24C1 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTCCAAGTCAAGAAAGCGGACCCGGACTGGTGAAGCCTTCTG
AGACACTTAGTCTGACGTGCACGGTCAGTGGCGGCTCCATCTCCTC
CTATTATTGGTCATGGATACGACAACCCCCAGGTAAGGGCCTGGAA
TGGATTGGCTATATCTACTATTCAGGAAGCACGAAGTACAATCCCA
GCCTGAAGTCCCGAGTGACAATTTTCAGTAGATACCAGTAAAAACCA
GTTTCAGTCTTAAACTGTCAAGCGTGACAGCTGCCGACACCGCTGTG
TATTACTGCGTCTCACTGGTGTATTGTGGAGGGGATTGTTATAGCGG
GTTTCGATTATTGGGGACAGGGAACCCTGGTGACTGTATCTTCCGGC
GGCGGCGGCTCAGGGGGTGGCGGTAGTGGCGGTGGGGGTTCGAT
ATTCAACTGACACAATCCCCCAGCTCACTCAGCGCCAGCGTGGGGG
ACAGGGTTAGCTTTACCTGTCAAGCCTCTCAGGATATAAATAACTTT
CTGAACTGGTATCAACAGAAGCCTGGGAAGGCGCCCAAACCTCCTGA
TCTATGATGCGTCCAACCTGGAAACTGGCGTGCCTTCACGCTTTAGC
GGCTCTGGCAGTGGTACAGACTTCACTTTTACCATCTCTTCACTTCA
GCCGGAGGACATCGCCACATATTACTGTCAACAGTACGGAAACTTG
CCCTTTACTTTTGGAGGCGGCACCAAAGTTGAAATCAAAAGGGCCG
CTGCCCTGGATAACGAAAAGAGCAATGGGACTATAATACATGTAA
AGGAAAACACCTGTGTCCATCTCCCCTGTTCCCTGGACCGTCAAAG
CCATTTTGGGTGCTCGTGGTTGTTCGGTGGCGTTCTCGCCTGTTATAG
CTTGCTGGTGACAGTAGCCTTCATTATCTTTTGGGTGAGATCCAAAA
GAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCG
CCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGA
GATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAG
ATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCT
CAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAG
AGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCC
CCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGA
AGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAA
AGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGAT
ACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID.
NO. 27)

[0266] Clon 24C1 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIG
 YIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSL
 VYCGGDCYSGFDYWGGQTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSP
 SSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET
 GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEI
 KRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLAC
 YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR
 DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
 RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 28)

[0267] Clon 24C1 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
 GCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGCTGCAGGAATCCGGACCGGG
 GCTGGTGAAGCCCAGCGAGACTCTGAGTCTCACGTGTACAGTTTCT
 GGAGGTAGCATTAGCTCCTACTATTGGTCATGGATAAGGCAGCCCC
 CCGGGAAGGGATTGGAATGGATCGGCTATATTTACTACAGTGGGAG
 CACCAATTACAACCCCTCACTGAAGTCTAGAGTTACAATCAGCGTT
 GACACCTCAAAGAATCAGTTCAGTTTGAAATTGTCTAGCGTCACAG
 CAGCTGATACAGCCGTCTATTATTGTGTTTCTCTGGTCTATTGCGGT
 GGGGATTGTTACAGTGGCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTGG
 TTACAGTTTCTTCCGGGGGGGGAGGCTCTGGGGGCGGAGGCTCAGG
 TGGTGGAGGCAGCGACATCCAGTTGACACAGAGCCCGAGTTCCTTG
 TCCGCCTCCGTCGGGGATAGAGTGTCATTTACCTGTCAGGCCTCTCA
 GGATATTAATAACTTTCTGAATTGGTATCAGCAAAAGCCCGGAAAG
 GCACCCAAGCTGTTGATTACGACGCCAGTAACCTGGAGACAGGCG
 TGCCCTCCCGGTTTAGTGGTAGCGGAAGCGGTACGGATTTTACCTTT
 ACTATCAGCTCTCTCCAACCCGAAGACATTGCAACCTACTATTGTCA
 ACAATATGGAAACCTGCCTTTTACATTTGGCGGCGGCACCAAGGTG
 GAGATTAAGCGGGCGGCAGCTATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTT
 ACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTACCATCATTACGTGAAAG
 GTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCCTCTCCCCGGGCCATCAAAGCCC
 TTCTGGGTTCTTGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTTGCTTGTTATTCTCT
 GCTCGTTACCGTGGCGTTTATCATTTTTTGGGTTAGATCCAAAAGAA
 GCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCC

TGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT
 TTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATG
 CACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAA
 CCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGG
 ACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCA
 GGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGC
 CTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGG
 GCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACT
 TATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID.
 NO. 29)

[0268] Clon 24C1 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido Señal en **negrita**)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG
GSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSK
NQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGLVTVSS
GGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLN
WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIA
TYQCQQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV
KGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKRS
RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDA
LHMQALPPR (SEC. ID. NO. 30)

[0269] Clon 24C1 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTGCAGCTGCAGGAATCCGGACCGGGGCTGGTGAAGCCCAGC
 GAGACTCTGAGTCTCACGTGTACAGTTTCTGGAGGTAGCATTAGCT
 CCTACTATTGGTCATGGATAAGGCAGCCCCCGGGAAGGGATTGGA
 ATGGATCGGCTATATTTACTACAGTGGGAGCACCAATTACAACCCC
 TCACTGAAGTCTAGAGTTACAATCAGCGTTGACACCTCAAAGAATC
 AGTTCAGTTTGAAATTGTCTAGCGTCACAGCAGCTGATACAGCCGT
 CTATTATTGTGTTTCTCTGGTCTATTGCGGTGGGGATTGTTACAGTG
 GCTTTGACTATTGGGGGCAGGGTACTCTGGTTACAGTTTCTTCCGGG
 GGGGGAGGCTCTGGGGGCGGAGGCTCAGGTGGTGGAGGCAGCGAC
 ATCCAGTTGACACAGAGCCCGAGTTCCTTGTCCGCCTCCGTCGGGG

ATAGAGTGTCAATTTACCTGTCAGGCCTCTCAGGATATTAATAACTTT
 CTGAATTGGTATCAGCAAAAGCCCGGAAAGGCACCCAAGCTGTTGA
 TTTACGACGCCAGTAACCTGGAGACAGGCGTGCCCTCCCGGTTTAG
 TGGTAGCGGAAGCGGTACGGATTTTACCTTTACTATCAGCTCTCTCC
 AACCCGAAGACATTGCAACCTACTATTGTCAACAATATGGAAACCT
 GCCTTTTACATTTGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATTAAGCGGGCG
 GCAGCTATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAA
 AGAGTAACGGTACCATCATTACAGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCC
 TTCTCCCCTCTTCCCCGGGCCATCAAAGCCCTTCTGGGTTCTTGTGG
 TCGTGGGAGGCGTGCTTGCTTGTTATTCTCTGCTCGTTACCGTGGCG
 TTTATCATTTTTTTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAG
 CGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAA
 CACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTCGCTGCCTATCGGA
 GCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCA
 GGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGA
 AGAGTATGACGTTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGAT
 GGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAA
 TGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGC
 ATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTAC
 CAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACA
 TGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID. NO. 31)

[0270] Clon 24C1 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIG
 YIYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSL
 VYCGGDCYSGFDYWGGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSP
 SSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET
 GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDLATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEI
 KRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL
 VVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
 YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
 ERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 32)

[0271] Clon 24C1 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
 GCACGCCGCACGCCCCGAGGTGCAATTGCAAGAGTCCGGCCCCGGA
 CTCGTTAAACCCAGTGAGACGCTTAGCCTGACCTGTACCGTCTCAG
 GGGGCAGCATCTCCTCTTATTACTGGAGCTGGATCAGGCAGCCTCC
 AGGAAAAGGCCTTGAATGGATTGGGTACATCTACTACTCTGGCTCA
 ACAAATTATAATCCATCCCTGAAGTCCCGCGTGACTATCTCTGTGGA
 CACCAGCAAGAATCAGTTTTCACTGAAGTTGTCTAGTGTTACCGCG
 GCCGACACCGCCGTATACTACTGTGTGTCTCTTGTGTACTGTGGCGG
 CGACTGCTATTCCGGGTTTCGACTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTA
 ACCGTGTCCTCAGGCGGCGGCGGGTCAGGAGGAGGCGGCAGTGGA
 GGTGGCGGCTCCGACATCCAGCTGACACAATCACCATCTTCCCTTTC
 AGCTTCAGTCGGGGACAGAGTGTCTTCACATGCCAGGCCAGCCAG
 GATATCAATAACTTCCTGAACTGGTACCAACAGAAACCCGGAAAGG
 CTCCAAAGCTCCTGATCTATGATGCTTCCAACCTGGAGACCGGCGT
 GCCCTCCAGGTTTCAGTGGTTCAGGATCAGGCACTGACTTTACGTTCA
 CCATATCCAGTCTTCAGCCCGAAGACATTGCAACCTATTACTGCCA
 ACAATACGGGAACCTTCCCTTTACATTCGGAGGCGGCACCAAGGTG
 GAAATCAAAAGGGCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTA
 GTCACTTTGTACCAGTGTTCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCC
 GCTCCACGGCCACCTACCCAGCTCCTACCATCGCTTCACAGCCTCT
 GTCCCTGCGCCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGCAGGGGGCGCTGTT
 CATACCAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGATATCTATATCTGGGCAC
 CCCTGGCCGGAACCTGCGGCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACG
 CTCTATTGTAATCACAGGAACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCC
 ATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAG
 GAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTAT
 CGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATC
 AGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCA
 GGGAAAGAGTATGACGTTTTTGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTG
 AGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCT
 ATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
 AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTT
 GTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTC
 CACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 33)

[0272]

Clon 24C1 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG
 GSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSK
 NQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGLVTVSS
 GGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLN
 WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA
 TYYCQQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL
 AGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
 QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 34)

[0273]

Clon 24C1 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTGCAATTGCAAGAGTCCGGCCCCGGACTCGTTAAACCCAGTG
 AGACGCTTAGCCTGACCTGTACCGTCTCAGGGGGCAGCATCTCCTC
 TTATTACTGGAGCTGGATCAGGCAGCCTCCAGGAAAAGGCCTTGAA
 TGGATTGGGTACATCTACTACTCTGGCTCAACAAATTATAATCCATC
 CCTGAAGTCCCGCGTGACTATCTCTGTGGACACCAGCAAGAATCAG
 TTTTCACTGAAGTTGTCTAGTGTTACCGCGGCCGACACCGCCGTATA
 CTACTGTGTGTCTCTTGTGTACTGTGGCGGCGACTGCTATTCCGGGT
 TCGACTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTAACCGTGTCTCAGGCGG
 CGGCGGGTCAGGAGGAGGCGGCAGTGGAGGTGGCGGCTCCGACAT
 CCAGCTGACACAATCACCATCTTCCCTTTCAGCTTCAGTCGGGGACA
 GAGTGTCTTCACATGCCAGGCCAGCCAGGATATCAATAACTTCCT
 GAACTGGTACCAACAGAAACCCGGAAAGGCTCCAAAGCTCCTGATC
 TATGATGCTTCCAACCTGGAGACCGGCGTGCCCTCCAGGTTCAGTG
 GTTCAGGATCAGGCACTGACTTTACGTTCACCATATCCAGTCTTCAG
 CCCGAAGACATTGCAACCTATTACTGCCAACAATACGGGAACCTTC
 CCTTTACATTTCGGAGGCGGCACCAAGGTGGAAATCAAAAGGGCTGC
 AGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTGT
 TCTTGCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACC
 CCAGCTCCTACCATCGCTTCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCCAGAGGC
 TTGCCGACCGGCCGAGGGGGCGCTGTTACATACCAGAGGACTGGAT
 TTCGCCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGAACCTGCG
 GCGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGG
 AACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATA
 TGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTA

CGCACACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTT
TCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGGCCAGAACCAAC
TGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTT
GGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAG
ACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGA
TAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCG
GAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCAC
TGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCA
CCTAGG (SEC. ID. NO. 35)

[0274]

Clon 24C1 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIG
YIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSL
VYCGGDCYSGFDYWGGQTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSP
SSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET
GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEI
KRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK
DTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 36)

[0275]

Clon 24C1 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCGGATATCCAGCTCACGCAATCCCCCTCAAGC
TTGAGTGCCTCCGTGGGCGACCGGGTGTCTTCACATGTCAGGCAA
GCCAAGACATAAATAATTTCTGAATTGGTACCAACAAAAACCCGG
CAAGGCTCCCAAACCTCCTGATTTATGATGCCTCCAATCTGGAGACC
GGGGTCCCTTCTAGATTCAGCGGAAGTGGCAGCGGCACAGACTTTA
CATTTACTATCTCTTCTCTGCAACCAGAGGACATCGCCACATACTAT
TGCCAGCAATACGGCAATCTGCCCTTCACCTTCGGAGGCGGAACCA
AGGTAGAAATTAAGGGGGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGGGCT
CTGGCGGAGGGGGCTCCCAAGTACAATTGCAGGAGTCAGGGCCTG
GACTCGTGAAGCCTTCAGAACTTTGTCACTGACATGTACAGTGTC
CGGCGGAAGCATTTCCAGTTACTATTGGTCCTGGATTAGACAGCCA

CCCGGCAAAGGACTGGAATGGATTGGATATATCTACTACTCTGGAT
 CTACAAACTATAATCCCAGCCTCAAATCCAGGGTCACTATTAGTGT
 GGATACATCAAAGAATCAGTTCTCCTTGAAGCTGAGCTCAGTCACT
 GCTGCCGACACCGCAGTGTACTATTGTGTGAGCCTGGTCTACTGCG
 GCGGAGATTGCTACAGCGGTTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCT
 GGTTACCGTTAGTTCCGCGGCTGCTCTTGATAACGAGAAGTCCAAC
 GGTACGATTATCCACGTTAAGGGTAAGCACCTTTGCCCTAGCCCGC
 TGTTCCCAGGCCCCAGTAAGCCCTTTTGGGTCCCTCGTTGTGGTAGGT
 GGGGTACTCGCCTGCTACTCCCTGCTCGTCACTGTTCGCATTCATCAT
 CTTCTGGGTCAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTAC
 ATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACC
 AGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGT
 GAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAG
 AACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTAT
 GACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGC
 AAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTG
 CAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAA
 GGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGA
 CTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAG
 CCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 37)

[0276] Clon 24C1 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQ
 DINNFLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS
 LQPEDIATYYCQQYGNLPFTFGGGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQ
 VQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGY
 IYYSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLV
 YCGGDCYSGFDYWGQGLTVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP
 PLFPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY
 MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN
 QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
 DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA
 LHMQUALPPR (SEC. ID. NO. 38)

[0277] Clon 24C1 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

GATATCCAGCTCACGCAATCCCCCTCAAGCTTGAGTGCCTCCGTGG
 GCGACCGGGTGTCTTCACATGTCAGGCAAGCCAAGACATAAATAA
 TTTCTGAATTGGTACCAACAAAAACCCGGCAAGGCTCCCCAACTC
 CTGATTTATGATGCCTCCAATCTGGAGACCGGGGTCCCTTCTAGATT
 CAGCGGAAGTGGCAGCGGCACAGACTTTACATTTACTATCTCTTCTC
 TGCAACCAGAGGACATCGCCACATACTATTGCCAGCAATACGGCAA
 TCTGCCCTTCACCTTCGGAGGCGGAACCAAGGTAGAAATTAAAAGG
 GGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTCC
 CAAGTACAATTGCAGGAGTCAGGGCCTGGACTCGTGAAGCCTTCAG
 AAACCTTTGTCACTGACATGTACAGTGTCCGGCGGAAGCATTTCCAG
 TTAATATTGGTCCTGGATTAGACAGCCACCCGGCAAAGGACTGGAA
 TGGATTGGATATATCTACTACTCTGGATCTACAACTATAATCCCAG
 CCTCAAATCCAGGGTCACTATTAGTGTGGATACATCAAAGAATCAG
 TTCTCCTTGAAGCTGAGCTCAGTCACTGCTGCCGACACCGCAGTGTA
 CTATTGTGTGAGCCTGGTCTACTGCGGCGGAGATTGCTACAGCGGT
 TTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTAGTTCCGCGG
 CTGCTCTTGATAACGAGAAGTCCAACGGTACGATTATCCACGTAA
 GGGTAAGCACCTTTGCCCTAGCCCGCTGTTCCCAGGCCCCAGTAAG
 CCCTTTTGGGTCCTCGTTGTGGTAGGTGGGGTACTCGCTGCTACTC
 CCTGCTCGTCACTGTTCGCATTCATCATCTTCTGGGTCAGATCCAAAA
 GAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCG
 CCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGA
 GATTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAG
 ATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCT
 CAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAG
 AGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCC
 CCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGA
 AGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAA
 AGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGAT
 ACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID.
 NO. 39)

[0278]

Clon 24C1 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

DIQLTQSPSSLASVGDVRSFTCQASQDINNFLNWYQQKPGKAPKLLIY
 DASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYGNLPFTFG
 GGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV
 SGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS

KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGTLVTVS
 SAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLACY
 SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD
 FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
 GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 40)

[0279]

Clon 24C1 CD28 CD3 zeta CAR ADN AA Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
 GCACGCCGCACGCCCGGATATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCTT
 TGAGTGCCTCCGTGGGTGACCGCGTCTCTTTCACTTGCCAAGCCAGC
 CAAGACATCAACAACCTTTCTGAATTGGTACCAGCAGAAACCAGGCA
 AAGCACCAAAGCTCCTCATCTACGACGCCTCCAACCTGGAAACCGG
 GGTGCCCAGCAGGTTTAGCGGGAGCGGTTCTGGCACGGATTTTACG
 TTCACCATCTCCTCTCTGCAGCCCGAGGATATAGCTACTTATTACTG
 TCAGCAGTACGGGAATCTGCCATTTACTTTTGGGGGTGGAACATAAG
 GTGGAAATCAAAAGGGGCGGCGGGGGAAGCGGGGGCGGGGGCTCA
 GGTGGCGGAGGGAGCCAGGTGCAACTCCAGGAAAGTGGCCAGGA
 TTGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTTTCCCTTACTTGTACTGTTAGCGG
 AGGCAGCATAAGCAGCTACTATTGGTCCTGGATCAGACAGCCACCA
 GGGAAAGGGCTTGAATGGATTGGCTACATTTACTATTCCGGGTCCA
 CCAACTACAACCCATCCCTCAAGTCCCGCGTGACAATTTCCGTCGA
 CACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAACTTAGTAGCGTCACTGCT
 GCAGATACAGCAGTGTACTATTGTGTCAGCCTTGTCTACTGTGGCG
 GCGACTGCTACAGTGGCTTTGATTACTGGGGACAGGGCACGCTCGT
 GACAGTGTCCAGCGCTGCGGCTATCGAGGTAATGTATCCGCCACCG
 TATCTGGACAACGAGAAGTCTAATGGGACAATCATTACGTGAAGG
 GGAAGCACCTGTGTCCATCCCCCTGTTTCCGGGTCCCAGTAAACCC
 TTCTGGGTGCTTGTGTGCTGTTGGCGGGGTGCTGGCCTGCTATTCCT
 GCTGGTGACCGTCGCGTTTATTATTTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAA
 GCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCC
 TGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT
 TTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATG
 CACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAA
 CCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGG
 ACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCA
 GGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGC

CTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGG
GCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACT
TATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID.
NO. 41)

[0280] Clon 24C1 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLPLALLHAARPDQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQ
DINNFLNWFYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS
LQPEDIATYYCQQYGNLPFTFGGGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQ
VQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGY
IYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLV
YCGGDCYSGFDYWGQGLTVTVSSAAAEVMPYPYLDNEKSNGTIIHV
KGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKRS
RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA
LHMQUALPPR (SEC. ID. NO. 42)

[0281] Clon 24C1 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

GATATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCTTTGAGTGCCTCCGTGGG
TGACCGCGTCTCTTTCACTTGCCAAGCCAGCCAAGACATCAACAAC
TTTCTGAATTGGTACCAGCAGAAACCAGGCAAAGCACCAAAGCTCC
TCATCTACGACGCCTCCAACCTGGAAACCGGGGTGCCCAGCAGGTT
TAGCGGGAGCGGTTCTGGCACGGATTTTACGTTACCATCTCCTCTC
TGCAGCCCGAGGATATAGCTACTTATTACTGTCAGCAGTACGGGAA
TCTGCCATTTACTTTTGGGGGTGGAATAAGGTGGAAATCAAAAAGG
GGCGGGCGGGGAAGCGGGGGGCGGGGGCTCAGGTGGCGGAGGGAG
CCAGGTGCAACTCCAGGAAAGTGGCCCAGGATTGGTGAAGCCCAG
CGAGACCCTTTCCCTTACTTGTACTGTTAGCGGAGGCAGCATAAGC
AGCTACTATTGGTCCTGGATCAGACAGCCACCAGGGAAAGGGCTTG
AATGGATTGGCTACATTTACTATTCCGGGTCCACCAACTACAACCC
ATCCCTCAAGTCCCGCGTGACAATTTCCGTCGACACAAGCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGAACTTAGTAGCGTCACTGCTGCAGATACAGCAG
TGTACTATTGTGTCAGCCTTGTCTACTGTGGCGGCGACTGCTACAGT
GGCTTTGATTACTGGGGACAGGGCACGCTCGTGACAGTGTCCAGCG
CTGCGGCTATCGAGGTAATGTATCCGCCACCGTATCTGGACAACGA

GAAGTCTAATGGGACAATCATTACGTGAAGGGGAAGCACCTGTGT
 CCATCCCCCCTGTTTCCGGGTCCCAGTAAACCCTTCTGGGTGCTTGT
 TGTCGTTGGCGGGGTGCTGGCCTGCTATTCCCTGCTGGTGACCGTCG
 CGTTTATTATTTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCAT
 AGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGA
 AACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTCTGCTGCCTATCG
 GAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAG
 CAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGG
 GAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAG
 ATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAAGGAGGGTCTCTAT
 AATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAG
 GCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGT
 ACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCA
 CATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID. NO. 43)

[0282] Clon 24C1 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWWYQQKPGKAPKLLIY
 DASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYGNLPFTFG
 GGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV
 SGGSSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRTISVDTS
 KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGTLVTVS
 SAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLTV
 VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
 QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 44)

[0283] Clon 24C1 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
 GCACGCCGCACGCCCGGACATTCAATTGACCCAGTCCCCTAGCAGT
 CTCTCAGCAAGTGTGGGAGATAGGGTGTCATTACCTGTCAGGCTT
 CACAGGACATCAACAACCTTCCTCAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGG
 GAAGGCACCAAAGCTGCTCATATATGACGCTTCAAACCTTGAAACC
 GGAGTACCTAGCCGCTTCAGCGGAAGCGGATCAGGGACTGACTTCA
 CTTTTACCATCTCTTCACTGCAGCCCGAAGACATCGCCACATACTAC
 TGCCAGCAGTACGGAAACTTGCCTTTTACATTTGGGGGGCGGCACCA
 AAGTGGAGATTAAGCGAGGGGGGAGGCGGCTCAGGAGGCGGTGGCT
 CCGGAGGCGGGGGTTCCCAGGTCCAGCTCCAGGAATCCGGCCCCAGG

TCTGGTTAAGCCCAGTGAAACTTTGTCCCTCACGTGTACTGTGAGCG
 GTGGTTCAATCTCCTCATACTATTGGTCTTGGATACGGCAACCTCCT
 GGAAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTATATCTACTATAGTGGCTCCA
 CTAATTACAACCCTTCCCTCAAGTCCAGAGTCACCATTTCCTGGAC
 ACATCTAAGAACCAGTTCAGTCTGAAGTTGTCCAGCGTTACAGCCG
 CAGACACAGCCGTTTATTACTGTGTGTCTCTTGTTTACTGCGGGGGA
 GACTGTTATAGCGGCTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCTTGGTCA
 CAGTCTCTTCCGCGGCCGCCCTCTTAACAGTATTATGTACTTTTCT
 CATTTTGTACCCGTGTTTCCTTCCCGCTAAGCCAACTACTACCCCGGC
 CCCACGGCCGCCTACCCCTGCACCCACAATAGCCAGTCAGCCTTTG
 AGCCTGAGACCTGAGGCTTGTCGGCCGGCTGCTGGGGGTGCAGTGC
 ACACACGAGGTCTTGATTTTGCTTGCGACATATACATCTGGGCCCCT
 CTGGCCGGGACCTGTGGGGGTGCTGCTTCTGAGCTTGGTCATCACGCT
 CTATTGCAACCATCGCAACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCAT
 AGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGA
 AACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCG
 GAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAG
 CAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGG
 GAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAG
 ATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTAT
 AATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAG
 GCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGTTTGT
 ACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCA
 CATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 45)

[0284] Clon 24C1 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQ
 DINNFLNWFYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFISS
 LQPEDIATYYCQQYGNLPFTFGGGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQ
 VQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGY
 IYYSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVSLV
 YCGGDCYSGFDYWGQGLTVTVSSAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL
 AGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
 QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD

VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 46)

[0285]

Clon 24C1 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

GACATTCAATTGACCCAGTCCCCTAGCAGTCTCTCAGCAAGTGTGG
GAGATAGGGTGTTCATTACCTGTCAGGCTTCACAGGACATCAACAA
CTTCCTCAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAGGCACCAAAGCTG
CTCATATATGACGCTTCAAACCTTGAAACCGGAGTACCTAGCCGCT
TCAGCGGAAGCGGATCAGGGACTGACTTCACTTTTACCATCTCTTCA
CTGCAGCCCGAAGACATCGCCACATACTACTGCCAGCAGTACGGAA
ACTTGCCTTTTACATTTGGGGGCGGCACCAAAGTGAGATTAAGCG
AGGGGGAGGCGGCTCAGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGCGGGGGTTC
CCAGGTCCAGCTCCAGGAATCCGGCCCAGGTCTGGTTAAGCCCAGT
GAAACTTTGTCCCTCACGTGTACTGTGAGCGGTGGTTCAATCTCCTC
ATACTATTGGTCTTGGATACGGCAACCTCCTGGAAAGGGCCTCGAG
TGGATCGGCTATATCTACTATAGTGGCTCCACTAATTACAACCCTTC
CCTCAAGTCCAGAGTCACCATTTCCGTGGACACATCTAAGAACCAG
TTCAGTCTGAAGTTGTCCAGCGTTACAGCCGCAGACACAGCCGTTT
ATTACTGTGTGTCTCTTGTTTACTGCGGGGGAGACTGTTATAGCGGC
TTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCTTGGTCACAGTCTCTTCCGCGGC
CGCCCTCTCTAACAGTATTATGTACTTTTCTCATTTTGTACCCGTGTT
CCTTCCCGCTAAGCCAACTACTACCCCGGCCCCACGGCCGCCTACC
CCTGCACCCACAATAGCCAGTCAGCCTTTGAGCCTGAGACCTGAGG
CTTGTGCGCCGGCTGCTGGGGGTGCAGTGCACACACGAGGTCTTGA
TTTTGCTTGCGACATATACATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGGACCTGTG
GGGTGCTGCTTCTGAGCTTGGTCATCACGCTCTATTGCAACCATCGC
AACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATA
TGA TCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTA
CGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTT
TCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGGCCAGAACCAAC
TGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTT
GGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAG
ACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGA
TAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCG
GAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCAC
TGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCA
CCTAGG (SEC. ID. NO. 47)

[0286] Clon 24C1 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWDYQQKPGKAPKLLIY
DASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQYGNLPFTFG
GGTKVEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV
SGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT
KNQFSLKLSSVTADTAVYYCVSLVYCGGDCYSGFDYWGQGLTVTVSS
AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR
PAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSK
RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGEEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK
DTYDALHMQA LPPR (SEC. ID. NO. 48)

[0287] Clon 24C8 Cadena Pesada (HC) ADN

CAGGTACAGCTGCAGGAATCTGGGCCCCGGACTTGTCAAGCCAAGTC
AGACACTTTCTCTTACATGTACCGTGAGCGGCGGAAGTATAAGCAG
TGGAGGCTTTTACTGGTCTTGGATACGGCAGCACCCAGGCAAAGGC
TTGGAGTGGATTGGATACATTCATCATTGAGGATCTACACACTATA
ATCCATCCCTTAAGTCCCGGGTCACCATTAGCATTGATACGTCTAAG
AATCTGTTCAGTCTCAGGCTGTCCTCCGTCCTGCTGCCGACACAGC
CGTGTACTACTGCGCCTCCTTGGTTTACTGCGGAGGCGACTGTTATA
GCGGCTTTGATTATTGGGGGCAGGGGACCCTCGTAACCGTGAGCTC
T (SEC. ID. NO. 48)

[0288] Clon 24C8 AA HC (CDR en Subrayado)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGFYWSWIRQHPGKGLE
WIGYIHHSGSTHYNPSLKSRVTISIDTSKNLFSRLSSVTAAADTAVYYCA
SLVYCGGDCYSGFDYWGQGLTVTVSS (SEC. ID. NO. 50)

[0289] Clon 24C8 HC CDR1 AA: GGSISSGGF (SEC. ID. NO. 51)**[0290]** Clon 24C8 HC CDR2 AA: HHSGS (SEC. ID. NO. 52)**[0291]** Clon 24C8 HC CDR3 AA: LVYCGGDCYS GFDY (SEC. ID. NO. 53)**[0292]** Clon 24C8 Cadena Ligera (LC) ADN

GATATCCAGCTCACTCAAAGCCCCCTCTAGTCTCTCTGCCTCAGTGGG
 GGATCGGGTCAGTTTTACTTGTCAAGCTTCACAGGATATCAACAAC
 TTCCTTAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGCTGC
 TCATCTATGATGCCTCAAATTTGGAGACGGGTGTTCCCAGTCGATTC
 TCTGGGTCAGGGTCCGGGACCGACTTTACGTTTACGATCTCCTCTCT
 GCAGCCCGAAGACATCGCCACATACTATTGTCAACAGTACGGCAAC
 TTGCCTTTCACATTTGGGGGCGGGACTAAGGTTGAAATCAAGAGG
 (SEC. ID. NO. 54)

[0293] Clon 24C8 LC AA (CDR en Subrayado)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWYQQKPGKAPKLLIY
DASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYGNLPFTFG
 GGTKVEIKR (SEC. ID. NO. 55)

[0294] Clon 24C8 LC CDR1 AA: QASQDINNFLN (SEC. ID. NO. 56)

[0295] Clon 24C8 LC CDR2 AA: DASNLET (SEC. ID. NO. 57)

[0296] Clon 24C8 LC CDR3 AA: QQYGNLPFT (SEC. ID. NO. 58)

[0297] Clon 24C8 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
 GCACGCCGCACGCCCGCAGGTACAGCTGCAGGAATCTGGGCCCCGG
 ACTTGTCAAGCCAAGTCAGACACTTTCTCTTACATGTACCGTGAGCG
 GCGGAAGTATAAGCAGTGGAGGCTTTTACTGGTCTTGGATACGGCA
 GCACCCAGGCAAAGGCTTGGAGTGGATTGGATACATTCATCATTCA
 GGATCTACACACTATAATCCATCCCTTAAGTCCCGGGTCCACATTAG
 CATTGATACGTCTAAGAATCTGTTCAGTCTCAGGCTGTCCTCCGTCA
 CTGCTGCCGACACAGCCGTGTACTACTGCGCCTCCTTGGTTTACTGC
 GGAGGCGACTGTTATAGCGGCTTTGATTATTGGGGGCAGGGGACCC
 TCGTAACCGTGAGCTCTGGAGGGGGTGGGAGCGGGGGAGGAGGTT
 CAGGGGGGGGCGGCTCCGATATCCAGCTCACTCAAAGCCCCCTCTAG
 TCTCTCTGCCTCAGTGGGGGATCGGGTCAGTTTTACTTGTCAAGCTT
 CACAGGATATCAACAACCTTCCTTAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGG
 AAAAGCACCCAAGCTGCTCATCTATGATGCCTCAAATTTGGAGACG
 GGTGTTCCCAGTCGATTCTCTGGGTCAGGGTCCGGGACCGACTTTAC
 GTTTACGATCTCCTCTCTGCAGCCCGAAGACATCGCCACATACTATT
 GTCAACAGTACGGCAACTTGCCTTTCACATTTGGGGGCGGGACTAA

GGTTGAAATCAAGAGGGCCGCTGCACTGGACAATGAGAAGTCCAA
 CGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCTAGTCCT
 CTGTTCCCAGGCCCATCCAAACCTTTTTGGGTTCTTGTGTGGTCGG
 GGGGGTGCTGGCCTGCTATTCTCTGCTGGTCACGGTGGCCTTCATAA
 TTTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTA
 CATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTAC
 CAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGG
 TGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCA
 GAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTA
 TGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGG
 CAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCT
 GCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAA
 AGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGG
 ACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAA
 GCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 59)

[0298] Clon 24C8 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG
 GSISSGGFYWSWIRQHPGKGLEWIGYIHHSGSTHYNPSLKSRTISIDTS
 KNLFSLRLSSVTAADTAVYYCASLVYCGGDCYSGFDYWGQGLVTVS
 SGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINFL
 NWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDI
 ATYYCQQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP
 SPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY
 MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN
 QLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
 DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 PR (SEC. ID. NO. 60)

[0299] Clon 24C8 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTACAGCTGCAGGAATCTGGGCCCCGGACTTGTCAAGCCAAGTC
 AGACACTTTCTCTTACATGTACCGTGAGCGGCGGAAGTATAAGCAG
 TGGAGGCTTTTACTGGTCTTGGATACGGCAGCACCCAGGCAAAGGC
 TTGGAGTGGATTGGATACATTCATCATTAGGATCTACACACTATA
 ATCCATCCCTTAAGTCCCGGGTCACCATAGCATTGATACGTCTAAG
 AATCTGTTCAGTCTCAGGCTGTCCTCCGTCAGTCTGCCGACACAGC
 CGTGTACTACTGCGCCTCCTTGGTTTACTGCGGAGGCGACTGTTATA

GCGGCTTTGATTATTGGGGGCAGGGGACCCTCGTAACCGTGAGCTC
TGGAGGGGGTGGGAGCGGGGAGGAGGTTTCAGGGGGGGGCGGCTC
CGATATCCAGCTCACTCAAAGCCCCTCTAGTCTCTCTGCCTCAGTGG
GGGATCGGGTCAGTTTTACTTGTCAAGCTTCACAGGATATCAACAA
CTTCCTTAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGCTG
CTCATCTATGATGCCTCAAATTTGGAGACGGGTGTTCCCAGTCGATT
CTCTGGGTCAGGGTCCGGGACCGACTTTACGTTTACGATCTCCTCTC
TGCAGCCCGAAGACATCGCCACATACTATTGTCAACAGTACGGCAA
CTTGCCTTTCACATTTGGGGGCGGGACTAAGGTTGAAATCAAGAGG
GCCGCTGCACTGGACAATGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCCACG
TGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCTAGTCCTCTGTTCCCAGGCCCATC
CAAACCTTTTTGGGTTCTTGTTGTGGTCGGGGGGGTGCTGGCCTGCT
ATTCTCTGCTGGTCACGGTGGCCTTCATAATTTCTGGGTTAGATCC
AAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCAC
GCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACC
TAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCT
GCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAAC
GAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAG
CGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAA
AACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATG
GCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGG
GGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACG
AAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG
(SEC. ID. NO. 61)

[0300]

Clon 24C8 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGFYWSWIRQHPGKGLE
WIGYIHHSGSTHYNPSLKSRVTISIDTSKNLFSRLSSVTAADTAVYYCA
SLVYCGGDCYSGFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQ
SPSSLSASVGDRVSFTCQASQDINNFLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE
TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQYGNLPFTFGGGTKVE
IKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLA
CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 62)

[0301]Clon 24C8 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
 GCACGCCGCACGCCCCGAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGTCCGGG
 ACTTGTCAAGCCGTCCCAAACGCTGAGTCTGACGTGTACTGTCTCTG
 GTGGCTCTATTTCTTCCGGGGGCTTTTATTGGTCTTGGATCAGACAA
 CACCCTGGCAAAGGGCTGGAGTGGATAGGGTATATTCACCACTCTG
 GGTCCACTCACTACAACCCATCATTGAAATCCAGAGTGACTATCTC
 AATCGACACATCCAAGAACCTTTTCAGCCTGAGGTTGTCATCAGTT
 ACCGCCGCTGACACCGCGGTGTATTATTGCGCCTCTCTCGTGTACTG
 CGGTGGCGATTGTTATAGTGGCTTTGACTACTGGGGGCAGGGGACA
 TTGGTTACCGTTTCAAGTGGAGGCGGTGGGTCTGGCGGGGGCGGTA
 GCGGAGGTGGGGGGAGCGACATACAGCTTACGCAGAGCCCCCTCCA
 GCCTTTCAGCCTCCGTGGGGGATAGGGTGTCTTTACCTGCCAGGCT
 TCCCAGGACATAAACAACCTTCCTCAATTGGTATCAGCAAAAGCCCG
 GGAAAGCACCAAAGCTGCTCATCTACGATGCCAGCAACCTGGAAAC
 CGGAGTGCCGTCTCGCTTCTCTGGAAGTGGCAGTGGGACCGATTTC
 ACTTTTACAATCTCAAGTTTGCAGCCAGAAGACATTGCAACATACT
 ACTGTCAACAGTACGGCAATCTCCCCTTTACATTTGGGGGGGGAAC
 TAAAGTGGAGATTAAGCGCGCTGCAGCCATTGAAGTTATGTATCCG
 CCCCCGTATCTGGATAACGAGAAATCTAATGGTACCATAATACATG
 TGAAGGGGAAGCACCTCTGTCCATCACCGCTGTTCCCCGGCCCTTC
 AAAACCTTTCTGGGTACTCGTTGTCGTGGGTGGAGTTCTGGCCTGCT
 ATAGTCTGCTGGTGACCGTGGCGTTTATCATCTTCTGGGTAAGATCC
 AAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCAC
 GCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACC
 TAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCT
 GCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAAC
 GAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAG
 CGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAA
 AACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATG
 GCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGG
 GGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACG
 AAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGT
 AA (SEC. ID. NO. 63)

[0302]Clon 24C8 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSG
GSISSGGFYWSWIRQHHPGKGLEWIGYIHHSBSTHYNPSLKSRTISID
TSKNLFSRLSSVTAADTAVYYCASLVYCGGDCYSGFDYWGQGLVT
VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQ
DINNFLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTI
SSLQPEDIATYYCQQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDN
EKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA
FIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 64)

[0303]

Clon 24C8 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGTCCGGGACTTGTCAGCCGTCCTCC
AAACGCTGAGTCTGACGTGTACTGTCTCTGGTGGCTCTATTTCTTCC
GGGGGCTTTTATTGGTCTTGGATCAGACAACACCCTGGCAAAGGGC
TGGAGTGGATAGGGTATATTCACCACTCTGGGTCCACTCACTACAA
CCCATCATTGAAATCCAGAGTGACTATCTCAATCGACACATCCAAG
AACCTTTTCAGCCTGAGGTTGTCATCAGTTACCGCCGCTGACACCGC
GGTGTATTATTGCGCCTCTCTCGTGTACTGCGGTGGCGATTGTTATA
GTGGCTTTGACTACTGGGGGCAGGGGACATTGGTTACCGTTTCAAG
TGGAGGCGGTGGGTCTGGCGGGGGCGGTAGCGGAGGTGGGGGGAG
CGACATACAGCTTACGCAGAGCCCCCTCCAGCCTTTCAGCCTCCGTG
GGGGATAGGGTGTCTTTACCTGCCAGGCTTCCCAGGACATAAACA
ACTTCCTCAATTGGTATCAGCAAAAGCCCGGGAAAGCACCAAAGCT
GCTCATCTACGATGCCAGCAACCTGGAAACCGGAGTGCCGTCTCGC
TTCTCTGGAAGTGGCAGTGGGACCGATTTCACCTTTTACAATCTCAAG
TTTGCAGCCAGAAGACATTGCAACATACTACTGTCAACAGTACGGC
AATCTCCCCTTTACATTTGGGGGGGGGAATAAAGTGGAGATTAAGC
GCGCTGCAGCCATTGAAGTTATGTATCCGCCCCCGTATCTGGATAA
CGAGAAATCTAATGGTACCATAATACATGTGAAGGGGAAGCACCTC
TGTCCATCACCGCTGTTCCCCGGCCCTTCAAAACCTTTCTGGGTACT
CGTTGTCGTGGGTGGAGTTCTGGCCTGCTATAGTCTGCTGGTGACCG
TGCGGTTTATCATCTTCTGGGTAAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCT
CCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACA
AGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCT
ATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTA

TCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGC
 AGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCT
 GAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAGGAGGGTCTC
 TATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAA
 TAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGGCACGACGGTT
 TGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCT
 CCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID. NO. 65)

[0304]

Clon 24C8 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGFYWSWIRQHPGKGLE
 WIGYIHHSSTHYNPSLKSRTISIDTSKNLFSRLSSVTAADTAVYYCA
 SLVYCGGDCYSGFDYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQ
 SPSSLSASVGDRVSFTQCASQDINNFLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE
 TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQYGNLPFTFGGGTKVE
 IKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVL
 VVVGGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK
 HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
 YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
 GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEC. ID. NO. 66)

[0305]

Clon 24C8 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
 GCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGTTGCAGGAAAGCGGGCCTGG
 CCTTGTGAAACCAAGCCAGACACTGAGCCTGACATGCACTGTGTCC
 GGCGGGTCCATATCTTCCGGGGGTTTTTATTGGTCCTGGATACGCCA
 GCATCCCGGGAAAGGACTTGAATGGATTGGATATATCCACCATTC
 GGAAGCACCCACTACAATCCAAGCCTTAAATCCCGGGTGACAATCT
 CCATCGACACCTCAAAGAATCTTTTTTCCCTGCGGTTGTCTTCAGTA
 ACTGCCGCCGATACCGCTGTGTACTACTGTGCCAGCCTCGTCTATTG
 CGGCGGAGATTGTTATTCTGGGTTCGATTATTGGGGTCAAGGCACA
 CTGGTAACTGTCAGCAGCGGAGGCGGCGGTTCCGGGGGCGGGGGC
 AGTGGAGGGGGCGGATCTGACATTCAGCTTACGCAGTCCCCATCTT
 CACTTAGCGCCAGCGTTGGCGATCGGGTCAGCTTCACGTGTCAAGC
 AAGTCAGGATATCAACAACCTTTCTTAACTGGTACCAGCAGAAGCCA
 GGCAAGGCACCCAAGTTGCTGATTTACGATGCTTCTAACCTCGAGA
 CGGGAGTGCCTAGCCGCTTCTCCGGGAGCGGCAGCGGCACAGACTT
 TACCTTTACGATTTCCAGTCTGCAGCCAGAGGATATAGCAACTTATT

ACTGTCAGCAGTATGGCAACCTCCCTTTTACCTTCGGTGGTGGCACA
AAGGTCGAGATTAAAAGAGCCGCAGCGTTGTCCAACTCCATAATGT
ATTTTTCTCATTTTGTGCCCCGTCTTTCTGCCTGCCAAACCTACCACCA
CCCCCGCCCCACGACCACCTACTCCAGCCCCCACCATCGCCTCCCA
GCCCCCTCAGCCTGAGGCCAGAGGCTTGTCGCCCTGCTGCGGGGGGC
GCTGTCCATACCAGAGGACTCGACTTCGCCTGCGATATTTATATATG
GGCCCCCCTCGCCGGCACCTGCGGAGTCTTGCTCCTGAGCCTTGTGA
TCACGCTTTATTGTAACCATCGGAATAGATCCAAAAGAAGCCGCCT
GCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCC
ACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTG
CCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGC
GTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGA
CGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGAC
CCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGT
CTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTG
AAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGAC
GGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACG
CTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 67)

[0306] Clon 24C8 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSG
GSISSGGFYWSWIRQHPGKGLEWIGYIHHSGSTHYNPSLKS
RVTISIDTS
KNLFSRLSSVTAADTAVYYCASLVYCGGDCYSGFDYWQGT
LVTVS
SGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVSFTCQASQ
DINNFL
NWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPRFSGSGSGTDFTF
TISLQPED
IATYYCQYGNLPFTFGGGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFV
PVFLPAKPTT
TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD
FACDIYIWAPL
AGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRR
PGPTRKHY
QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGE
RRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 68)

[0307] Clon 24C8 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTGCAGTTGCAGGAAAGCGGGCCTGGCCTTGTGAAACCAAGCC
AGACACTGAGCCTGACATGCACTGTGTCCGGCGGGTCCATATCTTC
CGGGGGTTTTTATTGGTCCTGGATACGCCAGCATCCCGGGAAAGGA

CTTGAATGGATTGGATATATCCACCATTCCGGAAGCACCCACTACA
ATCCAAGCCTTAAATCCCGGGTGACAATCTCCATCGACACCTCAA
GAATCTTTTTTCCCTGCGGTTGTCTTCAGTAACTGCCGCCGATACCG
CTGTGTACTACTGTGCCAGCCTCGTCTATTGCGGCGGAGATTGTTAT
TCTGGGTTTCGATTATTGGGGTCAAGGCACACTGGTAACTGTCAGCA
GCGGAGGCGGCGGTTCCGGGGGCGGGGGCAGTGGAGGGGGCGGAT
CTGACATTCAGCTTACGCAGTCCCCATCTTCACTTAGCGCCAGCGTT
GGCGATCGGGTCAGCTTCACGTGTCAAGCAAGTCAGGATATCAACA
ACTTTCTTAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCACCCAAGTT
GCTGATTTACGATGCTTCTAACCTCGAGACGGGAGTGCCTAGCCGC
TTCTCCGGGAGCGGCAGCGGCACAGACTTTACCTTTACGATTTCCA
GTCTGCAGCCAGAGGATATAGCAACTTATTACTGTCAGCAGTATGG
CAACCTCCCTTTTACCTTCGGTGGTGGCACAAGGTCGAGATTAAA
AGAGCCGCAGCGTTGTCCAACTCCATAATGTATTTTTCTCATTTTGT
GCCCGTCTTTCTGCCTGCCAAACCTACCACCACCCCCGCCCCACGAC
CACCTACTCCAGCCCCCACCATCGCCTCCCAGCCCCCTCAGCCTGAG
GCCAGAGGCTTGTCGCCCTGCTGCGGGGGGCGCTGTCCATACCAGA
GGACTCGACTTCGCCTGCGATATTTATATATGGGCCCCCCTCGCCGG
CACCTGCGGAGTCTTGCTCCTGAGCCTTGTGATCACGCTTTATTGTA
ACCATCGGAATAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTA
CATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTAC
CAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGG
TGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCA
GAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTA
TGACGTTTTTGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGG
CAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCT
GCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAA
AGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGG
ACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAA
GCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID. NO. 69)

[0308] Clon 24C8 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGISISSGGFYWSWIRQHPGKGLE
WIGYIHHSNSTHYNPSLKSRTVISIDTSKNLFSRLSSVTAADTAVYYCA
SLVYCGGDCYSGFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQ
SPSSLSASVGDVRSFTCQASQDINNFLNWDYQQKPGKAPKLLIYDASNLE
TGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSSLQPEDATYYCQQYGNLPFTFGGGTKVE

IKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA
TKDTYDALHM QALPPR (SEC. ID. NO. 70)

[0309] Clon 20C5.1 HC ADN

CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAAACCAGGT
GCCTCCGTTAAAGTGAGTTGCAAAGTCTCTGGATACACTCTGACCG
AGCTCTCTATGCACTGGGTCCGGCAGGCCCCCGGCAAGGGATTGGA
ATGGATGGGCGGGTTCGATCCTGAGGACGGAGAGACTATCTACGCT
CAAAAATTCCAGGGACGAGTGACTGTGACCGAAGACACTAGTACC
GACACTGCCTACATGGAACCTTCCTCTCTGCGATCAGAAGATACCG
CAGTGTACTACTGTGCTACTGAATCTAGGGGCATTGGATGGCCCTA
CTTCGATTACTGGGGTCAGGGAACCTCTGGTGACTGTCTCCAGC (SEC.
ID. NO. 71)

[0310] Clon 20C5.1 AA HC (CDR en Subrayado)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTEL^{SMHWVRQAPGKGLE}
WMGGFD^{PEDGE}ETIYAQKFQGRVTVTEDTSTD^{TAYMELSSLRSEDTAV}
YYCATE^{SRGIGWPYFDY}WGQGLTVTVSS (SEC. ID. NO. 72)

[0311] Clon 20C5.1 HC AA CDR1: GYTLTEL (SEC. ID. NO. 73)

[0312] Clon 20C5.1 HC AA CDR2: DPEDGE (SEC. ID. NO. 74)

[0313] Clon 20C5.1 HC AA CDR3: ESRGIGWPYFDY (SEC. ID. NO. 75)

[0314] Clon 20C5.1 LC ADN

GATATTCAGATGACTCAATCTCCTTCTTCTCTGTCCGCTTCCGTGGG
CGATAGAGTGACCATTACTTGTAGGGCGTCCCAGTCAATCTCCAGT
TATTTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCCGGGAAAGCACCTAAGCTGT
TGATCAGCGGGGCTTCTAGCCTGAAGAGTGGGGTACCTTCACGGTT
CAGCGGAAGCGGAAGCGGAACCGATTTCACCCTGACTATCAGCAGC
CTGCCACCTGAGGACTTTGCAACTTACTACTGCCAACAGTCATACA

GCACTCCGATCACTTTCGGCCAGGGCACCCGGCTCGAAATCAAGCG
C (SEC. ID. NO. 76)

[0315] Clon 20C5.1 AA LC (CDR en Subrayado)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIS
GASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPPEDFATYYCQQSYSTPITFGQ
GTRLEIKR (SEC. ID. NO. 77)

[0316] Clon 20C5.1 AA LC CDR1: RASQSISSYLN (SEC. ID. NO. 78)

[0317] Clon 20C5.1 AA LC CDR2: GASSLKS (SEC. ID. NO. 79)

[0318] Clon 20C5.1 AA LC CDR3: QQSYSTPIT (SEC. ID. NO. 80)

[0319] Clon 20C5.1 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCGCAGGTCCAAGTGGTGCAGTCCGGAGCCGAA
GTCAAGAAACCAGGTGCCTCCGTTAAAGTGAGTTGCAAAGTCTCTG
GATACTCTGACCGAGCTCTCTATGCACTGGGTCCGGCAGGCCCC
CGGCAAGGGATTGGAATGGATGGGCGGGTTCGATCCTGAGGACGG
AGAGACTATCTACGCTCAAAAATTCCAGGGACGAGTGAAGTGTGACC
GAAGACACTAGTACCGACACTGCCTACATGGAAGTTTCCTCTCTGC
GATCAGAAGATAACCGCAGTGTACTACTGTGCTACTGAATCTAGGGG
CATTGGATGGCCCTACTTCGATTACTGGGGTCAGGGAAGTCTGGTG
ACTGTCTCCAGCGGTGGAGGTGGCAGCGGTGGTGGCGGAAGCGGG
GGGGGCGGCTCTGATATTCAGATGACTCAATCTCCTTCTTCTCTGTC
CGCTTCCGTGGGCGATAGAGTGACCATTACTTGTAGGGCGTCCCAG
TCAATCTCCAGTTATTTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCCGGGAAAG
CACCTAAGCTGTTGATCAGCGGGGCTTCTAGCCTGAAGAGTGGGGT
ACCTTCACGGTTCAGCGGAAGCGGAAGCGGAACCGATTTCACCCTG
ACTATCAGCAGCCTGCCACCTGAGGACTTTGCAACTTACTACTGCC
AACAGTCATACAGCACTCCGATCACTTTCGGCCAGGGCACCCGGCT
CGAAATCAAGCGCGCTGCTGCTTTGGACAATGAGAAGTCAAACGGC
ACCATCATACATGTTAAAGGTAAACATCTGTGTCCCTCCCCGCTGTT
CCCCGGCCCTTCCAAACCGTTCTGGGTTCTGGTGGTGGTCGGAGGC
GTACTCGCTTGCTATAGTCTGCTGGTAACTGTGCGCTTCATCATCTT
TTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATG

AATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGC
CTTACGCACCACCTAGAGATTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAA
GTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAAC
CAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGAC
GTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAA
CCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAG
AAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGA
GAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTC
AGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCC
TGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 81)

[0320] Clon 20C5.1 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)
MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKVSGYTL
TELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVTEDTST
DTAYMELSSLRSEDNAVYYCATESRGIGWPYFDYWQGTLVTVSSGG
GGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWY
QQKPGKAPKLLISGASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLPPEDFATY
YCQQSYSTPITFGQGRLEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLP
GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMN
TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
(SEC. ID. NO. 82)

[0321] Clon 20C5.1 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAAACCAGGT
GCCTCCGTAAAGTGAGTTGCAAAGTCTCTGGATACACTCTGACCG
AGCTCTCTATGCACTGGGTCCGGCAGGCCCCCGGCAAGGGATTGGA
ATGGATGGGCGGGTTCGATCCTGAGGACGGAGAGACTATCTACGCT
CAAAAATTCCAGGGACGAGTGACTGTGACCGAAGACACTAGTACC
GAACTGCCTACATGGAACCTTCCTCTCTGCGATCAGAAGATACCG
CAGTGTACTACTGTGCTACTGAATCTAGGGGCATTGGATGGCCCTA
CTTCGATTACTGGGGTCAGGGAACCTCTGGTGACTGTCTCCAGCGGT
GGAGGTGGCAGCGGTGGTGGCGGAAGCGGGGGGGCGGCTCTGAT
ATTCAGATGACTCAATCTCCTTCTCTGTCCGCTTCCGTGGGCGA

TAGAGTGACCATTACTTGTAGGGCGTCCCAGTCAATCTCCAGTTATT
TGAATTGGTATCAGCAGAAGCCCGGGAAAGCACCTAAGCTGTTGAT
CAGCGGGGCTTCTAGCCTGAAGAGTGGGGTACCTTCACGGTTCAGC
GGAAGCGGAAGCGGAACCGATTTACCCTGACTATCAGCAGCCTGC
CACCTGAGGACTTTGCAACTTACTACTGCCAACAGTCATACAGCAC
TCCGATCACTTTCGGCCAGGGCACCCGGCTCGAAATCAAGCGCGCT
GCTGCTTTGGACAATGAGAAGTCAAACGGCACCATCATACATGTTA
AAGGTAAACATCTGTGTCCCTCCCCGCTGTTCCCCGGCCCTTCCAAA
CCGTTCTGGGTTCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTACTCGCTTGCTATAG
TCTGCTGGTAACTGTCGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAGATCCAAAA
GAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCG
CCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGA
GATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAG
ATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCT
CAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTTGGACAAGCGCAG
AGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCC
CCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGA
AGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAA
AGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGAT
ACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID.
NO. 83)

[0322] Clon 20C5.1 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE
WMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVTEDTSTDТАYMESSLRSEDТАV
YYCATESRGIGWPYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM
TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLISGASSL
KSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLE
IKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFVVLVVVGGVLA
CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 84)

[0323] Clon 20C5.1 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGCTTGTGCAGAGCGGGGCCGA

GGTGAAGAAGCCCGGGGCCAGCGTCAAAGTGTCTGTAAAGGTCAG
CGGTTACACCCTCACCGAGCTGAGCATGCACTGGGTACGGCAGGCT
CCCGGCCAAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGGATTTGATCCAGAAGATG
GAGAGACTATCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCCGGGTACCGTAAC
AGAAGACACCTCAACTGACACCGCTTACATGGAGCTGAGTTCCTG
CGGTCCGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCCACCGAGAGCCGCG
GAATCGGATGGCCTTACTTCGACTACTGGGGACAGGGTACACTTGT
TACAGTATCATCCGGGGGTGGCGGCTCTGGTGGGGGCGGCTCCGGA
GGGGGTGGATCAGATATCCAAATGACTCAAAGTCCAAGTTCCCTGT
CTGCCTCAGTCGGAGATAGAGTCACCATAACCTGCAGGGCAAGTCA
GTCCATCTCCTCCTATCTGAACTGGTACCAACAGAAACCTGGAAAG
GCGCCTAAGCTCCTGATCTCCGGAGCCTCATCTTTGAAATCCGGTGT
CCCATCTCGCTTCAGTGGCTCTGGAAGCGGTACAGATTTTACTTTGA
CCATTAGCAGCCTCCCACCGGAAGACTTTGCTACATATTACTGCCA
GCAGTCTTACTCAACCCCAATCACCTTCGGGCAAGGCACCAGACTC
GAAATAAAAAGAGCAGCTGCTATCGAGGTTATGTACCCACCGCCGT
ACTTGGATAACGAAAAAAGCAATGGGACCATCATTCATGTGAAGG
GTAAGCACCTTTGCCCTAGCCCCTGTTTCCTGGCCCGAGTAAACCC
TTTTGGGTACTTGTGGTCGTCGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACTCACT
CCTGGTTACCGTCGCATTCATCATCTTTTGGGTGAGATCCAAAAGAA
GCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCC
TGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGAT
TTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATG
CACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAA
CCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGG
ACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCA
GGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGC
CTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGG
GCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACT
TATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID.
NO. 85)

[0324] Clon 20C5.1 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVS
GYTLTELSMHWRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVT
EDTSTDTAYMELSSLRSEDNAVYYCATESRGIGWPYFDYWGGTLVT

VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISS
YLNWYQQKPGKAPKLLISGASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPPE
DFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTII
HVKGKHLCPSPLEPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRS
KRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST
ATKDTYDALH MQALPPR (SEC. ID. NO. 86)

[0325] Clon 20C5.1 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTGCAGCTTGTGCAGAGCGGGGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGG
GCCAGCGTCAAAGTGTCTGTAAAGTCAGCGGTACACCCTCACCG
AGCTGAGCATGCACTGGGTACGGCAGGCTCCCGGCAAAGGTCTTGA
GTGGATGGGTGGATTTGATCCAGAAGATGGAGAGACTATCTACGCC
CAGAAGTTCCAGGGCCGGGTACCGTAACAGAAGACACCTCAACTG
ACACCGCTTACATGGAGCTGAGTTCCTGCGGTCCGAGGACACGGC
CGTGTATTATTGTGCCACCGAGAGCCGCGGAATCGGATGGCCTTAC
TTCGACTACTGGGGACAGGGTACACTTGTTACAGTATCATCCGGGG
GTGGCGGCTCTGGTGGGGGCGGCTCCGGAGGGGGTGGATCAGATAT
CCAAATGACTCAAAGTCCAAGTTCCTGTCTGCCTCAGTCGGAGAT
AGAGTCACCATAACCTGCAGGGCAAGTCAGTCCATCTCCTCCTATC
TGAAGTGGTACCAACAGAAACCTGGAAAGGCGCCTAAGCTCCTGAT
CTCCGGAGCCTCATCTTTGAAATCCGGTGTCCCATCTCGCTTCAGTG
GCTCTGGAAGCGGTACAGATTTTACTTTGACCATTAGCAGCCTCCCA
CCGGAAGACTTTGCTACATATTACTGCCAGCAGTCTTACTCAACCCC
AATCACCTTCGGGCAAGGCACCAGACTCGAAATAAAAAGAGCAGC
TGCTATCGAGGTTATGTACCCACCGCCGTAAGTGGATAACGAAAAA
AGCAATGGGACCATCATTCATGTGAAGGGTAAGCACCTTTGCCCTA
GCCCACTGTTTCCTGGCCCGAGTAAACCCTTTTGGGTACTTGTGGTC
GTCGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACTCACTCCTGGTTACCGTCGCATT
CATCATCTTTTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGC
GATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAAC
ACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAG
CAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAG
GGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAA
GAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATG
GGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAAT

GAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGC
 ATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTAC
 CAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACA
 TGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID. NO. 87)

[0326] Clon 20C5.1 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE
 WMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVTEDTSTDYAYMELSSLRSEDYAV
 YYCATESRGIGWPYFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM
 TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLISGASSL
 KSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLPPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLE
 IKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVL
 VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK
 HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
 YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
 GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR (SEC. ID. NO.
 88)

[0327] Clon 20C5.1 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
 GCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGTTGGTGCAAAGCGGCGCAGA
 AGTTAAGAAACCTGGGGCGTCAGTTAAGGTGTCTTGCAAAGTATCT
 GGCTATACCCTCACTGAGCTGTCCATGCATTGGGTAAGGCAGGCTC
 CTGGAAAGGGGCTCGAATGGATGGGAGGATTTGACCCTGAAGACG
 GAGAGACCATCTACGCCAGAAATTCCAGGGTAGAGTAACAGTGA
 CTGAGGACACTAGCACTGACACAGCGTACATGGAGCTGAGTTCTCT
 GAGAAGTGAGGACACAGCCGTTTACTACTGCGCTACCGAGTCCAGA
 GGTATTGGCTGGCCATACTTCGACTATTGGGGTCAGGGCACCTGG
 TTACAGTGAGTTCAGGAGGCGGGGGCTCTGGGGGGGGCGGTTCCGG
 AGGGGGGGGCTCAGATATACAGATGACGCAGAGTCCATCAAGTCTC
 TCAGCCAGCGTGGGAGATCGCGTGACTATTACTTGCCGCGCCAGCC
 AGAGTATTAGCTCCTATCTGAATTGGTACCAGCAAAAGCCCGGGAA
 GGCCCTAAGCTTCTGATTTCTGGCGCCTCCTCTTTGAAGTCAGGTG
 TGCCAAGCAGATTTAGCGGGTCTGGAAGTGGCACTGACTTTACACT
 TACTATCTCCAGCCTGCCCCAGAGGATTTTGCCACATATTACTGTC
 AGCAAAGCTACTCTACTCCAATCACTTTCGGCCAGGGCACAAGATT
 GGAGATTAAGAGGGCTGCCGCACTTTCAAATTCCATCATGTATTTC

AGCCATTTTGTGCCTGTTTTCTTCCGGCCAAACCTACAACCACTCC
 CGCCCCACGCCCACCTACTCCCGCCCCTACCATTGCCTCCCAGCCTC
 TGTCTCTTAGACCTGAGGCTTGTAGACCTGCTGCCGGCGGAGCCGT
 GCACACTCGCGGTCTGGACTTCGCCTGCGACATCTATATCTGGGCCC
 CTCTGGCCGGCACCTGCGGCGTTCTCCTTCTCTCACTCGTAATCACA
 CTCTATTGCAATCACAGGAACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCC
 ATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAG
 GAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTAT
 CGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATC
 AGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCA
 GGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTG
 AGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCT
 ATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
 AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTT
 GTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTC
 CACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 89)

[0328]

Clon 20C5.1 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVS
 GYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVT
 EDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATESRGIGWPYFDYWGGTLVT
 VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISS
 YLNWYQQKPGKAPKLLISGASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLPPE
 DFATYYCQQSYSTPITFGQGTRLEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKP
 TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
 PLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK
 HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
 YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
 GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 90)

[0329]

Clon 20C5.1 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTGCAGTTGGTGCAAAGCGGCGCAGAAAGTTAAGAAACCTGGG
 GCGTCAGTTAAGGTGTCTTGCAAAGTATCTGGCTATACCCTCACTGA
 GCTGTCCATGCATTGGGTAAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGGCTCGAA
 TGGATGGGAGGATTTGACCCTGAAGACGGAGAGACCATCTACGCCC
 AGAAATTCCAGGGTAGAGTAACAGTGACTGAGGACACTAGCACTG

ACACAGCGTACATGGAGCTGAGTTCTCTGAGAAGTGAGGACACAGC
 CGTTTACTACTGCGCTACCGAGTCCAGAGGTATTGGCTGGCCATACT
 TCGACTATTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTTACAGTGAGTTCAGGAGG
 CGGGGGCTCTGGGGGGGGCGGTTCCGGAGGGGGGGGCTCAGATAT
 ACAGATGACGCAGAGTCCATCAAGTCTCTCAGCCAGCGTGGGAGAT
 CGCGTGACTATTACTTGCCGCGCCAGCCAGAGTATTAGCTCCTATCT
 GAATTGGTACCAGCAAAAGCCCCGGGAAGGCCCTAAGCTTCTGATT
 TCTGGCGCCTCCTCTTTGAAGTCAGGTGTGCCAAGCAGATTTAGCG
 GGTCTGGAAGTGGCACTGACTTTACACTTACTATCTCCAGCCTGCCC
 CCAGAGGATTTTGCCACATATTACTGTCAGCAAAGCTACTCTACTCC
 AATCACTTTCGGCCAGGGCACAAGATTGGAGATTAAGAGGGCTGCC
 GCACTTTCAAATTCCATCATGTATTTTCAGCCATTTTGTGCCTGTTTTT
 CTTCCGGCCAAACCTACAACCACTCCCGCCCCACGCCCACCTACTCC
 CGCCCCCTACCATTGCCTCCCAGCCTCTGTCTCTTAGACCTGAGGCTT
 GTAGACCTGCTGCCGGCGGAGCCGTGCACACTCGCGGTCTGGACTT
 CGCCTGCGACATCTATATCTGGGCCCCCTCTGGCCGGCACCTGCGGC
 GTTCTCCTTCTCTCACTCGTAATCACACTCTATTGCAATCACAGGAA
 CAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATG
 ACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACG
 CACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTC
 CAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTG
 TATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGG
 ACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGAC
 GAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATA
 AGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGA
 GAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTG
 CTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACC
 TAGG (SEC. ID. NO. 91)

[0330]

Clon 20C5.1 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLE
 WMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTVTEDTSTDATYMESSLRSEDTAV
 YYCATESRGIGWPYFDYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM
 TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLISGASSL
 KSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLPPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGRLE
 IKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
 ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRS
ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD
TYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 92)

[0331] Clon 20C5.2 HC ADN

CAGGTCCAGTTGGTCGAAAGTGGCGGTGGTGTAGTGCAGCCGGGCC
GCAGTTTGAGGCTTTCCTGTGCGGCTTCAGGCTTTACTTTTTCCAGC
TATGGAATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCGGCAAAGGACTTGAGT
GGGTGGCCGTCATTTCTTATGACGGATCAGATAAGTACTACGTGGA
CAGCGTCAAGGGCAGATTCACCATCTCTAGGGACAACAGTAAAAAT
AGACTCTACCTCCAGATGAATAGCCTCAGAGCTGAAGACACGGCCG
TCTACTATTGTGCTCGGGAGCGGTATAGTGGCAGAGACTACTGGGG
GCAGGGCACACTCGTTACAGTGAGTAGC (SEC. ID. NO. 93)

[0332] Clon 20C5.2 AA HC (CDR en Subrayado)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVISYDGSDKYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERYSGRDYWGQGLTVTVSS (SEC. ID. NO. 94)

[0333] Clon 20C5.2 HC AA CDR1: GFTFSSY (SEC. ID. NO. 95)

[0334] Clon 20C5.2 HC AA CDR2: SYDGSD (SEC. ID. NO. 96)

[0335] Clon 20C5.2 HC AA CDR3: ERYSGRDY (SEC. ID. NO. 97)

[0336] Clon 20C5.2 LC ADN

GAGATTGTTATGACCCAGAGTCCTGCGACCCTCTCAGTCAGCCCCG
GGGAGCGCGCAACTTTGTCTTGCAGAGCTAGTCAGTCCGTGTCCTCT
CTTCTGACATGGTACCAGCAAAAGCCCCGGGCAGGCTCCGCGCCTTT
TGATCTTTGGGGCTTCAACAAGAGCCACTGGGATTCCCGCACGATT
CTCTGGCTCCGGGAGCGGTACTGGTTTCACCCTGACGATTAGCAGT
CTCCAGAGCGAGGACTTCGCCGTATACTACTGCCAGCAGTACGATA
CGTGGCCATTCACTTTTGGACCAGGGACTAAAGTGGATTTTAAGCG
C (SEC. ID. NO. 98)

[0337] Clon 20C5.2 AA LC (CDR en Subrayado)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIF
GASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDTWPFTF
GPGTKVDFKR (SEC. ID. NO. 99)

[0338] Clon 20C5.2 AA LC CDR1: RASQSVSSLLT (SEC. ID. NO. 100)

[0339] Clon 20C5.2 AA LC CDR2: GASTRAT (SEC. ID. NO. 101)

[0340] Clon 20C5.2 AA LC CDR3: QQYDTWPFT (SEC. ID. NO. 102)

[0341] Clon 20C5.2 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCGCAGGTCCAGTTGGTCGAAAGTGGCGGTGGT
GTAGTGCAGCCGGGCCGCAGTTTGAGGCTTTCCTGTGCGGCTTCAG
GCTTTACTTTTTCCAGCTATGGAATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCC
GGCAAAGGACTTGAGTGGGTGGCCGTCATTTCTTATGACGGATCAG
ATAAGTACTACGTGGACAGCGTCAAGGGCAGATTCACCATCTCTAG
GGACAACAGTAAAAATAGACTCTACCTCCAGATGAATAGCCTCAGA
GCTGAAGACACGGCCGTCTACTATTGTGCTCGGGAGCGGTATAGTG
GCAGAGACTACTGGGGGCAGGGCACACTCGTTACAGTGAGTAGCG
GCGGAGGAGGGAGTGGGGGCGGTGGCTCCGGTGGAGGAGGTTCTG
AGATTGTTATGACCCAGAGTCCTGCGACCCTCTCAGTCAGCCCCGG
GGAGCGCGCAACTTTGTCTTGCAGAGCTAGTCAGTCCGTGTCCTCTC
TTCTGACATGGTACCAGCAAAAGCCCGGGCAGGCTCCGCGCCTTTT
GATCTTTGGGGCTTCAACAAGAGCCACTGGGATTCCCGCACGATTC
TCTGGCTCCGGGAGCGGTACTGGTTTCACCCTGACGATTAGCAGTCT
CCAGAGCGAGGACTTCGCCGTATACTACTGCCAGCAGTACGATACG
TGGCCATTCACTTTTGGACCAGGGACTAAAGTGGATTTTAAGCGCG
CCGCCGCTCTCGATAACGAAAAGTCAAATGGCACCATAATCCACGT
CAAAGGCAAGCACCTGTGCCCTTCCCCGCTCTTCCCCGGACCCAGT
AAACCATTTTGGGTGCTGGTTGTTGTGGGGGGCGTGCTGGCCTGCT
ATAGCCTTTTGGTCACTGTAGCCTTCATTATTTTTTGGGTCAGATCC
AAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCAC
GCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACC
TAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCT
GCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAAC
GAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAG

CGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAA
AACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATG
GCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGG
GGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACG
AAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGT
AA (SEC. ID. NO. 103)

[0342] Clon 20C5.2 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)
MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS
GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKYYVDSVKGRFTISR
DNSKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGQGLTVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLT
WYQQKPGQAPRLLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTISSLQSEDF
VYYCQQYDTWPFTFGPGTKVDFKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP
SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY
MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR (SEC. ID. NO. 104)

[0343] Clon 20C5.2 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTCCAGTTGGTCGAAAGTGGCGGTGGTGTAGTGCAGCCGGGCC
GCAGTTTGAGGCTTTCCTGTGCGGCTTCAGGCTTTACTTTTTCCAGC
TATGGAATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCGGCAAAGGACTTGAGT
GGGTGGCCGTCATTTCTTATGACGGATCAGATAAGTACTACGTGGA
CAGCGTCAAGGGCAGATTCACCATCTCTAGGGACAACAGTAAAAAT
AGACTCTACCTCCAGATGAATAGCCTCAGAGCTGAAGACACGGCCG
TCTACTATTGTGCTCGGGAGCGGTATAGTGGCAGAGACTACTGGGG
GCAGGGCACACTCGTTACAGTGAGTAGCGGCGGAGGAGGGAGTGG
GGGCGGTGGCTCCGGTGGAGGAGGTTCTGAGATTGTTATGACCCAG
AGTCCTGCGACCCTCTCAGTCAGCCCCGGGGAGCGCGCAACTTTGT
CTTGCAGAGCTAGTCAGTCCGTGTCCTCTCTTCTGACATGGTACCAG
CAAAAGCCCCGGGCAGGCTCCGCGCCTTTTGATCTTTGGGGCTTCAA
CAAGAGCCACTGGGATTCCCGCACGATTCTCTGGCTCCGGGAGCGG
TACTGGTTTCACCCTGACGATTAGCAGTCTCCAGAGCGAGGACTTC
GCCGTATACTACTGCCAGCAGTACGATACGTGGCCATTCACTTTTGG

ACCAGGGACTAAAGTGGATTTTAAGCGCGCCGCCGCTCTCGATAAC
 GAAAAGTCAAATGGCACCATAATCCACGTCAAAGGCAAGCACCTGT
 GCCCTTCCCCGCTCTTCCCCGGACCCAGTAAACCATTTTGGGTGCTG
 GTTGTGTGGGGGGCGTGCTGGCCTGCTATAGCCTTTTGGTCACTGT
 AGCCTTCATTATTTTTTGGGTCAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCC
 ATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAG
 GAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTAT
 CGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATC
 AGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCA
 GGGGAAGAGTATGACGTTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTG
 AGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCT
 ATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
 AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTT
 GTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTC
 CACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID. NO. 105)

[0344] Clon 20C5.2 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
 WVAVISYDGSDKYYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARERYSGRDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSP
 ATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIFGASTRATG
 IPARFSGSGGTGFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDTWPFTFGPGTKVDF
 KRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLAC
 YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR
 DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
 RDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 106)

[0345] Clon 20C5.2 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
 GCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGCGGCGGC
 GTGGTCCAGCCCGGCCGGTCCCTGCGCCTGTCCTGCGCCGCCAGCG
 GGTTTACTTTTTCCTCCTACGGCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCC
 GGCAAGGGCCTCGAGTGGGTGCGCGTGATCTCATAACGATGGGTGAG
 ACAATACTATGTCGATTCTGTAAAGGGCGGTTTACCATTTCAG
 AGATAACTCTAAGAATAGGCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGG
 GCTGAAGATAACCGCAGTGTACTATTGCGCTAGGGAGCGGTATAGTG

GCCGCGATTACTGGGGACAGGGTACACTGGTGACCGTGAGCTCTGG
GGGTGGCGGAAGCGGGGGTGGCGGAAGCGGCGGAGGGGGTAGTGA
AATTGTGATGACCCAGTCTCCGGCTACACTTTCAGTCTCCCCTGGGG
AGAGAGCTACACTGTCATGCAGAGCGTCCCAGTCCGTCTCTTCTCTC
CTTACCTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCCAGGCTCCTCGACTGCTGA
TCTTCGGTGCCTCCACAAGGGCGACCGGGATTCCAGCCCGCTTCTC
AGGTTCTGGGAGCGGAACCTGGTTTCACTTTGACAATCAGTTCACTG
CAGTCAGAGGATTTGCGCCGTGTACTACTGCCAGCAATACGACACAT
GGCCATTCACTTTCGGACCCGGTACCAAAGTCGATTTCAAGAGAGC
CGCGGCCATCGAGGTTATGTACCCACCACCATATCTGGACAATGAA
AAAAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAGGGTAAACACCTCTGCC
CTAGCCCCTTTTCCCTGGCCCATCAAAGCCCTTCTGGGTCTTGGTG
GTCGTGGGGGGTGTGCTGGCCTGTTACAGCCTTCTGGTGACGGTTG
CTTTCATTATCTTCTGGGTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCAT
AGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGA
AACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCG
GAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAG
CAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGG
GAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAG
ATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTAT
AATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAG
GCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGT
ACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCA
CATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 107)

[0346] Clon 20C5.2 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS
GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKYYVDSVKGRFTISR
DNSKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGQGLVTVSSG
GGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLT
WYQQKPGQAPRLLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTISLQSEDF
VYYCQQYDTWPFTFGPGTKVDFKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIH
VKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK
RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ

EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 108)

[0347] Clon 20C5.2 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGCGGCGGCGTGGTCCAGCCCCGGCC
GGTCCCTGCGCCTGTCCTGCGCCGCCAGCGGGTTTACTTTTTCTCC
TACGGCATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCCGGCAAGGGCCTCGAGT
GGGTCGCCGTGATCTCATA CGATGGGTCAGACAAATACTATGTCTGA
TTCTGTAAAGGGCGGTTTACCATTTC AAGAGATAACTCTAAGAAT
AGGCTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAAGATACCGCAG
TGTA CTATTGCGCTAGGGAGCGGTATAGTGGCCGCGATTACTGGGG
ACAGGGTACACTGGTGACCGTGAGCTCTGGGGGTGGCGGAAGCGG
GGGTGGCGGAAGCGGCGGAGGGGGTAGTGAAATTGTGATGACCCA
GTCTCCGGCTACACTTTCAGTCTCCCCTGGGGAGAGAGCTACACTGT
CATGCAGAGCGTCCCAGTCCGTCTCTTCTCTCCTTACCTGGTATCAG
CAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTCGACTGCTGATCTTCGGTGCCTCCA
CAAGGGCGACCGGGATTCCAGCCCGCTTCTCAGGTTCTGGGAGCGG
AACTGGTTTCACTTTGACAATCAGTTC ACTGCAGTCAGAGGATTTCCG
CCGTGTACTACTGCCAGCAATACGACACATGGCCATTCACTTTCCG
ACCCGGTACCAAAGTCGATTTCAAGAGAGCCGCGGCCATCGAGGTT
ATGTACCCACCACCATATCTGGACAATGAAAAAGCAATGGAACCA
TTATCCATGTGAAGGGTAAACACCTCTGCCCTAGCCCAC TTTTCCCT
GGCCCATCAAAGCCCTTCTGGGTCTTGGTGGTCGTGGGGGGTGTGC
TGGCCTGTTACAGCCTTCTGGTGACGGTTGCTTTCATTATCTTCTGG
GTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATA
TGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTA
CGCACCACTAGAGATTTCTGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTT
TCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAAC
TGATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTT
GGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAG
ACGAAAAAACCCCAAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGA
TAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCG
GAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCAC
TGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCA
CCTAGG (SEC. ID. NO. 109)

[0348] Clon 20C5.2 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVISYDGSDKYYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERYSGRDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSP
ATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIFGASTRATG
IPARFSGSGSGTGFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDTWPFTFGPGTKVDF
KRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLV
VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 110)

[0349] Clon 20C5.2 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCGCAGGTGCAGTTGGTTGAATCAGGAGGGGGT
GTGGTGCAACCCGGTCGGTCACTGCGCCTCAGTTGTGCTGCTTCCGG
GTTTACTTTCAGCTCATATGGGATGCACTGGGTACGGCAGGCTCCA
GGTAAAGGCTTGGAATGGGTGGCGGTGATCAGCTATGACGGCTCTG
ACAAATATTATGTGGACTCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCAGTCG
AGACAACTCAAAGAATAGACTCTACTTGCAGATGAATAGCCTCCGG
GCCGAAGATACTGCAGTCTATTATTGCGCCCGGGAGCGCTACAGTG
GAAGAGACTATTGGGGGCAAGGAACTCTTGTCACAGTCTCATCTGG
CGGCGGCGGCAGCGGTGGGGGCGGATCTGGCGGGGGCGGCAGCGA
AATCGTTATGACTCAGAGTCCTGCCACACTGAGCGTTAGCCCTGGT
GAGAGAGCAACACTTAGCTGCAGAGCTAGTCAGAGTGTTTCCAGTC
TTTTGACATGGTACCAACAGAAGCCCGGTCAAGCTCCACGACTGCT
CATCTTCGGTGCATCCACCCGCGCAACCGGGATACCCGCCCGGTTTT
CCGGTTCTGGAAGTGGCACAGGATTCACGCTCACCATTTCTTCTCTG
CAGTCTGAAGACTTTGCCGTGTATTACTGCCAGCAGTACGATACCT
GGCCCTTTACCTTTGGCCCAGGTACTAAAGTGGAATTTAAACGAGCT
GCTGCACTTTCCAATAGTATTATGTACTTTTCACATTTTGTGCCCGT
GTTCTGCTGCCTGCGAAGCCTACGACAACCCAGCCCCTAGGCCGCCC
ACACCGGCCCCAACTATTGCCTCCCAGCCATTGTCTCTGAGACCCG
AAGCTTGACAGACCTGCTGCTGGAGGCGCCGTTACACCCGAGGATT
GGATTTGCGCATGTGACATTTACATCTGGGCCCCCTTTGGCCGGAACCT
GCGGTGTGCTGCTGCTGTCACTCGTGATTACACTTTACTGCAACCAC
CGAAACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGA
ATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCC

TTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAG
 TTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACC
 AACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACG
 TTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAAC
 CAAGACGAAAAAACCCCAAGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGA
 AGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAG
 AGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCA
 GCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCT
 GCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 111)

[0350]

Clon 20C5.2 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS
 GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKYYVDSVKGRFTISR
 DNSKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGGLTVTVSSGG
 GSGSGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTW
 YQQKPGQAPRLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTISLQSEDFAV
 YYCQQYDTWPFTFGPGTKVDFKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTT
 TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL
 AGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
 YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
 RRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 112)

[0351]

Clon 20C5.2 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

CAGGTGCAGTTGGTTGAATCAGGAGGGGGTGTGGTGCAACCCGGTC
 GGTCAGTGCACCTCAGTTGTGCTGCTTCCGGGTTTACTTTCAGCTCA
 TATGGGATGCACTGGGTACGGCAGGCTCCAGGTAAAGGCTTGGAAT
 GGGTGGCGGTGATCAGCTATGACGGCTCTGACAAATATTATGTGGA
 CTCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCAGTCGAGACAACTCAAAGAAT
 AGACTCTACTTGCAGATGAATAGCCTCCGGGCCGAAGATACTGCAG
 TCTATTATTGCGCCCGGGAGCGCTACAGTGGAAGAGACTATTGGGG
 GCAAGGAACTCTTGTACAGTCTCATCTGGCGGCGGGCGGCAGCGGT
 GGGGGCGGATCTGGCGGGGGCGGCAGCGAAATCGTTATGACTCAG
 AGTCCTGCCCACTGAGCGTTAGCCCTGGTGAGAGAGCAACACTTA
 GCTGCAGAGCTAGTCAGAGTGTTTCCAGTCTTTTGACATGGTACCA
 ACAGAAGCCCGGTCAAGCTCCACGACTGCTCATCTTCGGTGCATCC

ACCCGCGCAACCGGGATACCCGCCCGGTTTTCCGGTTCTGGAAGTG
GCACAGGATTCACGCTCACCATTTCTTCTCTGCAGTCTGAAGACTTT
GCCGTGTATTACTGCCAGCAGTACGATACCTGGCCCTTTACCTTTGG
CCCAGGTACTAAAGTGGATTTTAAACGAGCTGCTGCACTTTCCAAT
AGTATTATGTACTTTTCACATTTTGTGCCCCGTGTTCCCTGCCTGCGAA
GCCTACGACAACCCCAGCCCCTAGGCCGCCACACCGGCCCCCAACT
ATTGCCTCCCAGCCATTGTCTCTGAGACCCGAAGCTTGCAGACCTGC
TGCTGGAGGCGCCGTTACACCCGAGGATTGGATTTTCGCATGTGAC
ATTTACATCTGGGCCCCCTTTGGCCGGAACCTGCGGTGTGCTGCTGCT
GTCACTCGTGATTACACTTTACTGCAACCACCGAAACAGATCCAAA
AGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCC
GCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAG
AGATTTGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCA
GATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAG
CTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTTGGACAAGCGCA
GAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACC
CCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGA
AGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAA
AGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGAT
ACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID.
NO. 113)

[0352] Clon 20C5.2 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVISYDGSDKYYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERYSGRDYWGQGT LVT VSSGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSP
ATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIFGA STRATG
IPARFSGSGSGTGFTLTIS SLQSEDFAVYYCQQYDTWPFTFGPGTKVDF
KRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 114)

[0353] Clon 20C5.2 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCCGAGATTGTGATGACCCAGTCCCCTGCTACC
CTGTCCGTCAGTCCGGGCGAGAGAGCCACCTTGTCATGCCGGGCCA
GCCAGTCCGTCAGCAGTCTCCTGACTTGGTATCAGCAAAAACCAGG
GCAGGCACCGCGGCTTTTGATTTTTGGTGCAAGCACACGCGCCACT
GGCATTCCAGCTAGGTTTTCTGGAAGTGGATCTGGGACAGGCTTCA
CTCTGACAATCAGTAGCCTGCAGAGTGAGGACTTTGCTGTTTACTAC
TGTCACAGTACGACACCTGGCCATTACATTCGGGCCCCGGCACCA
AGGTCGACTTCAAGAGGGGCGGTGGAGGTTTCAGGTGGTGGCGGGT
CAGGCGGCGGTGGGTCTCAGGTTCAACTGGTGGAATCAGGTGGCGG
CGTTGTCCAACCGGGGCGATCACTTCGACTTTCCTGTGCTGCCTCAG
GCTTTACTTTTTTCATCCTATGGGATGCACTGGGTTCGGCAGGCTCCC
GGAAAAGGACTCGAGTGGGTTGCAGTGATCTCTTACGATGGCTCAG
ACAAGTATTATGTGGACTCAGTCAAGGGGAGATTCACAATAAGCCG
AGACAAGTCCAAAAACCGGCTTTATCTCCAGATGAACAGCCTTAGA
GCGGAAGATACCGCGGTATACTACTGTGCCCCGCGAGAGGTATTCCG
GCAGAGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTCACCGTGAGTTCTGC
CGCAGCGCTCGATAACGAAAAGAGCAACGGAACCATTATCCACGTT
AAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGTCCCCTCTTCCCAGGACCATCTA
AACCTTCTGGGTCTGGTAGTAGTTGGAGGGGTCCTTGCATGTTAC
TCCCTTTTGGTCACCGTCGCCTTCATTATTTTCTGGGTGAGATCCAA
AAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGC
CGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTA
GAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGC
AGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGA
GCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTTGGACAAGCGC
AGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAAC
CCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTG
AAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAA
AAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGG
ATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA
(SEC. ID. NO. 115)

[0354] Clon 20C5.2 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas
(Péptido señal en **negrita**)
MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQ
SVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTSS

LQSEDFAVYYCQQYDTWPFTFGPGTKVDFKRGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVISYDGSDKYYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERYSGRDYWGQGTLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP
SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY
MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR (SEC. ID. NO. 116)

[0355] Clon 20C5.2 CD28T CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

GAGATTGTGATGACCCAGTCCCCTGCTACCCTGTCCGTCAGTCCGG
GCGAGAGAGCCACCTTGTCATGCCGGGCCAGCCAGTCCGTCAGCAG
TCTCCTGACTTGGTATCAGCAAAAACCAGGGCAGGCACCGCGGCTT
TTGATTTTTTGGTGCAAGCACACGCGCCACTGGCATTCCAGCTAGGTT
TTCTGGAAGTGGATCTGGGACAGGCTTCACTCTGACAATCAGTAGC
CTGCAGAGTGAGGACTTTGCTGTTTACTACTGTCAACAGTACGACA
CCTGGCCATTCACATTCGGGCCCCGGCACCAAGGTCGACTTCAAGAG
GGGCGGTGGAGGTTTCAGGTGGTGGCGGGTCAGGCGGCGGTGGGTC
TCAGGTTCAACTGGTGGAAATCAGGTGGCGGCGTTGTCCAACCGGGG
CGATCACTTCGACTTTCCTGTGCTGCCTCAGGCTTTACTTTTTTCATCC
TATGGGATGCACTGGGTTCGGCAGGCTCCCGGAAAAGGACTCGAGT
GGGTTGCAGTGATCTCTTACGATGGCTCAGACAAGTATTATGTGGA
CTCAGTCAAGGGGAGATTCAACAATAAGCCGAGACA ACTCCAAAAA
CCGGCTTTATCTCCAGATGAACAGCCTTAGAGCGGAAGATACCGCG
GTATACTACTGTGCCCCGCGAGAGGTATTCCGGCAGAGACTACTGGG
GACAGGGCACACTGGTCACCGTGAGTTCTGCCGCAGCGCTCGATAA
CGAAAAGAGCAACGGAACCATTATCCACGTTAAGGGCAAGCACCT
GTGCCCCAGTCCCCTCTTCCCAGGACCATCTAAACCCTTCTGGGTTC
TGGTAGTAGTTGGAGGGGTCCTTGCATGTTACTCCCTTTTGGTCACC
GTCGCCTTCATTATTTTCTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCT
CCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACA
AGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTCTGCTGCCT
ATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTA
TCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGC
AGGGAAGAGTATGACGTTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCT
GAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTC

TATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAA
TAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTT
TGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCT
CCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC. ID. NO. 117)

[0356] Clon 20C5.2 CD28T CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIF
GASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDTWPFTF
GPGTKVDFKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC
AASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS DKYYVDSVKGRF
TISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGQGT LVT
SSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLAC
YSLLVTVAFIIFWVR SKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 118)

[0357] Clon 20C5.2 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTA ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCGGAGATCGTCATGACACAGAGTCCAGCTACC
CTGAGCGTGTCCCCTGGAGAGAGAGCCACCCTGTCCTGTAGGGCTA
GTCAGAGTGTGTCCAGCCTCCTCACCTGGTATCAACAGAAGCCTGG
TCAAGCTCCCCGGCTGCTTATCTTCGGGGCCAGCACGCGAGCCACA
GGCATCCCCGGCCAGATTCTCTGGCTCTGGCAGTGGCACCGGGTTCA
CTCTCACGATCTCATCCCTGCAGTCAGAGGATTTCGCTGTGTATTAC
TGTCAGCAGTACGATACATGGCCCTTCACCTTCGGCCCCGGGCACAA
AAGTAGATTTCAAGCGCGGCGGCGGGGGTAGTGGGGGCGGGGGAT
CAGGAGGAGGGGGCTCCCAAGTACAGCTGGTTGAGAGCGGCGGCG
GGGTGGTTCAGCCCGGGCGCAGCCTCAGGCTGAGTTGCGCAGCATC
AGGATTCACATTCAGTTCTTATGGAATGCATTGGGTCAGACAGGCT
CCCGGGAAGGGCCTTGAATGGGTGGCAGTCATTAGCTACGACGGAA
GCGATAAGTACTATGTGGACTCAGTTAAAGGGAGATTTACTATCAG
CCGCGACAATTCCAAAAACAGATTGTATTTGCAGATGAACTCCCTC
AGGGCGGAGGACACTGCTGTATATTACTGCGCACGAGAGAGATACT
CCGGCCGAGACTATTGGGGCCAAGGAACATTGGTAACTGTGAGCTC
CGCCGCAGCTATTGAGGTCATGTACCCCCACCTTATCTCGATAATG
AGAAGAGTAATGGGACTATAATTCACGTAAAGGGCAAACACCTGT

GCCCTTCCCCGCTGTTTCCAGGTCCAAGTAAGCCGTTCTGGGTCCTG
 GTTGTGGTGGGAGGGGTGCTGGCCTGCTATTCTCTGTTGGTTACCGT
 GGCCTTTATCATTTTCTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCC
 ATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAG
 GAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTAT
 CGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATC
 AGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCA
 GGAAGAGTATGACGTTTTTGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTG
 AGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCT
 ATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAAT
 AGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTT
 GTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTC
 CACATGCAAGCCCTGCCACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 119)

[0358] Clon 20C5.2 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQ
 SVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTIS
 LQSEDAVYYCQQYDTWPFTFGPGTKVDFKRGSGSGSGSGSGSGSGS
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
 WVAVISYDGSDKYYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLR AEDTAV
 YYCARERYSGRDYWGQGLTVTVSSAAAEVMPYPYLDNEKSNGTIIH
 VKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK
 RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD
 APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
 EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD
 TYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 120)

[0359] Clon 20C5.2 CD28 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

GAGATCGTCATGACACAGAGTCCAGCTACCCTGAGCGTGTCCCCTG
 GAGAGAGAGCCACCCTGTCCTGTAGGGCTAGTCAGAGTGTGTCCAG
 CCTCCTCACCTGGTATCAACAGAAGCCTGGTCAAGCTCCCCGGCTG
 CTTATCTTCGGGGCCAGCACGCGAGCCACAGGCATCCCGGCCAGAT
 TCTCTGGCTCTGGCAGTGGCACCGGGTTCACTCTCACGATCTCATCC
 CTGCAGTCAGAGGATTTTCGCTGTGTATTACTGTCAGCAGTACGATA
 CATGGCCCTTCACCTTCGGCCCGGGCACAAAAGTAGATTTCAAGCG
 CGGCGGCGGGGGTAGTGGGGGGCGGGGGATCAGGAGGAGGGGGGCTC

CCAAGTACAGCTGGTTGAGAGCGGCGGCGGGGTGGTTCAGCCCGG
GCGCAGCCTCAGGCTGAGTTGCGCAGCATCAGGATTCACATTCAGT
TCTTATGGAATGCATTGGGTCAGACAGGCTCCCGGGAAGGGCCTTG
AATGGGTGGCAGTCATTAGCTACGACGGAAGCGATAAGTACTATGT
GGACTCAGTTAAAGGGAGATTTACTATCAGCCGCGACAATTCCAAA
AACAGATTGTATTTGCAGATGAACTCCCTCAGGGCGGAGGACACTG
CTGTATATTACTGCGCACGAGAGAGATACTCCGGCCGAGACTATTG
GGGCCAAGGAACATTGGTAACTGTGAGCTCCGCCGCAGCTATTGAG
GTCATGTACCCCCCACCTTATCTCGATAATGAGAAGAGTAATGGGA
CTATAATTCACGTAAAGGGCAAACACCTGTGCCCTTCCCCGCTGTTT
CCAGGTCCAAGTAAGCCGTTCTGGGTCCTGGTTGTGGTGGGAGGGG
TGCTGGCCTGCTATTCTCTGTTGGTTACCGTGGCCTTTATCATTTTCT
GGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAA
TATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCT
TACGCACCACCTAGAGATTTCTGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGT
TTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGGCCAGAACCA
ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTT
TTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCA
AGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAG
GATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAG
CGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGC
ACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGC
CACCTAGG (SEC. ID. NO. 121)

[0360] Clon 20C5.2 CD28 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIF
GASTRATGIPARFSGSGSGTGFSLTISSLSQSEDFAVYYCQQYDTWPFTF
GPGTKVDFKRGSGSGSGSGSGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC
AASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKYYVDSVKGRF
TISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGQGLVTV
SSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLV
VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 122)

[0361] Clon 20C5.2 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

ATGGCACTCCCCGTAAGTCTGCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCCGAAATAGTGATGACTCAGTCCCCGGCCACC
CTCAGCGTGTCCCCCGGGAGCGAGCGACCCTGTCATGCAGGGCTT
CCCAGAGTGTGAGCTCCCTGCTCACTTGGTATCAGCAAAAGCCGGG
GCAGGCTCCCCGCCTCCTCATCTTCGGGGCATCAACTAGGGGCCACC
GGCATTCTGCAAGATTTTCCGGGTCTGGCAGCGGCACCGGCTTCA
CCCTTACCATTAGCTCTCTGCAGTCTGAGGACTTCGCCGTTTACTAT
TGTCAGCAGTATGATACTTGGCCCTTTACCTTCGGTCCCGGAACTAA
GGTGGACTTCAAGCGCGGGGGGGGTGGATCTGGAGGTGGTGGCTCC
GGGGGCGGTGGAAGCCAGGTCCAGTTGGTTGAGAGCGGCGGCGGA
GTGGTGCAGCCCGGGAGGTCCTTGC GGCTGAGCTGTGCAGCCTCCG
GTTTTACTTTTTCTAGCTATGGAATGCATTGGGTAAAGACAGGCTCCC
GGAAAAGGCCTCGAGTGGGTGGCGGTCATTAGCTATGATGGATCTG
ATAAATACTATGTGGACTCAGTTAAGGGGCGCTTCACAATCTCAAG
AGACAATAGCAAAAATAGACTGTACCTGCAGATGAATAGTCTGCGC
GCCGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCCCGCGAGAGATACAGCG
GACGGGATTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGTAACGGTGTCTCTCCGC
TGCCGCCCTTAGCAACAGCATTATGTACTTTTCTCATTTTCGTGCCAG
TCTTTCTCCCAGCAAAGCCCACCACTACCCCGGCCCCCAGGCCGCCT
ACTCCTGCCCCCACTATCGCGTCTCAGCCTCTCTCCTTGCGGCCCGA
GGCCTGCCGGCCAGCCGCAGGGGGCGCCGTACATACTCGGGGTTTG
GATTTGCTTGCGACATATATATTTGGGCCCCCCTCGCCGGCACATG
TGGAGTGCTGCTCCTGAGTCTCGTTATAACCCTCTATTGCAACCATA
GAAACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAA
TATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCT
TACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGT
TTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGGCCAGAACCA
ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTT
TTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCA
AGACGAAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAG
GATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAG
CGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGC
ACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGC
CACCTAGGTAA (SEC. ID. NO. 123)

[0362] Clon 20C5.2 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas
(Péptido señal en **negrita**)

MALPVTALLPLALLHAARPEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQ
SVSSLLTWYQQKPGQAPRLLIFGASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTSS
LQSEDFAVYYCQQYDTWPFTFGPGTKVDFKRGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVISYDGSDKYYVDSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERYSGRDYWGQGTLVTVSSAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPT
TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP
LAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH
YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 124)

[0363] Clon 20C5.2 CD8 CD3 zeta CAR ADN Cadenas Ligeras y Pesadas

GAAATAGTGATGACTCAGTCCCCGGCCACCCTCAGCGTGTCCCCCG
GGGAGCGAGCGACCCTGTCATGCAGGGCTTCCCAGAGTGTGAGCTC
CCTGCTCACTTGGTATCAGCAAAAGCCGGGGCAGGCTCCCCGCCTC
CTCATCTTCGGGGCATCAACTAGGGCCACCGGCATTCTGCAAGAT
TTTCCGGGTCTGGCAGCGGCACCGGCTTCACCCTTACCATTAGCTCT
CTGCAGTCTGAGGACTTCGCCGTTTACTATTGTCAGCAGTATGATAC
TTGGCCCTTTACCTTCGGTCCCGGAACTAAGGTGGACTTCAAGCGC
GGGGGGGGTGGATCTGGAGGTGGTGGCTCCGGGGGCGGTGGAAGC
CAGGTCCAGTTGGTTGAGAGCGGCGGCGGAGTGGTGCAGCCCGGG
AGGTCCTTGCGGCTGAGCTGTGCAGCCTCCGGTTTTACTTTTTCTAG
CTATGGAATGCATTGGGTAAGACAGGCTCCCGGAAAAGGCCTCGAG
TGGGTGGCGGTCATTAGCTATGATGGATCTGATAAATACTATGTGG
ACTCAGTTAAGGGGCGCTTCACAATCTCAAGAGACAATAGCAAAAA
TAGACTGTACCTGCAGATGAATAGTCTGCGCGCCGAGGACACTGCC
GTGTACTACTGCGCCCGCGAGAGATACAGCGGACGGGATTACTGGG
GCCAGGGTACCCTCGTAACGGTGTCTCCGCTGCCGCCCTTAGCAA
CAGCATTATGTACTTTTTCTCATTTTCGTGCCAGTCTTTCTCCCAGCAA
AGCCCACCACTACCCCGGCCCCCAGGCCGCCTACTCCTGCCCCCAC
TATCGCGTCTCAGCCTCTCTCCTTGCGGCCCCGAGGCCTGCCGGCCAG
CCGCAGGGGGCGCCGTACATACTCGGGGTTTGGATTTGCTTGCGA
CATATATATTTGGGCCCCCCTCGCCGGCACATGTGGAGTGCTGCTCC
TGAGTCTCGTTATAACCCTCTATTGCAACCATAGAAACAGATCCAA
AAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGC
CGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTA

GAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCAGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGC
AGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGA
GCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGC
AGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAAC
CCCCAGGAGGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTG
AAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAA
AAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGG
ATACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEC.
ID. NO. 125)

[0364] Clon 20C5.2 CD8 CD3 zeta CAR AA Cadenas Ligeras y Pesadas

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSLLTWYQQKPGQAPRLIF
GASTRATGIPARFSGSGSGTGFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDTWPFTF
GPGTKVDFKRGSGSGSGSGSGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC
AASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKYYVDSVKGRF
TISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYSGRDYWGQGT LVT
SSAAALSN SIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPR (SEC. ID. NO. 126)

[0365] ADN de Péptido Señal CAR

ATGGCACTCCCCGTA ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCT
GCACGCCGCACGCCCG (SEC. ID. NO. 127)

[0366] Péptido Señal CAR: MALPVTALLPLALLHAARP (SEC. ID. NO. 128)

[0367] ADN de Enlazador scFv G4S

GGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTCC (SEC.
ID. NO. 129)

[0368] Enlazador scFv G4s: GGGGSGGGSGGGGS (SEC. ID. NO. 130)

[0369] Enlazador adicional G4S: GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEC. ID. NO. 145)

- [0370] ADN de enlazador scFv Whitlow
- GGGTCTACATCCGGCTCCGGGAAGCCCGGAAGTGGCGAAGGTAGT
ACAAAGGGG (SEC. ID. NO. 131)
- [0371] Enlazador scFv Whitlow: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEC. ID. NO. 132)
- [0372] Dominio Extracelular CD28 AA
- MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFS
REFRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYSQQLQVYSKTGFNC DGKLG NESV
TFYLQNL YVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP
LFPGPSKP (SEC. ID. NO. 133)
- [0373] GX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉ (SEC. ID. NO: 134)
- [0374] X₁X₂X₃X₄X₅X₆ (SEC. ID. NO: 135)
- [0375] X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂DY (SEC. ID. NO: 136)
- [0376] X₁ASQX₅X₆X₇X₈X₉LX₁₁ (SEC. ID. NO: 137)
- [0377] X₁ASX₄X₅X₆X₇ (SEC. ID. NO: 138)
- [0378] QQX₃X₄X₅X₆PX₈T (SEC. ID. NO: 139)
- [0379] CLL-1 AA (a.k.a., CLEC12A)
- MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLTLL
CLLLLIGLGVLASMFHVTLKIEMKKMNKLQNISEELQRNISLQLMSNM
NISNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSCYF
LSDDVQTWQESKMACAAQNASLLKINNKNALEFIKSQSRSYDYWLGL
SPEEDSTRGMRVDNIINSSAWVIRNAPDLNNMYCGYINRLYVQYYHCT
YKKRMICEKMANPVQLGSTYFREA (SEC. ID. NO. 140)
- [0380] Secuencia de Ácido Nucleico 4-1BB (dominio intracelular)
- AAGCGCGGCAGGAAGAAGCTCCTCTACATTTTAAAGCAGCCTTTTA
TGAGGCCCGTACAGACAACACAGGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCA

GATTTCCCGAGGAGGAGGAAGGTGGGTGCGAGCTG (SEC. ID. NO. 141)

[0381] 4–1BB AA (dominio intracelular)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEC. ID. NO. 142)

[0382] OX40 AA

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEC. ID. NO. 143)

[0383] Secuencia Líder AA

MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEC. ID. NO: 144)