

RECEPTORES QUIMÉRICOS DE FLT3 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La leucemia mieloide aguda (AML) es una forma maligna
5 hematológica heterogénea que es el tipo más común de leucemia
aguda diagnosticada en adultos. La AML representa
aproximadamente un tercio de todas las leucemias, con una
estimación de 14.500 casos nuevos informados en el 2013 en
solamente en los EE. UU. y presenta índices de supervivencia
10 globales pobres. Ha habido pocas mejoras en los estándares de
cuidado de los pacientes con AML durante los últimos treinta
años. Sin embargo, avances recientes en la biología molecular
y celular han revolucionado nuestra comprensión de la
hematopoyesis humana, tanto en estados normales como de
15 enfermedad.

Se han identificado varios protagonistas clave en la
patogénesis de la enfermedad y se pueden investigar como
blancos accionables. Uno de dichos genes "impulsores"
activadores que se muta con mayor frecuencia en
20 aproximadamente un 30% de AML es el FLT3.

La tirosina quinasa tipo Fms 3 (FLT3) también conocida
como quinasa hepática fetal 2 (FLK-2), quinasa de células
madre humana 1 (SCK-1) o antígeno de la agrupación de Clúster
de diferenciación (CD135), es una tirosina quinasa de

receptores hematopoyética que se clonó mediante dos grupos independientes en la década de 1990. El gen FLT3, ubicado en el cromosoma 13q12 en humanos codifica una proteína tirosina quinasa de receptores de Clase III que comparte homología con otros miembros de la familia Clase III que incluyen el receptor del factor de células madre (c-KIT), el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (FMS) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR).

Tras la unión con el ligando del FLT3, el receptor FLT3 sufre una homodimerización que permite la autofosforilación de residuos tirosina específicos en el dominio yuxtamembrana y la activación corriente a través de las vías PI3K/Akt, MAPK y STAT5. Por lo tanto, FLT3 cumple un rol crítico en el control de la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células hematopoyéticas normales.

El FLT3 humano se expresa en las células madre hematopoyéticas CD34⁺CD38⁻ (HSC), así como en un subconjunto de células precursoras dendríticas. La expresión de FLT3 también se puede detectar en células progenitoras multipotenciales tales como las células progenitoras mieloides comunes CD34⁺CD38⁺CD45RA⁻CD123^{bajo} (CMP), células progenitoras de monocitos y granulocitos CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD123^{bajo} (GMP) y células progenitoras

linfoides comunes $CD34^+CD38^+CD10^+CD19^-$ (CLP). Curiosamente, la expresión de FLT3 prácticamente es inexistente en las células progenitoras de eritrocitos megacariocitos $CD34^+CD38^-CD45RA^-CD123^-$ (MEP). Por consiguiente, la expresión de FLT3 está confinada principalmente a las células progenitoras mieloides y linfoides tempranas con alguna expresión en las células del linaje monocítico más maduro. Este patrón de expresión limitado de FLT3 es notablemente contrario al patrón del ligando de FLT3, que se expresa en la mayoría de los tejidos hematopoyéticos y de próstata, riñón, pulmón, colon y corazón. Estos patrones de expresión variados implican que la expresión de FLT3 es el paso limitante de velocidad en la determinación de la especificidad tisular de las vías de señalización del FLT3.

La mutación más común del FLT3 en la AML es la duplicación en tándem interna FLT3 (FLT3-ITD) que se observa en un 20 a 38% de los pacientes con una AML citogenéticamente normal. Las FLT3-ITD se forman cuando una porción de la secuencia codificante del dominio de yuxtamembrana se duplica y se inserta con una orientación de cabeza a cola. No se han identificado mutaciones FLT3 en los pacientes con una leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple lo cual sugiere una fuerte especificidad de enfermedad por la AML. La activación del FLT3 mutante

generalmente se observa en todos los subtipos de FAB, no obstante, está aumentada significativamente en los pacientes con AML con FAB M5 (leucemia monocítica), en tanto los subtipos M2 y M6 de FAB (leucemia granulocítica o eritroide) están asociados con una frecuencia significativamente menor con la activación del FLT3, en concordancia con patrones de expresión normales de FLT3. Un pequeño porcentaje de pacientes con AML (5-7%) presentan mutaciones de aminoácido individuales en el dominio tirosina quinasa de FLT3 (FLT3 TKD), más comúnmente en D835 o, en algunos casos, en T842 o I836, en tanto aún menos pacientes (~1%) contienen mutaciones en el dominio de yuxtamembrana del FLT3 que involucran los residuos 579, 590, 591 y 594. Los pacientes con una AML mutante FLT3-ITD presentan una forma de enfermedad agresiva caracterizada por recaídas tempranas y una supervivencia pobre, en tanto la supervivencia global y la supervivencia libre de eventos no están afectadas significativamente por la presencia de mutaciones FLT3-TKD. Además, los pacientes que padecen una AML con una mutación FLT3-ITD, con las mutaciones concurrentes TET2 o DNMT3A, tienen un perfil de riesgo global desfavorable en comparación con los pacientes con AML mutantes FLT3-ITD con TET2 o DNMT3A de tipo silvestre, lo que enfatiza la heterogeneidad clínica y biológica de la AML.

Ambas mutaciones FLT3-ITD y FLT3 TKD inducen una

activación independiente del ligando del FLT3, lo que conduce a una activación corriente abajo de la vía Ras/MAPK y las vías PI3K/Akt. Sin embargo, las vías de señalización corriente abajo asociadas con cualquiera de las mutaciones difieren primariamente en la activación preferencial de STAT5 por FLT3-ITD, lo que conduce a un mayor potencial de proliferación y una regulación aberrante de las vías de reparación de ADN.

Independientemente del estado de la mutación del FLT3, la fosforilación del FLT3 es evidente en más de dos tercios de los pacientes con AML y el FLT3 se expresa en >80% de los blastos de AML y en ~90% de todos los pacientes con AML volviéndolo un blanco terapéutico atractivo asociado con la patogénesis de la enfermedad en un tamaño de muestra grande.

Han surgido varios inhibidores de moléculas pequeñas como opciones terapéuticas atractivas para los pacientes con AML que presentan mutaciones del FLT3. La primera generación de inhibidores de tirosina quinasa de FLT3 (TKI) se caracterizó por la falta de selectividad, potencia y propiedades farmacocinéticas desfavorables. Se han desarrollado agentes más nuevos y más selectivos para combatir este problema; sin embargo, su eficacia ha sido limitada por la aparición de resistencia secundaria.

Varios FLT3 TKI tempranos incluían midostaurina

(PKC412), lestaurtinib (CEP-701), sunitinib (SUI1248) y sorafinib (BAY 43-9006) entre otros. Los índices de respuesta en la Fase I y la Fase II con estos agentes dirigidos a múltiples quinasas en pacientes con AML recidivante o refractario son limitados, presumiblemente debido a su incapacidad para lograr una inhibición eficaz de FLT3 sin toxicidades limitantes por la dosis. El quizartinib (AC220) fue desarrollado como un FLT3 TKI de segunda generación con una gran selectividad por el FLT3 de tipo silvestre y FLT3-ITD y se ha demostrado que es beneficioso en especial en el marco de peritransplantes en una cohorte de pacientes más jóvenes. Sin embargo, las mutaciones secundarias en el FLT3 identificados en los pacientes recidivantes que recibieron quizartinib refuerzan la necesidad de desarrollar mejores estrategias terapéuticas para los pacientes con AML, resaltando al mismo tiempo la validez de FLT3 como un blanco terapéutico.

Se han evaluado varios agentes dirigidos en pacientes con AML que padecen la enfermedad de novo, recidivante/refractaria o secundaria. El silenciamiento epigenético de los genes supresores de tumores cumple un rol importante en la patogénesis de la AML, y los inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMT), como azacitadina y decitabina, han tenido cierto éxito clínico. Además, la

identificación reciente de mutaciones que afectan las modificaciones de postraducción de histonas (por ejemplo, las mutaciones EZH2 y ASXL1) o la metilación de ADN (por ejemplo, DNMT3A, TET2, IDH1/2) en un subconjunto de pacientes con AML ha conducido al desarrollo de una variedad de opciones terapéuticas que incluyen inhibidores de EZH2, DOT1L, IDH1/2 junto con HDAC e inhibidores de proteasomas. Sin embargo, estudios preclínicos de muchos de estos compuestos en células de AML sugieren que estos inhibidores pueden estar alterando el fenotipo y la expresión genética que son características de una diferenciación hematopoyética en lugar de causar una citotoxicidad directa para los blastos de AML. Por ello persiste una fuerte necesidad médica no satisfecha de identificar nuevos blancos/modalidades para combatir la AML y causar una lisis dirigida de blastos de AML. Otros candidatos terapéuticos de la AML incluyen los inhibidores de Aurora quinasa que incluyen AMG 900 y los inhibidores de quinasas tipo polo que cumplen un rol importante en el progreso del ciclo celular.

El estándar de cuidado para los pacientes con AML ha continuado siendo quimioterapia con trasplante de células madre cuando fuera posible. Sin embargo, la aparición de casos recidivantes/refractarios en una gran mayoría de los pacientes tratados requiere de modalidades terapéuticas

adicionales. La identificación y descripción de varios antígenos específicos de leucemia junto con una comprensión más clara de efectos de injerto-versus-leucemia mediados por el sistema inmunológico han preparado el camino para desarrollar estrategias inmunomoduladoras para combatir formas malignas hematológicas, que se revisan en numerosos artículos.

Se ha demostrado que las células inmunitarias modificadas presentan las cualidades deseadas en los tratamientos terapéuticos, en particular en oncología. Dos tipos fundamentales de células inmunitarias modificadas son aquellas que contienen receptores de antígenos quiméricos (denominados "CAR" o "CAR-T") y receptores de células T ("TCR"). Estas células modificadas fueron manipuladas para conferirles con especificidad por el antígeno al tiempo que retiene o mejora su capacidad para reconocer y matar una célula blanca. Los receptores de antígenos quiméricos pueden comprender, por ejemplo, (i) un componente específico del antígeno ("molécula de unión al antígeno"), (ii) uno o más dominios coestimulantes y (iii) uno o más dominios activadores. Cada dominio puede ser heterogéneo, es decir, puede estar compuesto por secuencias derivadas de diferentes cadenas proteicas. Las células inmunitarias que expresan un receptor del antígeno quimérico (tales como las células T) se

pueden usar en varias terapias, inclusive en terapias contra el cáncer. Se podrá apreciar que los polipéptidos coestimulantes definidos en la presente se pueden usar para aumentar la activación de células que expresan CAR contra los antígenos blanco, y por ello aumentar la potencia de una inmunoterapia adoptiva.

Las células T se pueden modificar para que sean específicos de uno o más blancos deseados. Por ejemplo, se pueden transducir células T con ADN u otro material genético que codifica una molécula de unión al antígeno, tal como uno o más fragmentos simples de cadenas variables ("scFv") de un anticuerpo, junto con una o más moléculas de señalización, y/o uno o más dominios activadores, tal como CD3 zeta.

Además de la capacidad de las células T CAR para reconocer y destruir las células buscadas, una terapia exitosa con células T se podría beneficiar con la capacidad de las células T CAR para persistir y mantener la capacidad de proliferar como respuesta a un antígeno.

Los receptores de células T (TCR) son moléculas presentes sobre la superficie de células T que son responsables del reconocimiento de fragmentos de antígeno como péptidos unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El TCR está compuesto por dos cadenas proteicas diferentes - en aproximadamente el 95% de

los TCR humanos, donde el TCR consiste en una cadena alfa (α) y una cadena 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 y la cadena β (o las cadenas gamma y delta (γ/δ)) de TCR tienen cada uno tres regiones hipervariables o determinantes de complementariedad (CDR). Cuando el TCR se une con péptido antigénico y MHC (péptido/MHC), la célula T se activa, permitiendo que ataquen y destruyan las células diana.

Sin embargo, las terapias actuales han mostrado niveles variables de eficacia con efectos secundarios indeseados. Por ello, existe la necesidad de identificar terapias nuevas y mejoradas para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con FLT3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se relaciona con células inmunitarias modificadas (tales como CAR o TCR), moléculas de unión a antígenos (que incluyen, pero en un sentido no taxativo, anticuerpos, scFv, cadenas pesadas y/o livianas y CDR de estas moléculas de unión a antígenos) con especificidad por

FLT3.

La invención también se relaciona con una nueva secuencia de CD28 de utilidad como un dominio coestimulante en estas células.

Los receptores de antígenos quiméricos de la invención típicamente comprenden: (i) una molécula de unión al antígeno específica de FLT3, (ii) uno o más dominios coestimulantes y (iii) uno o más dominios activadores. Se podrá apreciar que cada dominio puede ser heterogéneo, por consiguiente, puede estar compuesto por secuencias derivadas de diferentes cadenas proteicas.

En algunas formas de realización, la invención se relaciona con un receptor de un antígeno quimérico que comprende una molécula de unión al antígeno que se une específicamente a FLT3, en donde la molécula de unión al antígeno comprende por lo menos uno entre: (a) una CDR1 de la cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de la SEQ ID NO: 17 en no más de 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos; (b) una CDR2 de la cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 26 en no más de 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos; (c) una CDR3 de la cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la

secuencia de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 27 en no más de 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos; (d) una CDR1 de la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de la SEQ ID NO: 22 o la SEQ ID NO: 30 en no más de 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos; (e) una CDR2 de la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de la SEQ ID NO: 23 o 31 en no más de 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos; (f) una CDR3 de la cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 32 en no más de 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos.

En otras formas de realización, el receptor del antígeno quimérico también comprende por lo menos un dominio coestimulante. En otras formas de realización, el receptor del antígeno quimérico comprende además por lo menos un dominio activador.

En determinadas formas de realización, el dominio coestimulante es una región de señalización de CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), un coestimulante inducible de células T (ICOS), un antígeno asociado a la función de linfocitos-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa

(CD79a), DAP-10, un receptor de Fc gamma, una molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína inmunoglobulina, un receptor de citoquina, integrinas, moléculas linfocitarias activadoras de señales (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor del ligando Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFR, 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, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, 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 a CD83 o cualquier combinación de los mismos.

En algunas formas de realización, el dominio coestimulante deriva de 4-1BB. En otras formas de realización, el dominio coestimulante deriva de OX40. Véase también Hombach et al., *Oncoimmunology*, 1 de julio, 2012; 1(4): 458-466. En aún otras formas de realización, el dominio coestimulante comprende ICOS, como se describió en Guedan et

al., 14 de agosto, 2014; *Blood*: 124 (7) y Shen et al., *Journal of Hematology & Oncology* (2013) 6: 33. En aún otras formas de realización, el dominio coestimulante comprende CD27, como se describió en Song et al., *Oncoimmunology*, 1 de julio, 2012; 1(4): 547-549.

En determinadas formas de realización, el dominio coestimulante CD28 comprende la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8. En formas de realización adicionales, el dominio coestimulante de CD8 comprende la SEQ ID NO: 14. En otras formas de realización, el dominio activador comprende CD3, CD3 zeta o CD3 zeta cuya secuencia se ilustra en la SEQ ID NO: 10.

En otras formas de realización, la invención se relaciona con un receptor de un antígeno quimérico en donde el dominio coestimulante comprende la SEQ ID NO: 2 y el dominio activador comprende la SEQ ID NO: 10.

La invención se relaciona además con polinucleótidos que codifican los receptores de antígenos quiméricos, y con vectores que comprenden a los polinucleótidos. El vector puede ser, por ejemplo, un vector retroviral, un vector de ADN, un plásmido, un vector de ARN, un vector adenoviral, un vector asociado a adenovirus, un vector lentiviral o cualquier combinación de estos. La invención también se relaciona con las células inmunitarias que comprenden los

vectores. En algunas formas de realización, el vector lentiviral es un vector pGAR.

Los ejemplos de células inmunitarias incluyen, pero en un sentido no taxativo células T, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, Células que expresan TCR, células dendríticas o células T NK. Las células T pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas. En otras formas de realización, la invención se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden las células inmunitarias que se describen en la presente.

En determinadas formas de realización, la invención se relaciona con moléculas de unión a antígenos (y receptores de antígenos quiméricos que comprenden estas moléculas) que comprenden por lo menos uno entre:

(a) una región VH que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VH de 10E3 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos y una región VL que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VL de 10E3 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos;

(b) una región VH que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VH de 2E7 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos y una región VL que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VL de

2E7 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos;

(c) una región VH que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VH de 8B5 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos y una región VL que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VL de 8B5 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos;

(d) una región VH que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VH de 4E9 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos y una región VL que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VL de 4E9 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos; y

(e) una región VH que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VH de 11F11 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos y una región VL que difiere de la secuencia de aminoácidos de la región VL de 10E3 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 residuos de aminoácidos;

y en donde la o las regiones VH y VL están ligados por al menos un conector.

En otras formas de realización, la invención se relaciona con moléculas de unión a antígenos (y receptores de

antígenos quiméricos que comprenden estas moléculas), en donde el conector comprende por lo menos uno entre el conector scFv G4S y el conector scFv Whitlow.

En otras formas de realización, la invención se relaciona con vectores que codifican los polipéptidos de la invención y con células inmunitarias que comprenden estos polipéptidos. Las células inmunitarias preferidas incluyen células T, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células NK, Células que expresan TCR, células dendríticas o células T NK. Las células T pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas.

En otras formas de realización, la invención se relaciona con polinucleótidos aislados que codifican un receptor de un antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR) que comprende una molécula de unión al antígeno que se une específicamente a FLT3, en donde la molécula de unión al antígeno comprende una CDR3 de la cadena pesada variable (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 27. Los polinucleótidos también pueden comprender un dominio activador. En formas de realización preferidas, el dominio activador es CD3, más preferiblemente CD3 zeta, más preferiblemente la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la SEQ ID NO: 9.

En otras formas de realización, la invención incluye un dominio coestimulante, tal como 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, un antígeno asociado a la función de linfocitos-1 (LFA-1 (CD1 1a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (un miembro de la superfamilia de factores de necrosis tumoral 14; TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, un receptor de Fc gamma, una molécula MHC clase I, TNF, TNFr, una integrina, una molécula linfocitaria activadora de señales, 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, CD1-1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1-1a, LFA-1, ITGAM, CD1-1b, ITGAX, CD1-1c, 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 CD83 o fragmentos o combinaciones de los mismos. Los dominios coestimulantes

preferidos se indicarán más adelante en la presente.

En otras formas de realización, la invención se relaciona con polinucleótidos aislados que codifican un receptor de un antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR), en donde dicho CAR o TCR comprende una molécula de unión al antígeno que se une específicamente a FLT3, y en donde la molécula de unión al antígeno comprende una CDR3 de la cadena ligera variable (V_L) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionado entre la SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 32. El polinucleótido puede comprender además un dominio activador. El polinucleótido también puede comprender un dominio coestimulante.

En otras formas de realización, la invención se relaciona con polinucleótidos aislados que codifican un receptor de un antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR) que comprende una molécula de unión al antígeno que se une específicamente a FLT3, en donde la cadena pesada de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18) y CDR3 (SEQ ID NO: 19) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 23) y CDR3 (SEQ ID NO: 24).

En otras formas de realización, la invención se relaciona con polinucleótidos aislados que codifican un

receptor de un antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR) que comprende una molécula de unión al antígeno que se une específicamente a FLT3, en donde la cadena pesada de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 26) y CDR3 (SEQ ID NO: 27) y la cadena ligera de la molécula de unión al antígeno comprende CDR1 (SEQ ID NO: 30), CDR2 (SEQ ID NO: 31) y CDR3 (SEQ ID NO: 32).

La invención se relaciona además con moléculas de unión a antígenos para FLT3 que comprenden por lo menos una secuencia de la CDR3 de la cadena pesada variable o de la CDR3 de la cadena ligera variable como se describe en la presente. La invención se relaciona además con moléculas de unión a antígenos para FLT3 que comprenden por lo menos una secuencia de la CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada variable como se describe en la presente. La invención se relaciona además con moléculas de unión a antígenos para FLT3 que comprenden por lo menos una secuencia de la CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera variable como se describe en la presente. La invención se relaciona además con moléculas de unión a antígenos para FLT3 que comprenden tanto secuencias de CDR1, CDR2, CDR3 de la cadena pesada variable como de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera variable como se describe en la presente.

Otros dominios variables de la cadena pesada y liviana y secuencias de polinucleótidos y aminoácidos de CDR adecuadas para su uso en las moléculas de unión a FLT3 de acuerdo con la presente invención se pueden consultar en la Solicitud Provisional de Patente de los EE. UU. NO: 62/199.944, presentada el 31 de julio, 2015.

La invención se relaciona además con métodos de tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto las moléculas de unión a antígenos, los CAR, los TCR, polinucleótidos, vectores, células o composiciones de acuerdo con la invención. Las enfermedades adecuadas para el tratamiento incluyen, pero en un sentido no taxativo, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielogénica 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 (MDS), trastorno mieloproliferativo, neoplasia mieloide, sarcoma mieloide) o combinaciones de los mismos. Otras enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, psoriasis, alergias, asma, enfermedad de Crohn, IBD, IBS, fibromialgia, mastocitosis y enfermedad

celíaca.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En la FIGURA 1 se muestra un análisis por citometría de flujo de la expresión de FLT3 sobre la superficie celular de líneas celulares humanas.

En la FIGURA 2 se muestra la expresión de CAR en células T primarias humanas sometidas a electroporación con ARNm que codifica diversos CAR.

En la FIGURA 3 se muestra la actividad citolítica de células T CAR sometidas a electroporación contra múltiples líneas celulares después de 16 horas de cocultivo.

En las FIGURAS 4A y 4B, se muestra la producción de IFN γ , IL-2 y TNF α por células T CAR sometidas a electroporación después de 16 horas de cocultivo con las líneas de células diana indicadas.

En la FIGURA 5 se muestra la expresión de CAR en células T primarias humanas transducidas con lentivirus de dos donantes sanos.

En la FIGURA 6 se muestra la actividad citolítica promedio en el tiempo de dos donantes sanos que expresan los CAR indicados cocultivados con diversas líneas de células diana.

En la FIGURAS 7A, 7B y 7C, se muestra la producción de IFN γ , TNF α e IL-2 por células T CAR transducidas con

lentivirus de dos donantes sanos después de 16 horas de cocultivo con las líneas de células diana indicadas.

En la FIGURA 8 se muestra la proliferación de células T CAR transducidas con lentivirus marcado con CFSE de dos donantes sanos después de 5 días de cocultivo con esferas CD3-CD28 o con las líneas de células diana indicadas.

En la FIGURA 9 se muestra la expresión de CAR en células T primarias humanas transducidas con lentivirus usadas para estudios *in vivo*.

En la FIGURA 10 se muestran imágenes de bioluminiscencia de células de leucemia mieloide aguda marcadas después de una inyección intravenosa de células T CAR en un modelo xenogénico.

En la FIGURA 11 se muestran curvas de supervivencia de ratones que recibieron inyecciones con células T CAR.

En la FIGURA 12 se muestra el mapa del vector pGAR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se podrá apreciar que los receptores de antígenos quiméricos (CAR o CAR-T) y los receptores de células T (TCR) son receptores modificados genéticamente. Estos receptores modificados se pueden insertar fácilmente y expresar en células inmunitarias, que incluyen células T, de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Con un CAR, se puede programar un solo receptor para que reconozca un antígeno

específico y, cuando está unido a dicho antígeno, activa la célula inmunitaria para que ataque y destruya la célula que contiene dicho antígeno. Cuando estos antígenos existen sobre células tumorales, una célula inmunitaria que expresa el CAR puede buscar y matar la célula tumoral.

Los CAR se pueden modificar para que se unan a un antígeno (tal como un antígeno de la superficie celular) mediante la incorporación de una molécula de unión al antígeno que interactúa con dicho antígeno buscado. Preferiblemente, la molécula de unión al antígeno es un fragmento de anticuerpo de este, y más preferiblemente uno o más fragmentos de anticuerpo de cadena simple ("scFv"). Un scFv es un fragmento de anticuerpo de cadena simple que tiene las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo unidas entre sí. Véase, las Patentes de EE. UU. 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 parental para interactuar específicamente con un antígeno blanco. Los scFv se prefieren para su uso en los receptores de antígenos quiméricos porque se pueden modificar para que se expresen como parte de una sola cadena junto con los otros componentes del 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 podrá apreciar que la molécula de unión al antígeno típicamente está contenida en la porción extracelular del CAR de modo tal que pueda reconocer y unirse al antígeno de interés. Los CAR biespecíficos y multiespecíficos están contemplados dentro del alcance de la invención, con especificidad por más de un blanco de interés.

Dominios coestimulantes. Los receptores de antígenos quiméricos pueden incorporar dominios coestimulantes (señalización) para aumentar su potencia. Véase, las Patentes de EE. UU. NO: 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 coestimulante que se encuentra naturalmente sobre las células T. La secuencia de aminoácidos nativa completa de CD28 se describe en NCBI, secuencia de referencia: NP_006130.1. La secuencia de ácidos nucleicos nativa completa de CD28 se describe en NCBI, secuencia de referencia: NM_006139.1.

Se han utilizado algunos dominios CD28 en los receptores de antígenos quiméricos. De acuerdo con la invención, ahora se ha encontrado que un nuevo dominio extracelular CD28, denominado "CD28T", provee inesperadamente algunos beneficios

cuando se utiliza en una construcción CAR.

La secuencia de nucleótidos de la molécula CD28T, que incluye el dominio CD28T extracelular y los dominios transmembrana e intracelular CD28, se ilustra en la SEQ ID NO: 1:

```
CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTG
TCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGA
GTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCA
AAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCAC
AAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGC
```

La secuencia de aminoácidos correspondiente se ilustra en la SEQ ID NO: 2:

```
LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW
VRSK RSRL LHSDYM NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAYRS
```

La secuencia de nucleótidos de la porción extracelular de CD28T se ilustra en la SEQ ID NO: 3:

```
CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTG
TCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA
```

La secuencia de aminoácidos correspondiente del dominio CD28T extracelular se ilustra en la SEQ ID NO: 4: LDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKP

La secuencia de nucleótidos del dominio transmembrana CD28 se ilustra en la SEQ ID NO: 5):

```
TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCAC
```

CGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT

La secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana CD28 se ilustra en la SEQ ID NO: 6:

FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIIFWV

La secuencia de nucleótidos del dominio de señalización intracelular CD28 se ilustra en la SEQ ID NO: 7:

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCG
CCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTAT
CGGAGC

La secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular CD28 se ilustra en la SEQ ID NO: 8:

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

Otras secuencias CD28 adecuadas que son de utilidad en la invención incluyen la secuencia de nucleótidos CD28 que se ilustra en la SEQ ID NO: 11:

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTACCAT
CATTCACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTCTTCCCCGGGCCATCAAAGCCC

La secuencia de aminoácidos correspondiente se ilustra en la SEQ ID NO: 12:

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKP

Otras secuencias extracelulares o transmembrana adecuadas pueden derivar de CD8. La secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular y transmembrana CD8 adecuado se ilustra en la SEQ ID NO: 13:

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTGTTCCTT
 GCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCAGCTCCTACCATCGCT
 TCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGCAGGGGGCGCTGTTTCATA
 CCAGAGGACTGGATTTTCGCCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGAACCTGCGG
 CGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGAAC

La secuencia de aminoácidos correspondiente se ilustra en la SEQ ID NO: 14:

AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN

Los dominios coestimulantes adecuados que se encuentran dentro del alcance de la invención pueden derivar, entre otras fuentes, 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, un antígeno asociado a la función de linfocitos-1 (LFA-1 (CD1 1a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (miembro de la superfamilia de factores de necrosis tumoral 14; TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, un receptor de Fc gamma, una molécula MHC clase I, TNF, TNFr, una integrina, una molécula linfocitaria activadora de señales, 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, CD1-1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1-1a, LFA-1, ITGAM, CD1-1b, ITGAX, CD1-1c, 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 CD83 o fragmentos o combinaciones de los mismos.

Dominios activadores.

El CD3 es un elemento de los receptores de células T sobre células T nativas y se ha mostrado que es un importante elemento activador intracelular en los CAR. En una forma de realización preferida, el CD3 es CD3 zeta, cuya secuencia de nucleótidos se ilustra en la SEQ ID NO: 9:

```
AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCA
ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGA
GGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAAACCCCAGGAGGGTCTCTATA
ATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCG
GAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACT
TATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG
```

La secuencia de aminoácidos correspondiente del CD3 zeta intracelular se ilustra en la SEQ ID NO: 10:

```
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR
```

RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R

ORIENTACIÓN DEL DOMINIO

Desde un punto de vista estructural, se podrá apreciar que estos dominios corresponden a ubicaciones que tienen relación con la célula inmunitaria. Por lo tanto, estos dominios pueden formar parte de (i) la "bisagra" o dominio (EC) extracelular (EC), (ii) el dominio transmembrana (TM) y/o (iii) el dominio intracelular (citoplasmático) (IC). El componente intracelular con frecuencia comprende en parte un miembro de la familia CD3, preferiblemente CD3 zeta, que tiene la capacidad para activar la célula T tras la unión de la molécula de unión al antígeno con su blanco. En una forma de realización, el dominio de bisagra típicamente está compuesto de por lo menos un dominio coestimulante definido en la presente.

También se podrá apreciar que la región de bisagra también puede contener parte o algo de un miembro de la familia de inmunoglobulinas tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM o un fragmento de estas.

Los ejemplos de construcciones CAR de acuerdo con la invención se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre de la	scFv	Dominios	Dominio
--------------	------	----------	---------

construcción		coestimulantes	activador
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

DOMINIOS RELACIONADOS CON LA CÉLULA

Se podrá apreciar que, con relación a la célula que lleva al receptor, las células T modificadas de la invención comprenden una molécula de unión al antígeno (tal como un scFv), un dominio extracelular (que puede comprender un dominio de "bisagra"), un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio intracelular comprende por lo menos en parte un dominio activador, preferiblemente compuesto por un miembro de la familia CD3 tales como CD3 zeta, CD3 épsilon, CD3 gamma o porciones de este. También se podrá apreciar que la molécula de unión al antígeno (por ejemplo, uno o más scFv) se modifica de modo tal que se localiza en la porción extracelular de la molécula/construcción, de manera

que pueda reconocer y unirse a sus blancos.

Dominio extracelular. El dominio extracelular es ventajoso para la señalización y para lograr una respuesta eficiente de linfocitos a un antígeno. Los dominios extracelulares de particular utilidad en esta invención pueden derivar (es decir, comprenden) de CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), un coestimulante inducible de células T (ICOS), antígeno asociado a la función de linfocitos-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor de Fc gamma, una molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína inmunoglobulina, receptor de citoquina, integrinas, moléculas linfocitarias activadoras de señales (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor del 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, CD1 1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, 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 a CD83 o cualquier combinación de los mismos. El dominio extracelular puede derivar de una fuente ya sea natural o sintética.

Como se describió en la presente, los dominios extracelulares a menudo comprenden una porción de bisagra. Esta es una porción del dominio extracelular, a menudo conocida como una región "espaciadora". Se puede emplear una variedad de bisagras de acuerdo con la invención, incluyendo las moléculas coestimulantes que se describieron antes, así como secuencias de inmunoglobulinas (Ig) u otras moléculas adecuadas para lograr la distancia especial deseada de las células diana. En algunas formas de realización, toda la región extracelular comprende una región de bisagra. En algunas formas de realización, la región de bisagra comprende CD28T o el dominio EC de CD28.

Dominio transmembrana. El CAR se puede diseñar para que comprenda un dominio transmembrana fusionado al dominio extracelular del CAR. De manera similar, se puede fusionar al dominio intracelular del CAR. En una forma de realización, se usa el dominio transmembrana que naturalmente está asociado con uno de los dominios en un CAR. En algunos casos, el

dominio transmembrana se puede seleccionar o modificar mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas proteínas de membrana de superficie o de proteínas diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. El dominio transmembrana puede derivar de una fuente ya sea natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína unida a membrana o transmembrana. Las regiones transmembrana de particular utilidad en esta invención pueden derivar (es decir, comprenden) de CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), un coestimulante inducible de células T (ICOS), antígeno asociado a la función de linfocitos-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor de Fc gamma, una molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína inmunoglobulina, receptor de citoquina, integrinas, moléculas linfocitarias activadoras de señales (proteínas SLAM), receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor del 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, 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, un ligando que se une específicamente a CD83 o cualquier combinación de los mismos.

Opcionalmente, los conectores cortos pueden formar enlaces entre cualquiera o algunos de los dominios extracelular, transmembrana e intracelular del CAR.

En una forma de realización, el dominio transmembrana en el CAR de la invención es un dominio transmembrana CD8. En una forma de realización, el dominio transmembrana de CD8 comprende la porción transmembrana de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 13. En otra forma de realización, el dominio transmembrana de CD8 comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos transmembrana contenida en la SEQ ID NO: 14.

En determinadas 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 de CD28 comprende la secuencia de ácidos

nucleicos de la SEQ ID NO: 5. En una forma de realización, el dominio transmembrana de CD28 comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. En otra forma de realización, el dominio transmembrana de CD28 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Dominio intracelular (citoplasmático). El dominio intracelular (citoplasmático) de las células T modificadas de la invención puede proporcionar la activación de por lo menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria. La función efectora de una célula T puede ser, por ejemplo, una actividad citolítica o una actividad auxiliar, que incluye la secreción de citoquinas.

Se podrá apreciar que las moléculas intracelulares adecuadas incluyen (es decir, comprenden), pero en un sentido no taxativo, CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, muerte programada-1 (PD-1), un coestimulante inducible de células T (ICOS), antígeno asociado a la función de linfocitos-1 (LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig alfa (CD79a), DAP-10, receptor de Fc gamma, una molécula MHC clase 1, proteínas receptoras de TNF, una proteína inmunoglobulina, receptor de citoquina, integrinas, moléculas linfocitarias activadoras de señales (proteínas SLAM),

receptores activadores de células NK, BTLA, un receptor del 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, CD1 1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, 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, un ligando que se une específicamente a CD83 o cualquier combinación de los mismos.

En una forma de realización preferida, el dominio citoplasmático del CAR se puede diseñar para que comprenda el dominio de señalización de CD3 zeta por sí solo o combinado con cualquier otro dominio citoplasmático deseado de utilidad en el contexto del CAR de la invención. Por ejemplo, el dominio citoplasmático del CAR puede comprender una porción de la cadena CD3 zeta y una región de señalización coestimulante.

Las secuencias de señalización citoplasmáticas en la porción de señalización citoplasmática del CAR de la

invención se pueden unir entre sí en un orden aleatorio o específico.

En una forma de realización preferida, el dominio citoplasmático está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3 zeta y el dominio de señalización de CD28. En otra forma de realización preferida, el dominio citoplasmático está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3 zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En otra forma de realización, el dominio citoplasmático en el CAR de la invención está diseñado para comprender una porción de CD28 y CD3 zeta, en donde el CD28 citoplasmático comprende la secuencia de ácidos nucleicos que se ilustra en la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos que se ilustra en la SEQ ID NO: 8. La secuencia de ácidos nucleicos de CD3 zeta se ilustra en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos se ilustra en la SEQ ID NO: 8.

Se podrá apreciar que una orientación preferida de los CAR de acuerdo con la invención comprende un dominio de unión al antígeno (tal como scFv) en tándem con un dominio coestimulante y un dominio activador. El dominio coestimulante puede comprender uno o más entre una porción extracelular, una porción transmembrana y una porción intracelular. Se podrá apreciar además que se pueden utilizar múltiples dominios coestimulantes en tándem.

En algunas formas de realización, se proveen ácidos nucleicos que comprenden un promotor ligado operativamente a un primer polinucleótido que codifica una molécula de unión al antígeno, por lo menos una molécula coestimulante y un dominio activador.

En algunas formas de realización, la construcción de ácidos nucleicos está contenida en un vector viral. En algunas formas de realización, 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 adenoasociados (AAV), vectores del virus *Herpes* y vectores del virus *Vaccinia*. En algunas formas de realización, el ácido nucleico está contenido dentro de un plásmido.

La invención se relaciona además con polinucleótidos aislados que codifican los receptores de antígenos quiméricos, y con vectores que comprenden a los polinucleótidos. Cualquier vector conocido en la técnica puede ser adecuado para la presente invención. En algunas formas de realización, el vector es un vector viral. En algunas formas de realización, el vector es un vector retroviral (tal como pMSVG1), un vector de ADN, un vector del virus de leucemia murina, un vector SFG, un plásmido, un vector de ARN, un vector adenoviral, un vector baculoviral,

un vector viral de Epstein Barr, un vector papovaviral, un vector viral de *Vaccinia*, un vector viral de *Herpes simple*, un vector asociado a adenovirus (AAV), un vector lentiviral (tal como pGAR) o cualquier combinación de los mismos. El mapa del vector pGAR se muestra en la FIGURA 12. La secuencia de pGAR es:

```

CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGC
GTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCCTCCCTTCCTTTC
TCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCG
ATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGT
GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATA
GTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTT
ATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTT
AACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCA
ACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGG
ATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAA
ACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGACCCGGGGATGGCGCGCCAGT
AATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTAC
GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACG
TATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC
GGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT
CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGC
AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT

```

TGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAAC
AACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA
GAGCTGGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCT
GGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAG
TGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGT
GTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGG
AGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCG
ACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAG
AGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAG
GGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATT
CGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTA
CAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCC
TCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGA
GGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCCGCCGCTGATCTTCAGACCTGG
AGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATT
GAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAG
CAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTCTTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGC
AGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAG
AACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCA
TCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT
GGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGT
TGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAG
AAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGA
AAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAAC

ATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTT
TAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATT
ATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAA
GAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATC
GGTTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGA
CATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAATTT
TTATCGCGATCGCGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACG
CCATTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTTAGG
AACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCG
GCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAA
CCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACT
AACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAG
AGCCCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCTTCGAAGTAGATCTTTGTGATCCTACCA
TCCACTCGACACACCCGCCAGCGGCCGCTGCCAAGCTTCCGAGCTCTCGAATTAATTCACG
GTACCCACCATGGCCTAGGGAGACTAGTCGAATCGATATCAACCTCTGGATTACAAAATTT
GTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGC
TTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGAT
AAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGG
TGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCT
CCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGC
CTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGGTGGTGTGTCGG
GGAAGCTGACGTCCTTTTCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGAC
GTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTG
CCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTT

GGGCCGCCTCCCCGCCTGGTTAATTAAAGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCT
GTAGATCTTAGCCACTTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCGAATTCACTCCCAAC
GAAGACAAGATCTGCTTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTG
GGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTG
CTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCT
TTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGGCATGCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGT
TTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGC
TATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATT
CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTTGGCGCGCCATCGTCGAGG
TTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG
TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAG
CCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT
CCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGC
GGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTT
GGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG
GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG
GCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGAC
GCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGG
AAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTT
CTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT
AGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGC
CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA
GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGA
AGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAA

GCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGT
 AGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAG
 ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGAT
 TTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGT
 TTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA
 GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGT
 CGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCG
 CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCG
 AGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGA
 AGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
 ATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAA
 GGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGAT
 CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAT
 TCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGT
 CATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAA
 TACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGA
 AAATCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA
 ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCA
 AAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTT
 TTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAAT
 GTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

(SEQ ID NO: 95)

Los ejemplos de vectores adecuados adicionales incluyen,
 por ejemplo, pBABE-puro, pBABE-neo largeTcDNA, 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.

En algunas formas de realización, la célula inmunitaria modificada es una célula T, un linfocito infiltrante de tumores (TIL), una célula NK, una célula que expresa TCR, una célula dendrítica o una célula T NK. En algunas formas de realización, la célula se obtiene o prepara a partir de sangre periférica. En algunas formas de realización, la célula se obtiene o prepara a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En algunas formas de realización, la célula se obtiene o prepara a partir de médula ósea. En algunas formas de realización, la célula se obtiene o 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 usando un método seleccionado del grupo que consiste en electroporación, sonoporación, biolística (por ejemplo, pistola de genes), transfección con lípidos, transfección con polímeros, nanopartículas o poliplejos.

En algunas formas de realización, los receptores de

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

MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENOS

Las moléculas de unión a antígenos se encuentran dentro del alcance de la invención.

Una "molécula de unión al antígeno", según se usa en la presente, hace referencia a cualquier proteína que se une a un antígeno blanco específico. En la presente solicitud, el antígeno blanco especificado es la proteína FLT3 o un fragmento de esta. Las moléculas de unión al antígeno incluyen, pero en un sentido no taxativo, anticuerpos y partes de unión de estos, tales como fragmentos inmunológicamente funcionales. Los peptidocuerpos (es decir, moléculas de fusión Fc que comprenden dominios de unión a péptidos) son otro ejemplo de moléculas de unión a antígenos adecuadas.

En algunas formas de realización, la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno sobre una célula tumoral. En algunas formas de realización, la molécula de unión al

antígeno se une a un antígeno sobre una célula involucrada en una enfermedad hiperproliferativa o a un antígeno viral o bacteriano. En determinadas formas de realización, la molécula de unión al antígeno se une a FLT3. En otras formas de realización, la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo o un fragmento de este, que incluye una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del mismo. En otras formas de realización, la molécula de unión al antígeno es un fragmento de cadena simple variable (scFv).

El término "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 dicha porción) de un anticuerpo que carece de por lo menos algunos de los aminoácidos presentes en una cadena de longitud completa pero que aún se puede unir específicamente a un antígeno. Estos fragmentos presentan actividad biológica si se unen específicamente al antígeno blanco y pueden competir con otras moléculas de unión al antígeno, que incluyen anticuerpos intactos, por la unión específica a un epítipo dado. En algunas formas de realización, los fragmentos son fragmentos neutralizadores. En algunas formas de realización, los fragmentos pueden bloquear o reducir la actividad de FLT3. En un aspecto, este fragmento retendrá al

menos una CDR presente en la cadena ligera o pesada completa, y en algunas formas de realización, comprenderá una sola cadena pesada y/o una cadena ligera, o una porción de esta. Estos fragmentos se pueden producir mediante procedimientos de ADN recombinante o se pueden producir mediante corte enzimático o químico de las moléculas de unión al antígeno, que incluyen anticuerpos intactos.

Los fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales incluyen, pero en un sentido no taxativo, fragmentos de scFv, fragmentos Fab (Fab', F(ab')₂ y semejantes), una o más CDR, un diacuerpo (un dominio variable de la cadena pesada sobre el mismo polipéptido que un dominio variable de la cadena ligera, unidos por medio de un conector peptídico corto que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena), dominios de anticuerpos y anticuerpos de cadena simple. Estos fragmentos pueden derivar de cualquier fuente de mamífero que incluye, pero en un sentido no taxativo, humano, de ratón, de rata, de camélidos o de conejo. Como podrá apreciar un especialista en la técnica, una molécula de unión al antígeno puede incluir componentes no proteicos.

Las variantes de las moléculas de unión a antígenos también se encuentran dentro del alcance de la invención, por ejemplo, cadenas livianas variables y/o pesadas variables

cada una de las cuales tiene por lo menos 70-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, 97-99% o más de un 99% de identidad con las secuencias de aminoácidos de las secuencias que se describen en la presente. En algunos casos, dichas moléculas incluyen por lo menos una cadena pesada y una cadena ligera, en tanto en otros casos las formas variantes contienen dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas (o subpartes de las mismas). El especialista podrá determinar las variantes adecuadas de las moléculas de unión al antígeno indicadas en la presente usando técnicas bien conocidas. En algunas formas de realización, el especialista en la técnica podrá identificar asimismo las áreas adecuadas de la molécula que se pueden cambiar sin destruir la actividad buscando regiones que no se consideran importantes para la actividad.

En determinadas formas de realización, la estructura del polipéptido de las moléculas de unión al antígeno se basa en anticuerpos, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, dominios de anticuerpos, anticuerpos sintéticos (denominados algunas veces "miméticos de anticuerpos" en la presente), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos (denominadas algunas veces "conjugados de anticuerpos" en la presente), y fragmentos de éstos, respectivamente. En algunas formas de

realización, la molécula de unión al antígeno comprende o consiste en avímeros.

En algunas formas de realización, una molécula de unión al antígeno para FLT3 se administra sola. En otras formas de realización, la molécula de unión al antígeno para FLT3 se administra como parte de un CAR, TCR u otra célula inmunitaria. En dichas células inmunitarias, la molécula de unión al antígeno para FLT3 se puede encontrar bajo el control de la misma región promotora o de un promotor separado. En determinadas formas de realización, los genes que codifican agentes proteicos y/o una molécula de unión al antígeno para FLT3 se pueden encontrar en vectores separados.

La invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión al antígeno para FLT3 junto con un diluyente, un vehículo, un solubilizante, un emulsionante, un conservante y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas incluirán más de una molécula de unión al antígeno para FLT3 diferente. En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas incluirán más de una molécula de unión al antígeno para FLT3, en donde las moléculas de unión a antígenos para FLT3 se unen a más de un epítipo. En algunas formas de realización, las diversas moléculas de unión a

antígenos no competirán entre sí por la unión a FLT3.

En otras formas de realización, la composición farmacéutica se puede seleccionar para una administración parenteral, para inhalación o para su administración a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de dichas composiciones adecuadas para uso farmacéutico está dentro de la capacidad de un especialista en la técnica. En determinadas formas de realización, se usan soluciones amortiguadoras para mantener la composición a un pH fisiológico o en un valor de pH ligeramente menor, típicamente dentro de un intervalo de pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8. En determinadas formas de realización, cuando está contemplada la administración parenteral, una composición terapéutica puede estar en forma de solución acuosa libre de pirógenos adecuada para uso parenteral que comprende una molécula de unión al antígeno deseada para FLT3, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, un vehículo para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula una molécula de unión al antígeno contra FLT3, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, como solución isotónica estéril adecuadamente conservada. En determinadas formas de realización, la preparación puede implicar la

formulación la molécula deseada con compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), esferas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto, que se puede administrar mediante inyección de depósito. En determinadas formas de realización, se pueden usar dispositivos implantables de administración de la droga para introducir la molécula deseada.

En algunas formas de realización, la molécula de unión al antígeno se usa como una herramienta de diagnóstico o de validación. La molécula de unión al antígeno se puede usar para evaluar la cantidad de FLT3 presente en una muestra y/o en un 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 divulgadas en la presente se usan o se proporcionan en un conjunto de elementos para ensayo y/o método para la detección de FLT3 en tejidos o células de mamíferos para detectar/diagnosticar una enfermedad o un trastorno asociado con cambios en los niveles de FLT3. El conjunto de elementos puede comprender una molécula de unión al antígeno que se une a FLT3, junto con medios para indicar la unión de la molécula de unión al antígeno con FLT3, si estuviera presente, y opcionalmente los niveles de la proteína FLT3.

Las moléculas de unión al antígeno se comprenderán adicionalmente en vista de las siguientes definiciones y descripciones.

Una región "Fc" comprende dos fragmentos de la cadena pesada que comprenden los dominios de anticuerpo CH1 y CH2. Los dos fragmentos de la cadena pesada se mantienen unidos mediante dos o más enlaces disulfuro, y por medio de interacciones hidrofóbicas entre los dominios CH3.

Un "fragmento Fab" comprende una cadena ligera y las regiones CH1 y variables de una cadena pesada. La molécula de una cadena pesada Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de la cadena pesada. Un "fragmento Fab'" comprende una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio C_{H1}, y también la región entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, por lo que puede formarse un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')₂. Un "fragmento F(ab')₂" comprende dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se forma un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Por lo tanto; un F(ab')₂ está compuesto por dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables de las cadenas pesada y liviana, pero carece de las regiones constantes.

Un "fragmento de cadena simple variable" ("scFv", también denominado "anticuerpo de cadena simple") se refiere a moléculas Fv en las cuales las regiones variables de las cadenas pesada y liviana se han unido mediante un conector flexible para formar una sola cadena de polipéptidos, que forma una región de unión al antígeno. Véase la Solicitud PCT WO88/01649 y las Patentes de los EE. UU. No: 4.946.778 y 5.260.203, cuyas descripciones se incorporan por completo a modo de referencia.

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 antigénicas. Las moléculas de unión a antígenos bivalentes pueden ser biespecíficas. Una "molécula de unión al antígeno multiespecífica" es una molécula dirigida a más de un antígeno o epítipo. Una molécula de unión al antígeno "biespecífica", "de especificidad doble" o "bifuncional" es una molécula de unión al antígeno o un anticuerpo híbrido, respectivamente, que tiene dos sitios de unión al antígeno diferentes. Los dos sitios de unión de una molécula de unión al antígeno biespecífica se unirán a dos epítopos diferentes,

que pueden residir sobre los mismos blancos proteicos o sobre blancos diferentes.

Se dice que una molécula de unión al antígeno "se une específicamente" a su antígeno blanco 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 una "afinidad alta" cuando la K_d es de $1-5 \times 10^{-9}$ M, y se une con una "afinidad muy alta" cuando la K_d es de $1-5 \times 10^{-10}$ M. En una forma de realización, la molécula de unión al antígeno tiene una $K_d \leq 10^{-9}$ M. En una forma de realización, la constante de disociación es $< 1 \times 10^{-5}$. En otras formas de realización, las moléculas de unión a antígenos se unirán al FLT3 humano con una K_d de entre aproximadamente 10^{-7} M y 10^{-13} M, y en aún otra forma de realización las moléculas de unión a antígenos se unirán con una K_d de $1,0-5 \times 10^{-10}$.

Se dice que una molécula de unión al antígeno es "selectiva" cuando se une a un blanco con mayor afinidad que a un segundo blanco.

El término "anticuerpo" hace referencia a una inmunoglobulina intacta de cualquier isotipo o un fragmento de esta que puede competir con el anticuerpo intacto por la unión específica al antígeno blanco, e incluye, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos y biespecíficos. Un "anticuerpo" es una especie de una molécula

de unión al antígeno definida en la presente. En general, un anticuerpo intacto comprenderá por lo menos dos cadenas pesadas completas y dos cadenas livianas completas, pero en algunos casos, puede incluir menos cadenas, tales como los anticuerpos naturales en los camélidos, que pueden comprender solamente cadenas pesadas. Los anticuerpos pueden derivar de una sola fuente o pueden ser quiméricos, es decir, distintas porciones del anticuerpo pueden derivar de dos anticuerpos diferentes, como se describirá con mayor detalle más adelante. Las moléculas de unión al antígeno, los anticuerpos o los fragmentos de unión se pueden producir en hibridomas, mediante técnicas de ADN recombinante o mediante corte enzimático o químico de anticuerpos intactos. A menos que se indique de otra manera, el término "anticuerpo" incluye, además de los anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas livianas de longitud completa, derivados, variantes, fragmentos y mutaciones de estos, de los cuales se describen ejemplos más adelante. Además, a menos que se los excluya de manera explícita, los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, dominios de anticuerpos, anticuerpos sintéticos (conocidos en algunas ocasiones en la presente como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos,

fusiones de anticuerpos (conocidas en algunas ocasiones en la presente como "conjugados de anticuerpos"), y fragmentos de éstos, respectivamente.

Las regiones variables típicamente presentan la misma estructura general de regiones de marco (FR) relativamente conservadas unidas por las 3 regiones hipervariables (es decir, "CDR"). Las CDR de las dos cadenas de cada par típicamente están alineadas por las regiones de marco, que pueden permitir la unión con un epítipo específico. Desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, las regiones variables de las cadenas liviana y pesada típicamente comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Por convención, las regiones de CDR en la cadena pesada típicamente se conocen como CDR1, CDR2 y CDR3 HC. Las regiones CDR en la cadena ligera típicamente se conocen como LC CDR1, CDR2 y CDR3. La asignación de los aminoácidos a cada dominio típicamente es acorde con las definiciones de Kabat (*Seqs of Proteins of Immunological Interest* (NIH , Bethesda, MD (1987 y 1991)) o de Chothia (*J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *Nature*, 342: 878-883 (1989)). Se pueden emplear varios métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones CDR, que no sólo incluyen Kabat o Chothia, sino también la definición de AbM.

El término "cadena ligera" incluye una cadena ligera

completa y fragmentos de esta que tienen una secuencia suficiente de la región variable para conferir especificidad de unión. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de la región variable, VL, y un dominio de región constante, CL. El dominio de la región variable de la cadena ligera se encuentra en el extremo amino terminal del polipéptido. Las cadenas livianas incluyen cadenas kappa y cadenas lambda.

El término "cadena pesada" incluye una cadena pesada completa y fragmentos de esta que tienen una secuencia suficiente de la región variable para conferir especificidad de unión. Una cadena pesada completa incluye un dominio de la región variable, VH, y tres dominios de la región constante, CH1, CH2 y CH3. El dominio VH se encuentra en el extremo amino del polipéptido, y los dominios CH se encuentran en el extremo carboxilo, de los cuales CH3 es el más cercano al extremo carboxilo del polipéptido. Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier isotipo, que incluyen IgG (inclusive los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgA (inclusive los subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

El término "región variable" o "dominio variable" hace referencia a una porción de las cadenas livianas y/o pesadas de un anticuerpo, lo que típicamente incluye aproximadamente los 120 a 130 aminoácidos amino-terminales de la cadena

pesada y aproximadamente los 100 a 110 aminoácidos amino-terminales de la cadena ligera. La región variable de un anticuerpo típicamente determina la especificidad de un anticuerpo particular por su blanco.

La variabilidad no está distribuida homogéneamente en todos los dominios variables de los anticuerpos; está concentrada en subdominios de cada una de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana. Estos subdominios se denominan "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR). Las porciones más conservadas (es decir, no hipervariables) de los dominios variables se conocen como regiones de "marco" (FRM o FR) y proporcionan un andamiaje para las seis CDR en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. Los dominios variables de las cadenas pesada y livianas naturales comprenden cada uno cuatro regiones FRM (FR1, FR2, FR3 y FR4), que mayormente adoptan una configuración de lámina β , unidas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen muy próximas entre sí por el FRM y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen en la formación del sitio de unión al antígeno (véase Kabat et al., *loc. cit.*).

Los términos "CDR", y su forma en plural "CDRs", se refieren a la región determinante de complementariedad de las cuales tres conforman el carácter de unión de una región variable de la cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3) y tres conforman el carácter de unión de una región variable de la cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3). Las CDR contienen a la mayoría de los residuos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno y por ende contribuyen en la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: son los principales determinantes de la especificidad del antígeno.

Los límites y las longitudes exactos que definen las CDR son objeto de diferentes sistemas de clasificación y numeración. Por ello, se puede hacer referencia a las CDR mediante las definiciones de Kabat, Chothia, contacto o cualquier otra definición de los límites, inclusive el sistema de numeración que se describe en la presente. A pesar de los diferentes límites, cada uno de estos sistemas presenta algún grado de superposición en lo que constituyen las denominadas "regiones hipervariables" dentro de las secuencias variables. Las definiciones de CDR de acuerdo con estos sistemas pueden entonces diferir en cuanto a longitud y áreas del límite con respecto a la región de marco adyacente. Véase, por ejemplo, Kabat (un enfoque basado en la

variabilidad entre especies), Chothia (un enfoque basado en estudios cristalográficos de los complejos de antígeno-anticuerpo) y/o MacCallum (Kabat et al., *loc. cit.*; Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-917; y MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732). Aún otro estándar para caracterizar el sitio de unión al antígeno es la definición de AbM usada por el software de modelación de los anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véase, por ejemplo, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*; en: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). En la medida en que dos técnicas de identificación de residuos definen regiones superpuestas, pero no idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida. Sin embargo, se prefiere la numeración de acuerdo con el sistema conocido como Kabat.

Típicamente, las CDR forman una estructura de bucle que se puede clasificar como una estructura canónica. El término "estructura canónica" se refiere a la principal conformación de cadena 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 tan solo un repertorio limitado de conformaciones disponibles. Cada estructura canónica se puede caracterizar por los ángulos de torsión del esqueleto polipeptídico. Los

bucles entre anticuerpos correspondientes pueden entonces tener estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la elevada variabilidad de secuencias de aminoácidos en la mayor parte de los bucles (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia et al., *Nature*, 1989, 342: 877; Martin y Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Además, existe una relación entre la estructura adoptada por el bucle y las secuencias de aminoácidos que lo rodean. La conformación de una clase canónica particular está determinada por la longitud del bucle y los residuos de aminoácidos que residen en 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 efectuarse sobre la base de la presencia de estos residuos de aminoácidos clave.

El término "estructura canónica" también puede incluir consideraciones con respecto a la secuencia lineal del anticuerpo, por ejemplo, según Kabat (Kabat et al., *loc. cit.*). El esquema (sistema) de numeración de Kabat es un estándar adoptado ampliamente para la numeración de los residuos de aminoácidos de un dominio variable de un anticuerpo de una manera consistente y es el esquema preferido aplicado en la presente invención como también se menciona en otra parte en la presente. También se pueden usar

consideraciones estructurales adicionales para determinar la estructura canónica de un anticuerpo. Por ejemplo, aquellas diferencias que no se ven completamente reflejadas por la numeración de Kabat se pueden describir mediante el sistema de numeración de Chothia et al., y/o reveladas mediante otras técnicas, por ejemplo, cristalografía y modelación por computadora bi o tridimensional. Por lo tanto, se puede asignar una secuencia de anticuerpo dada a una clase canónica que permita, entre otros aspectos, identificar las secuencias básicas apropiadas (por ejemplo, basado en el deseo de incluir una variedad de estructuras canónicas en una biblioteca). La numeración de Kabat de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos y las consideraciones estructurales descritas por Chothia et al., *loc. cit.* y sus implicancias para interpretar aspectos canónicos de la estructura del anticuerpo, están descritas en la literatura. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas en la técnica. Por una revisión de la estructura de anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

La CDR3 de la cadena ligera y, en particular, la CDR3 de la cadena pesada pueden constituir los determinantes más

importantes en la unión al antígeno dentro de las regiones variables de las cadenas liviana y pesada. En algunas construcciones de anticuerpos, la CDR3 de la cadena pesada parece constituir la principal área de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Se pueden usar los esquemas de selección *in vitro*, en los cuales solamente varía la CDR3, para variar las propiedades de unión de un anticuerpo o para determinar los residuos que contribuyen en la unión de un antígeno. Por ende, la CDR3 típicamente es la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión al anticuerpo. Por ejemplo, H3 puede ser tan corto como de dos residuos de aminoácidos o puede ser de 26 aminoácidos.

El término "neutralización" 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 dicho ligando. Esto puede realizarse, por ejemplo, por medio del bloqueo directo de un sitio de unión en el ligando o mediante la unión al ligando y la alteración de la capacidad del ligando de unirse por medios indirectos (tal como por medio de alteraciones estructurales o energéticas en el ligando). En algunas formas de realización, el término también puede indicar una molécula de unión al antígeno que impide que la proteína a la que está unida lleve a cabo una función biológica.

El término "blanco" o "antígeno" hace referencia a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse a una molécula de unión al antígeno. En determinadas formas de realización, un blanco puede tener uno o más epítomos.

El término "competir", cuando se usa en el contexto de moléculas de unión a antígenos que compiten por el mismo epítomo, se refiere a la competencia entre las moléculas de unión a antígenos determinada mediante un ensayo en el cual la molécula de unión al antígeno (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo) que se está evaluando previene o inhibe (por ejemplo, reduce) la unión específico de una molécula de unión al antígeno de referencia a un antígeno. Se pueden usar numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si una molécula de unión al antígeno compete con otra, por ejemplo, un radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida (RIA), un inmunoensayo directo o indirecto en fase sólida con enzimas (EIA), un ensayo de competencia intercalado (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253); un EIA directo en fase sólida con biotina-avidina (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137: 3614-3619), un ensayo directo con marca en fase sólida, un ensayo intercalado directo con marca en fase sólida (Harlow y Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); un RIA directo en fase

sólida con el uso de una marca de I-125 (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15); un EIA directo en fase sólida con biotina-avidina (Cheung, et al., 1990, *Virology* 176: 546-552); y un RIA directo con una marca (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82). El término "epítopo" incluye cualquier determinante capaz de unirse a una molécula de unión al antígeno, tal como un scFv, un anticuerpo o una célula inmunitaria de la invención. Un epítopo es una región de un antígeno que se une a una molécula de unión al antígeno dirigida a dicho antígeno, y cuando el antígeno es una proteína, incluye aminoácidos específicos que están en contacto directo con la molécula de unión al antígeno.

Según se usa en la presente, los términos "marca" o "marcado" hacen referencia a la incorporación de una marca detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de unidades de biotina que pueden ser detectadas con avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que puede ser detectada con métodos ópticos o colorimétricos). En determinadas formas de realización, la marca o el marcador también pueden ser terapéuticos. Se pueden usar diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas que son conocidos en la técnica.

De acuerdo con la invención, en la presente se puede incorporar las técnicas se interruptores de control de activado-desactivado u otros tipos de técnicas de conmutación de control. Estas técnicas pueden emplear el uso de dominios de dimerización y activadores opcionales de dicha dimerización de dominios. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, las que describieron Wu et al., *Science* 2014 350 (6258) utilizando los sistemas de dimerización FKBP/Rapalog en algunas células, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. Se describe tecnología adicional sobre dimerización, por ejemplo, en Fegan et al., *Chem. Rev.* 2010, 110, 3315-3336 así como en las Patentes de los EE. UU. No: 5.830.462; 5.834.266; 5.869.337; y 6.165.787, cuyos contenidos también se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. Los pares de dimerización adicionales pueden incluir ciclosporina-A/receptor de ciclofilina, estrógeno/receptor de estrógeno (opcionalmente usando tamoxifeno), glucocorticoides/receptor de glucocorticoides, tetraciclina/receptor de tetraciclina, vitamina D/receptor de vitamina D. Otros ejemplos de tecnología de dimerización se pueden consultar, por ejemplo, en WO 2014/127261, WO 2015/090229, US 2014/0286987, US 2015/0266973, US 2016/0046700, Patente de los EE.UU. No: 8.486.693, US 2014/0171649 y US 2012/0130076, cuyos

contenidos también se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Las células T nativas se pueden (i) remover de un paciente, (ii) modificar genéticamente para expresar un receptor de un antígeno quimérico (CAR) que se une a por lo menos un antígeno tumoral (iii) expandir *ex vivo* formando una población más grande de células T modificadas y (iv) reintroducirlas en el paciente, utilizando una inmunoterapia adoptiva. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE. UU. No: 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 modificadas en el paciente, pueden mediar una respuesta inmunológica contra células que expresan al antígeno tumoral. Véase, por ejemplo, Krause et al., *J. Exp. Med.*, volumen 188, No. 4, 1998 (619-626). Esta respuesta inmunológica incluye secreción de IL-2 y otras citoquinas por células T, la expansión clonal de células T que reconocen al antígeno tumoral y muerte específica mediada por células T de células positivas para el blanco. Véase Hombach et al., *Journal of Immun.*, 167: 6123-6131 (2001).

Por ello, en algunos aspectos la invención comprende un método para tratar o prevenir una condición asociada con

niveles indeseados y/o elevados de FLT3 en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de por lo menos una molécula de unión al antígeno aislada, CAR o TCR divulgados en la presente.

Se proveen métodos para tratar enfermedades o trastornos, que incluyen cáncer. En algunas formas de realización, la invención se relaciona con la creación de una respuesta inmunológica mediada por células T en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de las células inmunitarias modificadas de la presente solicitud a dicho sujeto. En algunas formas de realización, la respuesta inmunológica mediada por células T está dirigida contra una o más células diana. En algunas formas de realización, la célula inmunitaria modificada comprende un receptor de un antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR). En algunas formas de realización, la célula diana es una célula tumoral. En algunos aspectos, la invención comprende un método para tratar o prevenir una forma maligna, donde dicho método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de por lo menos una molécula de unión al antígeno aislada que se describe en la presente. En algunos aspectos, la invención comprende un método para tratar o prevenir una forma maligna, donde dicho método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz

de por lo menos una célula inmunitaria, en donde dicha célula inmunitaria comprende por lo menos un receptor del antígeno quimérico, un receptor de células T y/o una molécula de unión al antígeno aislada como se describe en la presente.

En algunos aspectos, la invención comprende una composición farmacéutica que comprende por lo menos una molécula de unión al antígeno que se describió en la presente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además un agente activo adicional.

Las moléculas de unión a antígenos, los CAR, los TCR, las células inmunitarias y semejantes de la invención se pueden usar para tratar enfermedades mieloides que incluyen, pero en un sentido no taxativo, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielogénica 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 (MDS), trastorno mieloproliferativo, neoplasia mieloide, sarcoma mieloide) o combinaciones de los mismos. Otras enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, psoriasis, alergias, asma, enfermedad de Crohn,

IBD, IBS, fibromialgia, mastocitosis y enfermedad celíaca.

Se podrá apreciar que las dosis diana para las células CAR⁺/ CAR-T⁺/ TCR⁺ pueden variar en un intervalo de 1×10^6 - 2×10^{10} células/kg preferiblemente, 2×10^6 células/kg más preferiblemente. Se podrá apreciar que en determinados sujetos pueden ser apropiadas las dosis por encima y por debajo de este intervalo, y un profesional de la salud podrá determinar los niveles de dosis apropiados según necesidad. Adicionalmente, se pueden proveer múltiples dosis de células de acuerdo con la invención.

También se proveen métodos para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una célula modificada de la presente invención a dicho sujeto, en donde la célula comprende un receptor de un antígeno quimérico, un receptor de células T o un receptor del antígeno quimérico basado en el receptor de células T que comprende una molécula de unión al antígeno que se une a un antígeno sobre el tumor. En algunas formas de realización, el sujeto tiene un tumor sólido o una forma maligna sanguínea, tal como un linfoma o leucemia. En algunas formas de realización, la célula modificada se suministra en un lecho tumoral. En algunas formas de realización, el cáncer está presente en la médula ósea del sujeto.

En algunas formas de realización, las células

modificadas son células T autólogas. En algunas formas de realización, las células modificadas son células T alogénicas. En algunas formas de realización, las células modificadas son células T heterólogas. En algunas formas de realización, las células modificadas de la presente solicitud se transfectan o transducen *in vivo*. En otras formas de realización, las células modificadas se transfectan o transducen *ex vivo*.

Los métodos también pueden comprender administrar uno o más agentes quimioterapéuticos. En determinadas formas de realización, el agente quimioterapéutico es un quimioterapéutico redactor de linfocitos (preacondicionante). Los regímenes de tratamiento preacondicionantes beneficiosos, junto con los biomarcadores beneficiosos correlativos, se describen en las Solicitudes Provisionales de Patente de los EE. UU. No: 62/262.143 y 62/167.750 que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. Se describen, por ejemplo, métodos de acondicionamiento de un paciente que necesita de una terapia con células T que comprende administrar al paciente dosis beneficiosos específicos de ciclofosfamida (entre 200 mg/m²/día y 2000 mg/m²/día) y dosis específicas de fludarabina (entre 20 mg/m²/día y 900 mg/m²/día). Un régimen de dosis preferido comprende tratar un paciente mediante la administración diaria al paciente de

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 modificadas al paciente.

En otras formas de realización, la molécula de unión al antígeno, las células transducidas (o modificadas de otra manera) (tal como con CAR o TCR) y el agente quimioterapéutico se administran cada una en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección en el sujeto.

En determinadas formas de realización, las composiciones que comprenden las células inmunitarias efectoras que expresan CAR divulgadas en la presente se pueden administrar junto con cualquier número de agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXANTM); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina resume; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina,

prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinoestatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutenetimid, mitotano, trilostano; repositor de ácido fólico tal como el ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido

aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno;
 edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfomitina;
 acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio;
 hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona;
 mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet;
 pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida;
 procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio;
 ácido tenuazónico; triazicuona; 2',2''-triclorotrietilamina;
 uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol;
 mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C");
 ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel
 (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-
 Poulenc Rorer); clorambucilo, gemcitabine, 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
 topoisomerasa RFS2000; difluorometilornitina (DMFO);
 derivados de ácido retinoico tales como Targretin™
 (bexaroteno), Panretin™, (alitretinoína); ONTAK™
 (denileuquina diftitox); esperamicinas; capecitabina; y
 sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de
 cualquiera de los mencionados. Esta definición también

incluye agentes anti-hormonales, que actúan en la regulación o inhibición de la acción de la hormona en tumores, tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquier de los mencionados. También se administran combinaciones de agentes quimioterapéuticos cuando fuera apropiado, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, CHOP, es decir, ciclofosfamida (Cytosan®), doxorubicina (hidroxidoxorubicina), vincristina (Oncovin®) y prednisona.

En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico se administra al mismo tiempo o en el transcurso de una semana después de la administración de la célula o el ácido nucleico modificado. En otras formas de realización, el agente quimioterapéutico se administra entre 1 y 4 semanas o entre 1 semana y 1 mes, entre 1 semana y 2 meses, entre 1 semana y 3 meses, entre 1 semana y 6 meses, entre 1 semana y 9 meses o entre 1 semana y 12 meses después de administrar la célula o el ácido nucleico modificado. En otras formas de realización, el agente quimioterapéutico se

administra por lo menos 1 mes antes de administrar la célula o el ácido nucleico. En algunas formas de realización, los métodos también comprenden administrar dos o más agentes quimioterapéuticos.

Se puede usar una variedad de agentes terapéuticos adicionales junto con las composiciones que se describen en la presente. Por ejemplo, los agentes terapéuticos adicionales potencialmente útiles incluyen inhibidores de PD-1 tales como nivolumab (Opdivo®), pembrolizumab (Keytruda®), pembrolizumab, pidilizumab y atezolizumab.

Los agentes terapéuticos adicionales adecuadas que son de utilidad en combinación con la invención incluyen, pero en un sentido no taxativo, ibrutinib (Imbruvica®), ofatumumab (Arzerra®), rituximab (Rituxan®), bevacizumab (Avastin®), trastuzumab (Herceptin®), trastuzumab emtansina (KADCYLA®), imatinib (Gleevec®), cetuximab (Erbitux®), panitumumab (Vectibix®), catumaxomab, ibritumomab, ofatumumab, tositumomab, brentuximab, alemtuzumab, gemtuzumab, erlotinib, gefitinib, vandetanib, afatinib, lapatinib, neratinib, 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, adipotida, denileuquina diftitox, inhibidores de mTOR tales como Everolimus y Temsirolimus, inhibidores de la vía Hedgehog tales como sonidegib y vismodegib, inhibidores de CDK tal como un inhibidor de CDK (palbociclib).

En formas de realización adicionales, la composición que comprende células inmunitarias que contienen CAR se puede administrar con un agente antiinflamatorio. Los agentes o fármacos antiinflamatorios incluyen, pero en un sentido no taxativo, esteroides y glucocorticoides (que incluyen betametasona, budesónida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAID) que incluyen aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicaciones anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato. Los ejemplos de NSAID incluyen ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inhibidores de Cox-2 y sialilatos. Los ejemplos de analgésicos incluyen acetaminofeno, oxicodona, tramadol de clorhidrato de propoxifeno. Los ejemplos de glucocorticoides incluyen cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona,

prednisolona o prednisona. Los ejemplos de modificadores de la respuesta biológica incluyen moléculas dirigidas contra marcadores de la superficie celular (por ejemplo, CD4, CD5, etc.), inhibidores de citoquinas, tales como los antagonistas de TNF, (por ejemplo, etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®) e infliximab (REMICADE®), inhibidores de quimioquinas e inhibidores de moléculas de adhesión. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales, así como formas recombinantes de las moléculas. Los ejemplos de DMARD incluyen azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, oro (oral (auranofina) e intramuscular) y minociclina.

En determinadas formas de realización, las composiciones que se describen en la presente se administran junto con una citoquina. El término "citoquina", según se usa en la presente, se refiere a las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de citoquinas incluyen linfoquinas, monoquinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Las citoquinas incluyen hormonas de crecimiento, tales como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento N-metionilo humana y la hormona de crecimiento bovina; la hormona paratiroidea;

tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; las hormonas glicoproteicas, tales como la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona estimulante de tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático (HGF); el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); prolactina; lactógeno placentario; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado con gonadotrofinas de ratón; inhibina; activina; el factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de los nervios (NGF), tal como NGF-alfa; el factor de crecimiento de plaquetas; los factores de crecimiento transformantes (TGF), tales como TGF-alfa y TGF-beta; los factores de crecimiento tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductores; interferones, tales como los interferones alfa, beta y gamma; los factores estimulantes de colonias (CSF), tales como el CSF de macrófagos (M-CSF), el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (IL), tales como IL-1, IL-1-alfa, 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, que incluyen LIF y el ligando Kit (KL). Según se usa en la presente, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos

de células recombinantes, y equivalentes con actividad biológica de las secuencias de citoquinas nativas.

En algunos aspectos, la invención comprende una molécula de unión al antígeno que se une al FLT3 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

Se puede utilizar una variedad de técnicas conocidas en la elaboración de los polinucleótidos, polipéptidos, vectores, moléculas de unión a antígenos, células inmunitarias, composiciones y semejantes de acuerdo con la invención.

Antes de la manipulación o modificación genética *in vitro* de las células inmunitarias que se describen en la presente, se pueden obtener células de un sujeto. En algunas formas de realización, las células inmunitarias comprenden células T. Las células T se pueden obtener de numerosas fuentes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), médula ósea, tejido de nódulos linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido de bazo y tumores. En determinadas formas de realización, las células T se pueden obtener de una unidad de sangre recolectada del

sujeto usando cualquiera de numerosas técnicas conocidas por el especialista, tal como separación con FICOLL™. Las células preferiblemente se pueden obtener de la sangre circulante de un individuo por aféresis. El producto de una aféresis contiene típicamente linfocitos, que incluyen células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En determinadas formas de realización, las células recolectadas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción plasmática y colocar en una solución amortiguadora o medio apropiado para el procesamiento subsiguiente. Las células se pueden lavar con PBS. Como se podrá apreciar, se puede emplear un paso de lavado, tal como usar una centrífuga de flujo semiautomática - por ejemplo, el procesador de células Cobe™ 2991, el Baxter CytoMate™ o semejantes. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una variedad de soluciones amortiguadoras biocompatibles, u otra solución salina con o sin solución amortiguadora. En determinadas formas de realización, se pueden eliminar los componentes indeseados de la muestra de la aféresis.

En determinadas formas de realización, se aíslan células T de las PBMC mediante lisado de los glóbulos rojos y agotamiento de monocitos, por ejemplo, usando centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™. Se puede aislar además

una subpoblación de células T específica, tales como células T CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ y CD45RO⁺ mediante técnicas de selección positiva o negativa que son conocidas en la técnica. Por ejemplo, el enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede efectuar con una combinación de anticuerpos dirigidos a los marcadores de superficie que son únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método de utilidad en la presente es la separación de células y/o la selección por medio de inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo, que emplea un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a los marcadores de la superficie celular presentes sobre las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para el enriquecimiento en células CD4⁺ mediante selección negativa, el cóctel de anticuerpos monoclonales incluye típicamente anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. También se puede usar citometría de flujo y separación de células para aislar poblaciones de células de interés que son de utilidad en la presente invención.

Las PBMC se pueden usar directamente para la modificación genéticas con las células inmunitarias (tales como CAR o TCR) usando los métodos que se describen en la presente. En determinadas formas de realización, después de aislar las PBMC, se pueden aislar adicionalmente los

linfocitos T y se pueden separar tanto linfocitos T citotóxicas como auxiliares en subpoblaciones de células T no expuestas con anterioridad, de memoria y efectoras, ya sea antes o después de la modificación y/o expansión genética.

En algunas formas de realización, también se separan células CD8⁺ en células no expuestas con anterioridad, de memoria central y efectoras mediante la identificación de los antígenos de la 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 las células T de memoria central incluyen 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 la granzima B y perforina. En determinadas formas de realización, también se separan células T CD4⁺ en subpoblaciones. Por ejemplo, las células T auxiliares CD4⁺ se pueden separar en células no expuestas con anterioridad, de memoria central y efectoras mediante identificación de poblaciones de células que presentan antígenos sobre la superficie celular.

Las células inmunitarias, tales como células T, se pueden modificar genéticamente después del aislamiento usando

métodos conocidos, o las células inmunitarias se pueden activar y expandir (o diferenciar en el caso de los progenitores) *in vitro* antes de modificarlas genéticamente. En otra forma de realización, las células inmunitarias, tales como células T, están modificadas genéticamente con los receptores de antígenos quiméricos que se describen en la presente (por ejemplo, fueron transducidas 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 células T son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. NO: 6.905.874; la Patente de los EE. UU. NO: 6.867.041; la Patente de los EE. UU. NO: 6.797.514; y en PCT WO2012/079000, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. En general, dichos métodos incluyen poner PBMC o células T aisladas en contacto con un agente estimulante y un agente coestimulante, tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, generalmente unidos a una esfera u otra superficie, en un medio de cultivo con las citoquinas apropiadas, tal como IL-2. Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la misma esfera sirven como una célula presentadora de antígeno (APC) "sustituta". Un ejemplo es el sistema Dynabeads®, un sistema activador/estimulante de CD3/CD28 para la activación fisiológica de células T humanas.

En otras formas de realización, las células T se pueden activar y estimular para proliferar con células nutrientes y los anticuerpos y citoquinas apropiados usando métodos tales como los que se describen en la Patente de los EE. UU. NO: 6.040.177; la Patente de los EE. UU. NO: 5.827.642; y en WO2012129514, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

Algunos métodos para elaborar las construcciones y las células inmunitarias modificadas de la invención se describen en la Solicitud PCT PCT/US15/14520, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. Otros métodos de elaboración de las construcciones y las células se pueden consultar en la Solicitud Provisional de Patente de los EE. UU. NO: 62/244036, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

Se podrá apreciar que las PBMC también pueden incluir otros linfocitos citotóxicos, tales como células NK o células T NK. Se puede introducir un vector de expresión que comprende la secuencia codificante de un receptor quimérico descrito en la presente en una población de células T, células NK o células T NK donantes humanas. Las células T transducidas exitosamente que comprenden el vector de expresión se pueden separar usando citometría de flujo para aislar las células T CD3 positivas y luego se pueden propagar

para aumentar el número de estas células T que expresan CAR además de la activación de células usando anticuerpos anti-CD3 e IL-2 u otros métodos conocidos en la técnica que se describen en otra parte en la presente. Se emplean procedimientos estándar para la crioconservación de células T que expresan el CAR para su almacenamiento y/o para su preparación antes de su uso en un sujeto humano. En una forma de realización, la transducción, cultivo y/o expansión de células T *in vitro* se efectúan en la ausencia de productos derivados de un animal no humano, tal como suero fetal de ternera y suero fetal bovino.

Para la clonación de polinucleótidos, el vector se puede introducir en una célula hospedera (una célula hospedera aislada) para permitir la replicación del propio vector y así amplificar las copias del polinucleótido contenido en el mismo. Los vectores de clonación pueden contener los componentes de secuencias que en general, en un sentido no taxativo, un origen de replicación, secuencias promotoras, secuencias iniciadoras de la transcripción, secuencias potenciadoras y marcadores seleccionables. Estos elementos los puede seleccionar, según corresponda, un especialista en la técnica. Por ejemplo, el origen de replicación se puede seleccionar para promover una replicación autónoma del vector en la célula hospedera.

En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee células hospederas aisladas que contienen el vector provisto en la presente. Las células hospederas que contiene el vector pueden ser de utilidad en la expresión o clonación del polinucleótido contenido en el vector. Las células hospederas adecuadas pueden incluir, en un sentido no taxativo, células procariotas, células fúngicas, células de levadura o células eucariotas superiores, tales como células de mamífero. Las células procariotas adecuadas para este propósito incluyen, en un sentido no taxativo, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*.

El vector se puede introducir en la célula hospedera usando cualquiera de los métodos adecuados conocidos en la técnica que incluyen, en un sentido no taxativo, administración mediada por DEAE-dextrano, el método de precipitación por fosfato de calcio, administración mediada por lípidos catiónicos, transfección mediada por liposomas, electroporación, bombardeo con microproyectiles,

administración de genes mediada por receptores, administración mediada por polilisina, histona, quitosano y péptidos. Los métodos estándar de 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 usar una mezcla de diferentes vectores de expresión en la modificación genética de una población donante de células inmunitarias efectoras, en donde cada vector codifica un CAR diferente descrito en la presente. Las células inmunitarias efectoras transducidas resultantes forman una población mixta de células modificadas, con una proporción de las células modificadas expresan más de un CAR diferente.

En una forma de realización, la invención provee un método para guardar las células modificadas genéticamente que expresan CAR o TCR dirigidas a la proteína FLT3. Esto comprende crioconservar las células inmunitarias de manera tal que las células permanezcan viables tras el descongelamiento. Se puede crioconservar una fracción de las células inmunitarias que expresan los CAR mediante métodos conocidos en la técnica para proporcionar una fuente permanente de dichas células para el tratamiento futuro de pacientes afectados con una forma maligna. Cuando fuera necesario, las células inmunitarias transformadas

crioconservadas se pueden descongelar, hacer crecer y expandir para obtener más de dichas células.

Según se usa en la presente, el término "crioconservar" se refiere a la conservación de células mediante enfriamiento a temperaturas bajo cero, tal como (típicamente) 77 grados Kelvin o -196°C (el punto de ebullición de nitrógeno líquido). Los agentes crioprotectores a menudo se usan a temperaturas bajo cero para preservar a las células contra los daños debido al congelamiento a temperaturas bajas o el calentamiento a temperatura ambiente. Los agentes crioconservadores y los índices de enfriamiento óptimos pueden ofrecer protección contra lesiones celulares. Los agentes crioprotectores que se pueden usar de acuerdo con la invención incluyen, pero en un sentido no taxativo: dimetilsulfóxido (DMSO) (Lovelock & Bishop, *Nature* (1959); 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature* (1961); 190: 1204-1205), glicerol, polivinilpirrolidona (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1960); 85: 576) y polietilenglicol (Sloviter & Ravdin, *Nature* (1962); 196: 48). La velocidad de enfriamiento preferida es de $1-3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.

El término, "sustancialmente puro" se usa para indicar que un componente dado está presente a un nivel alto. Preferiblemente, el componente es el componente predominante que está presente en una composición. Preferiblemente está

presente a un nivel de más del 30%, de más del 50%, de más del 75%, de más del 90% o aún de más del 95%, donde dicho nivel se determina sobre una base de peso seco/peso seco con respecto a la composición total en consideración. A niveles muy altos (por ejemplo, a niveles de más del 90%, de más del 95% o de más del 99%) se puede considerar que el componente se encuentra en una "forma pura". Las sustancias biológicamente activas de la presente invención (que incluyen polipéptidos, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas de unión a antígenos, porciones) se pueden proveer en una forma que está sustancialmente libre de uno o más contaminantes con los cuales de lo contrario la sustancia estaría asociada. Cuando una composición está sustancialmente libre de un contaminante dado, dicho contaminante se encontrará a un nivel bajo (por ejemplo, a un nivel de menos del 10%, menos del 5% o menos del 1% sobre la base del peso seco/peso seco como se indicó antes).

En algunas formas de realización, las células se formulan primero mediante cosecha de estas a partir de su medio de cultivo y luego lavado y concentración de las células en un medio y un sistema contenedor adecuado para su administración (un vehículo "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. Los medios de infusión adecuados pueden comprender cualquier formulación de

un medio isotónico, típicamente salina normal, Normosol™ R (Abbott) o Plasma-Lyte™ A (Baxter), pero también se puede utilizar dextrosa al 5% en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión se puede suplementar con albúmina de suero humano.

Las cantidades de tratamiento deseadas de las células presentes en la composición generalmente es de por lo menos 2 células (por ejemplo, por lo menos 1 subconjunto de células T de memoria central CD8⁺ y por lo menos 1 subconjunto de células T auxiliares CD4⁺) o más típicamente es de más de 10² células y hasta 10⁶, hasta e inclusive 10⁸ o 10⁹ células y puede ser de más de 10¹⁰ células. El número de células dependerá del uso deseado pretendido de la composición y del tipo de células incluidas en la misma. La densidad de las células deseadas típicamente es mayor que 10⁶ células/ml y en general es mayor que 10⁷ células/ml, generalmente 10⁸ células/ml o mayor. El número de células inmunitarias clínicamente relevante se puede distribuir en múltiples infusiones que acumuladas son iguales o exceden 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹ o 10¹² células. En algunos aspectos de la presente invención, en particular dado que todas las células infundidas serán redirigidas a un antígeno blanco particular (FLT3), se puede administrar una cantidad menor de células, en el intervalo de 10⁶/kilogramo (10⁶-10¹¹ por paciente). Los

tratamientos con CAR se pueden administrar múltiples veces a dosificaciones dentro de estos intervalos. Las células pueden ser autólogas, alogénicas o heterólogas para el paciente que recibe la terapia.

Las poblaciones de células que expresan CAR de la presente invención se pueden administrar ya sea solas, o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones de células. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población de células que expresan CAR o TCR, tales como células T, como se describe en la presente, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender soluciones amortiguadoras tales como una solución amortiguadora salina neutra, una solución amortiguadora salina de fosfato y semejantes; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tal como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tal como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención preferiblemente se formulan para una administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas (soluciones,

suspensiones o similares) pueden incluir uno o más de los siguiente: diluyentes estériles tales como agua para inyecciones, solución salina, preferiblemente salina fisiológica, solución Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites modificados tales como mono o diglicéridos sintéticos que podrán servir como solvente o como un 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 de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; soluciones amortiguadoras tales como acetatos, citratos o fosfato, y agentes para ajustar la tonicidad, tales como dextrosa o cloruro de sodio. La preparación parenteral se puede incluir en ampolletas, en jeringas descartables o en viales de múltiples dosis, tanto de plástico como de vidrio. Una composición farmacéutica inyectable preferiblemente es estéril.

Se podrá apreciar que es posible minimizar los eventos adversos mediante transducción de las células inmunitarias (que contienen uno o más CAR o TCR) con un gen suicida. También puede ser deseable incorporar un interruptor inducible "activador" o "acelerador" en las células inmunitarias. Las técnicas adecuadas incluyen el uso de una caspasa-9 (Solicitud de Patente de los EE. UU. NO:

2011/0286980) o una timidina quinasa inducible, antes, después o al mismo que se transducen las células con la construcción CAR de la presente invención. Otros métodos para introducir genes suicidas y/o interruptores "activados" incluyen TALEN, dedos de zinc, ARNi, ARNsi, ARNhs, tecnología antisentido y otras técnicas conocidas en la técnica.

Se comprenderá que las descripciones de la presente solamente se ofrecen a efectos de ejemplo y explicación y no en un sentido restrictivo de la invención reivindicada. En esta solicitud, el uso del singular incluye al plural a menos que específicamente se defina de otra manera.

Los encabezados de sección utilizados en la presente solamente sirven a efectos de una mejor organización y no deben considerarse como limitantes del objeto descrito. Todos los documentos, o porciones de documento, citados en la solicitud que incluyen, en un sentido no limitativo, patentes, solicitudes de patente, artículos, libros y tratados, se incorporan expresamente y por completo en la presente a modo de referencia. Según se utilizan de acuerdo con la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique de otra manera, tendrán el significado indicado a continuación:

En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que

incluye/n", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo. Además, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan los elementos y los componentes que constituyen una unidad, y los elementos y los componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

El término "actividad de FLT3" incluye cualquier efecto biológico de FLT3. En determinadas formas de realización, la actividad de FLT3 incluye la capacidad de FLT3 para interactuar o unirse a un sustrato o receptor.

El término "polinucleótido", "nucleótido" o "ácido nucleico" incluye polímeros de nucleótidos de cadena simple o de cadena doble. Los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Estas modificaciones incluyen modificaciones de las bases, tales como la bromouridina y los derivados de inosina, modificaciones de la ribosa, tales como la 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de los enlaces entre los nucleótidos, tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenato, fosforodiselenato, fosforoanilotioato, fosforaniladato y fosforoamidato.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido que comprende 200 nucleótidos o menos. Los

oligonucleótidos pueden ser de cadena simple o de cadena doble, por ejemplo, para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos pueden estar orientados en el sentido del marco de lectura o antisentido. Un oligonucleótido puede incluir una marca, incluyendo una radiomarca, una marca fluorescente, un hapteno o una marca antigénica, para los ensayos de detección. Los oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, como cebadores de PCR, cebadores de clonación o sondas de hibridación.

El término "secuencia de control" hace referencia a una secuencia de polinucleótidos que puede afectar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que está unida. La naturaleza de estas secuencias de control puede depender del organismo hospedero. En formas de realización particulares, las secuencias de control para procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión a ribosomas y una secuencia de terminación de la transcripción. Por ejemplo, las secuencias de control para los eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencias de terminación de la transcripción. Las "secuencias de control" pueden incluir secuencias directrices (péptidos de señal) y/o secuencias de miembros de fusión.

Según se usa en la presente, el término "ligado operativamente" significa que los componentes abarcados por el término se hallan en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes bajo condiciones apropiadas.

El término "vector" hace referencia a cualquier molécula o entidad (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) usada para transferir información que codifica proteínas a una célula hospedera. El término "vector de expresión" o "construcción de expresión" hace referencia a un vector que es apropiado para transformar una célula hospedera y contiene secuencias de ácidos nucleicos que dirige y/o controla (en combinación con la célula hospedera) la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas unidas operativamente. Una construcción de expresión puede incluir, pero en un sentido no taxativo, secuencias que afectan o controlan la expresión, la traducción, y si hay intrones presentes, afectan la separación del ARN de una región codificante unida operativamente.

El término "célula hospedera" se refiere a una célula que ha sido transformada o puede ser transformada con una secuencia de ácido nucleico, por lo que expresa un gen de interés. El término incluye la progenie de la célula progenitora, ya sea que dicha progenie tenga una morfología o una composición genética idéntica o no a la de la célula

progenitora original, siempre que esté presente el gen de interés.

El término "transformación" hace referencia a un cambio en las características genéticas de las células, y una célula ha sido transformada cuando ha sido modificada para que contenga nuevo ADN o ARN. Por ejemplo, una célula está transformada cuando ha sido modificada genéticamente respecto de su estado nativo mediante la introducción de nuevo material genético utilizando procedimientos de transfección, transducción u otros. Después de la transfección o la transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándolo físicamente en un cromosoma de la célula, puede mantenerse de manera transitoria como un elemento episomal, sin que se replique, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula ha sido "transformada de manera estable" cuando el ADN transformante se replica al dividirse la célula.

El término "transfección" se refiere a la captación de ADN extraño o exógeno por una célula. En la técnica se conocen numerosos procedimientos de transformación, los cuales se describen en la presente. Véanse, 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.

El término "transducción" se refiere al proceso por el cual se introduce un ADN extraño en una célula por medio de un vector viral. Véase Jones et al., (1998), *Genetics: principles and analysis*, Boston: Jones & Bartlett Publ.

Los términos "polipéptido" o "proteína" se refieren a una macromolécula que tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína, incluyendo supresiones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. Los términos "polipéptido" y "proteína" abarcan específicamente las moléculas de unión al antígeno FLT3, los anticuerpos o las secuencias que tienen supresiones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la proteína de unión al antígeno. El término "fragmento de polipéptido" hace referencia a un polipéptido que tiene una supresión amino-terminal, una supresión carboxilo-terminal y/o una supresión interna, en comparación con la proteína nativa de longitud completa. Estos fragmentos también pueden contener aminoácidos modificados en comparación con la proteína nativa. Los fragmentos de polipéptidos que son de utilidad incluyen fragmentos inmunológicamente funcionales de las moléculas de unión a antígenos. Los fragmentos que son de utilidad incluyen, pero en un sentido no taxativo, una o más regiones CDR, dominios variables de una cadena pesada y/o

liviana, una porción de otras porciones de una cadena de anticuerpo y semejantes.

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

Una "variante" de un polipéptido (por ejemplo, una molécula de unión al antígeno o un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos donde se ha insertado, suprimido y/o reemplazado uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos, en comparación con otra secuencia de polipéptido. Las variantes incluyen las proteínas de fusión.

El término "identidad" hace referencia a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptidos, o dos o más moléculas de ácidos nucleicos, determinada alineando y comparando las secuencias. El "porcentaje de identidad" hace referencia al porcentaje de residuos

idénticos entre los aminoácidos o los nucleótidos en las moléculas comparadas, y se calcula sobre la base del tamaño de la más pequeña de las moléculas a comparar. Para estos cálculos, las faltas de coincidencia en los alineamientos (si hubiere alguna) se tratan preferiblemente con un modelo o un programa informático particular (es decir, un "algoritmo").

Para calcular el porcentaje de identidad, las secuencias a comparar se alinean de una manera que proporciona la coincidencia más grande entre las secuencias. Un ejemplo de un programa informático para determinar el porcentaje de identidad es el conjunto de programas GCG, que incluye GAP (Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.*, 12: 387; *Genetics Computer Group*, University of Wisconsin, Madison, Wis.). El algoritmo informático GAP se usa para alinear dos polipéptidos o polinucleótidos cuyo porcentaje de identidad de secuencia se desea determinar. Las secuencias se alinean de modo de obtener una coincidencia óptima de sus aminoácidos o nucleótidos respectivos (la "extensión de coincidencia" determinada por el algoritmo). En determinadas formas de realización, el algoritmo también emplea una matriz de comparación convencional (véanse Dayhoff et al., 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5: 345-352 con relación a la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 10915-10919 con relación a

la matriz de comparación BLOSUM 62).

Tal como se utilizan aquí, los veinte aminoácidos convencionales (por ejemplo, naturales) y sus abreviaturas se emplean según el uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2ª Edición, Golub y Gren, Eds., Sinauer Assoc., Sunderland, Mass. (1991)), incorporada en la presente a modo de referencia para todo propósito. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α -, α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetilisina, e-N-acetilisina, 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 usada en la presente, la dirección hacia la izquierda es la dirección amino terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxilo terminal, de acuerdo con la convención y el uso estándar.

Las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden

abarcas residuos de aminoácidos no naturales, que típicamente se incorporan mediante síntesis química de péptidos en lugar de síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de grupos de aminoácidos. Los residuos naturales se pueden dividir en clases basado en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- a) hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c) ácidos: Asp, Glu;
- d) básicos: His, Lys, Arg;
- e) residuos que afectan la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- f) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden comprender el intercambio de un miembro de una de las clases anteriores por un miembro de otra clase. Dichos residuos sustituidos se pueden introducir, por ejemplo, en las regiones del anticuerpo que son homólogas de los anticuerpos no humanos o en regiones no homólogas de la molécula.

Al efectuar cambios en la molécula de unión al antígeno, los dominios coestimulantes o activadores de la célula T modificada, de acuerdo con determinadas formas de realización, se puede considerar el índice hidropático de los

aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga. Las mismas son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (-4,5). Véase Kyte et al., *J. Mol. Biol.*, 157: 105-131 (1982). Se sabe asimismo que es posible sustituir determinados aminoácidos por otros aminoácidos que tienen un índice o calificación hidropático similar y aún retener una actividad biológica similar. Se sabe asimismo en la técnica que se puede lograr eficazmente la sustitución de aminoácidos iguales sobre la base de la hidrofiliidad, en particular cuando se pretende utilizar la proteína o péptido biológicamente funcional así creada en formas de realización inmunológicas, como en el presente caso. En la TABLA 2 se muestran ejemplos de sustituciones de aminoácidos.

Tabla 2

Residuos originales	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
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
	ácido, Gln, Asn	
Met	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe	Val; Leu; Ile	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	

El término “derivado” hace referencia a una molécula que incluye una modificación química distinta de una inserción, una supresión o una sustitución de aminoácidos (o ácidos

nucleicos). En determinadas formas de realización, los derivados comprenden modificaciones covalentes, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, la unión química con polímeros, lípidos u otras unidades orgánicas o inorgánicas. En determinadas formas de realización, una molécula de unión al antígeno que ha sido sometida a una modificación química puede tener una vida media en circulación más prolongada que una molécula de unión al antígeno que no ha sido sometida a una modificación química. En algunas formas de realización, un derivado de una molécula de unión al antígeno ha sido modificado por medios covalentes para incluir uno o más polímeros unidos solubles en agua, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol.

Los análogos de péptidos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como drogas no peptídicas con propiedades análogas a las del péptido templado. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "péptidos miméticos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J., *Adv. Drug Res.*, 15: 29 (1986); Veber y Freidinger, *TINS*, página 392 (1985); y Evans et al., *J. Med. Chem.*, 30: 1229 (1987), que se incorporan en la presente a modo de referencia para cualquier propósito.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una molécula de unión al antígeno FLT3

determinada para producir una respuesta terapéutica en un mamífero. Un especialista en la técnica puede determinar fácilmente dichas cantidades terapéuticamente eficaces.

Los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente, e incluyen sujetos humanos y animales no humanos, y también aquellos con trastornos diagnosticados de manera formal, aquellos sin trastornos diagnosticados de manera formal, aquellos que reciben atención médica, aquellos en riesgo de desarrollar los trastornos, etc.

Los términos "tratar" y "tratamiento" incluyen tratamientos terapéuticos, tratamientos profilácticos y aplicaciones donde se reduce el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno, u otro factor de riesgo. El tratamiento no requiere la curación completa de un trastorno y abarca formas de realización donde se reducen los síntomas o los factores de riesgo subyacentes. El término "prevenir" no requiere una eliminación de 100% de la posibilidad de un evento. En su lugar, indica que la probabilidad de que el acontecimiento ocurra ha sido reducida en presencia del compuesto o el método.

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 los procedimientos

de purificación se pueden llevar a cabo de acuerdo con las especificaciones de los proveedores, de maneras conocidas en la técnica o como se describe en la presente. Las técnicas y los procedimientos mencionados en general se pueden llevar a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen en toda la presente descripción. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), cuyo contenido se incorpora en la presente a modo de referencia para cualquier propósito.

Las siguientes secuencias servirán como ejemplos adicionales de la invención.

ADN extracelular, transmembrana, intracelular de CD28T

CTTGATAATGAAAAGTC

AAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGT
CCATCCAAGCCATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGC
TCGTCACCGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAG
CGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTAC
GCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGC (SEQ ID NO: 1)

AA extracelular, transmembrana, intracelular de CD28T:

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP FWVLVVVGGV LACYSLLVTV
AFIIFWVRSK RSRLHSDYM NMTPRRPGPT RKHYQPYAPP RDFAAYRS (SEQ ID

NO: 2)

ADN: extracelular de CD28T

CTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACAATCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTG
TCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGCCA (SEQ ID NO: 3)

AA: extracelular de CD28T

LDNEKSNGTI IHVKGKHLCP SPLFPGPSKP (SEQ ID NO: 4)

ADN del dominio transmembrana de CD28

TTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCAC
CGTGGCTTTTATAATCTTCTGGGTT (SEQ ID NO: 5)

AA del dominio transmembrana de CD28

FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWV (SEQ ID NO: 6)

ADN del dominio intracelular de CD28

AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCG
CCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTAT
CGGAGC (SEQ ID NO: 7)

AA del dominio intracelular de CD28

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 8)

ADN de CD3 zeta

AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCA
ACTGTATAACGAGCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGA
GGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAACCAAGACGAAAAACCCCCAGGAGGGTCTCTATA
ATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCG
GAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGATACT
TATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO: 9)

AA de CD3 zeta

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
 GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ
ID NO: 10)

ADN de CD28

ATTGAGGTGATGTATCCACCGCCTTACCTGGATAACGAAAAGAGTAACGGTACCAT
 CATTACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCTTCTCCCCTCTTCCCCGGGCCATCAAAGCCC
(SEQ ID NO: 11)

AA de CD28

IEVMYPPPILO DNEKSNGTII HVKGKHLCPs PLFPGPSKP (SEQ ID NO:
12)

ADN del dominio extracelular y transmembrana de CD8

GCTGCAGCATTGAGCAACTCAATAATGTATTTTAGTCACTTTGTACCAGTGTTCCTT
 GCCGGCTAAGCCTACTACCACACCCGCTCCACGGCCACCTACCCCAGCTCCTACCATCGCT
 TCACAGCCTCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCTTGCCGACCGGCCGAGGGGGCGCTGTTTCATA
 CCAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGATATCTATATCTGGGCACCCCTGGCCGGAACCTGCGG
 CGTACTCCTGCTGTCCCTGGTCATCACGCTCTATTGTAATCACAGGAAC (SEQ ID NO:
13)

AA del dominio extracelular y transmembrana de CD8

AAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
 AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO: 14)

ADN del clon 10E3 HC

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCAC
 GCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTTCTCACTCATCAATGCTAGAATGGGTGTGAGCTGGATC

CGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGCCGAAAAAT
 CGTACAGGACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGT
 GGTCTTACCATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGATA
 CCAGGCTACGGTGGTAACGGGGACTACCACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGA
 CCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 15)

AA del clon 10E3 HC - Las CDR están subrayadas

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLINNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN
AEKSYRTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARIPGYGGNGDYHYYGMDVW
 GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 16)

AA del clon 10E3 HC de la CDR1: NARMGVS (SEQ ID NO:
17)

AA del clon 10E3 HC de la CDR2: HIFSNAEKSYRTSLKS (SEQ
 ID NO: 18)

AA del clon 10E3 HC de la CDR3: IPGYGGNGDYHYYGMDV
 (SEQ ID NO: 19)

ADN del clon 10E3 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTCTAGGAGACAGAGT
 CACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAA
 CCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCTTCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT
 CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCC
 TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATAATTTCCCGTGGACGTTTCGGTCAG
 GGAACGAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO: 20)

AA del clon 10E3 LC (las CDR están subrayadas)

DIQMTQSPSSLSASLGDRVTTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYASSTLQS

GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNNFPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID
NO: 21)

AA del clon 10E3 LC de la CDR1: RASQGIRNDLG (SEQ ID
NO: 22)

AA del clon 10E3 LC de la CDR2: ASSTLQS (SEQ ID NO:
23)

AA del clon 10E3 LC de la CDR3: LQHNNFPWT (SEQ ID
NO: 24)

ADN del clon 2E7 HC

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACCCTCAC
 GCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTTCTCACTCAGGAATGCTAGAATGGGTGTAAGCTGGATC
 CGTCAGCCTCCCGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTTTTCGAATGACGAAAAAA
 CCTACAGCACATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCTCCAGGGACACCTCCAAAGGCCAGGT
 GGTCCTTACCATGACCAAGATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGATA
 CCCTACTATGGTTCGGGGAGTCATAACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGG
 TCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 25)

AA del clon 2E7 HC (las CDR están subrayadas)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLRNNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSN
DEKTYSTSLKSRLTISRDTSKGQVVLTMTKMDPVDTATYYCARIPYYGSGSHNYGMDVWGQ
 GTTVTVSS (SEQ ID NO: 26)

AA del clon 2E7 HC de la CDR1:NARMGVS (SEQ ID NO: 17)

AA del clon 2E7 HC de la CDR2:HIFSNDEKTYSTSLKS (SEQ ID
 NO: 18)

AA del clon 2E7 HC de la CDR3:IPYYGSGSHNYGMDV (SEQ ID

NO: 27)

ADN del clon 2E7 LC

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATTAGAAATGATTTCCGGCTGGTATCAACAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCTCAGCGCCTGCTCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCAT
CAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGTATAATACTTACCCGTGGACGTTCCGGTCAG
GGAACGAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO: 28)

AA del clon 2E7 LC (las CDR están subrayadas)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDIRNDFGWYQQKPGKAPQRLLYAAASTLQS
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYNTYPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID
NO: 29)

AA del clon 2E7 LC de la CDR1:RASQDIRNDFG (SEQ ID NO:
30)

AA del clon 2E7 LC de la CDR2:AASTLQS (SEQ ID NO: 31)

AA del clon 2E7 LHC de la CDR3: LQYNTYPWT (SEQ ID NO:
32)

ADN del clon 8B5 HC

CAGATACAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCACCTTCAAGAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAG
GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAATGAATACT
ATGGAGACCCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACATGTTGTA
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGATGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCGGGA
ATAGCAGTGGCTGGGGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

(SEQ ID NO: 33)

AA del clon 8B5 HC (las CDR están subrayadas)

QIQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFKNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGS
NEYYGDPVKGRFTISRDNSKNMLYLQMNSLRADDTAVYYCARSSGIAVAGAFDYWGQGTTLVT

VSS (SEQ ID NO: 34)

AA del clon 8B5 HC de la CDR1:NYGMH (SEQ ID NO: 34)

AA del clon 8B5 HC de la CDR2:VIWIYDGSNEYYGDPVKG (SEQ ID
 NO: 35)

AA del clon 8B5 HC de la CDR3:SGIAVAGAFDY (SEQ ID NO:
 36)

ADN del clon 8B5 LC

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGACACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAAGC
 CACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTTCTTGGCCTGGTACCAGCAG
 AAACCTGGACAGGCTCCCAGTCTCCTCATCTATGTTGCATCCAGAAGGGCCGCTGGCATCC
 CTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA
 GCCTGAAGATTTTGAATGTTTTACTGTCAACACTATGGTAGGACACCATTCACTTTCGGC
 CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGA (SEQ ID NO: 37)

AA del clon 8B5 LC (las CDR están subrayadas)

EIVLTQSPDTLSLSPGEKATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPSLLIYVASRRA
AGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDEFGMFYCQHYGRTPFTFGPGTKVDIKR (SEQ ID
 NO: 41)

AA del clon 8B5 LC de la CDR1:RASQSVSSSFLA (SEQ ID NO:
 38)

AA del clon 8B5 LC de la CDR2:VASRRAA (SEQ ID NO: 39)

AA del clon 8B5 LC de la CDR3:QHYGRTPFT (SEQ ID NO: 40)

ADN del clon 4E9 HC

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA
GGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATACACTGGGTGCGACAG
GCCCCCTGAACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACCT
ATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGGCCAGGGACACGTCCATCAGCACAGTTTA
CATGGACCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAATACGC
GGTGGTAACTCGGTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

(SEQ ID NO: 41)

AA del clon 4E9 HC (las CDR están subrayadas)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAP**EQGLEWMGWINPNSG**
GTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRSDDTAVYYCARIRGGNSVFDYWGQGTLVTV
SS (SEQ ID NO: 42)

AA del clon 4E9 HC de la CDR1:GYYIH (SEQ ID NO: 43)

AA del clon 4E9 HC de la CDR2:WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID
NO: 44)

AA del clon 4E9 HC de la CDR3:IRGGNSVFDY (SEQ ID NO:
45)

ADN del clon 4E9 LCx|

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGC
CACCATCAACTGCAAGTCCACCCAGAGTATTTTATACACCTCCAACAATAAGAACTTCTTA
GCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGCTCATTTCCTGGGCATCTATCC
GGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTTCGCTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAACAATATTTTAGTACT

ATGTTTCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 46)

AA del clon 4E9 LC (las CDR están subrayadas)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSTQSILYTSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLISW
ASIRESGVPDRFSGSGGTDFALTISLQAEDVAVYYCQQYFSTMFSFGQGTKLEIKR

(SEQ ID NO: 47)

AA del clon 4E9 LC de la CDR1:KSTQSILYTSNNKNFLA (SEQ ID
 NO: 48)

AA del clon 4E9 LC de la CDR2:WASIRES (SEQ ID NO: 49)

AA del clon 4E9 LC de la CDR3:QQYFSTMFS (SEQ ID NO: 50)

ADN del clon 11F11 HC

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTC
 CCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTGGTGCATACTACTGGACTTGGATC
 CGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCCATTACAGTGGGAGCACCT
 ACTCCAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAATTACCATATCGTTAGACACGTCTAAGAACCAGTT
 CTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACAA
 GAGGACTACGGTGGTTTGTGTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCCTCA
 (SEQ ID NO: 51)

AA del clon 11F11 HC (las CDR están subrayadas)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGAYYWTWIRQHPGKGLEWIGYIHYS
GSTYSNPSLKSRITISLDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARQEDYGGLFDYWGQGT

VSS (SEQ ID NO: 52)

AA del clon 11F11 HC de la CDR1: SGAYYWT (SEQ ID
 NO: 53)

AA del clon 11F11 HC de la CDR2: YIHYSGSTYSNPSLKS

(SEQ ID NO: 54)

AA del clon 11F11 HC de la CDR3: QEDYGGLFDY (SEQ ID NO: 55)

ADN del clon 11F11 LC
 GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAAT
 CACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTACCACCGACTTAGCCTGGTACCAGCAGATG
 CCTGGACAGGCTCCCCGGCTCCTCATCTATGATGCTTCCACCAGGGCCACTGGTTTCCCAG
 CCAGATTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACGCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGC
 TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACATTATAAAACCTGGCCTCTCACTTTCGGCGGA
 GGGACTAAGGTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 56)

AA del clon 11F11 LC (las CDR están subrayadas)
 EIVMTQSPATLSVSPGERITLSCRASQSVTTDLAWYQQMPGQAPRLLIYDASTRAT
 GFPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDFAVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 57)

AA del clon 11F11 LC de la CDR1: RASQSVTTDLA
 (SEQ ID NO: 58)

AA del clon 11F11 LC de la CDR2: DASTRAT (SEQ ID NO: 59)

AA del clon 11F11 LC de la CDR3: QHYKTWPLT (SEQ ID NO: 60)

ADN de la construcción 10E3 CD28 (la secuencia señal está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCCGCAGGTGACCCTCAAAGAGTCTGGACCCGTGCTCGTAAACCTACGGAGACCCTG

ACACTCACCTGCACAGTCTCCGGCTTCAGCCTCATCAATGCCAGGATGGGAGTTTCCTGGA
TCAGGCAACCGCCCGGAAAGGCCCTGGAATGGCTCGCACATATTTTCAGTAACGCTGAAAA
AAGCTATCGGACTTCTCTGAAAAGTCGGCTCACGATTAGTAAGGACACATCCAAGAGCCAA
GTGGTGCTTACGATGACTAACATGGACCCTGTGGATACTGCAACCTATTACTGTGCTCGAA
TCCCTGGTTATGGCGGAAATGGGGACTACCACTACTACGGTATGGATGTCTGGGGCCAAGG
GACCACGGTTACTGTTTCAAGCGGAGGGGGAGGGAGTGGGGGTGGCGGATCTGGCGGAGGA
GGCAGCGATATCCAGATGACGCAGTCCCCTAGTTCACTTTCCGCATCCCTGGGGGATCGGG
TTACCATTACATGCCGCGCGTCACAGGGTATCCGGAATGATCTGGGATGGTACCAGCAGAA
GCCGGGAAAGGCTCCTAAGCGCCTCATCTACGCCAGCTCCACCCTGCAGAGTGGAGTGCCC
TCCCGGTTTTTCAGGCAGTGGCTCCGGTACGGAGTTTACTCTTACAATTAGCAGCCTGCAGC
CAGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTTTGCAGCATAATAATTTCCCCTGGACCTTTGGTCA
GGGCACCAAGGTGGAGATCAAAAGAGCAGCCGCCATCGAAGTAATGTATCCCCCCCCGTAC
CTTGACAATGAGAAGTCAAATGGAACCATTATCCATGTTAAGGGCAAACACCTCTGCCCTT
CTCCACTGTTCCCTGGCCCTAGTAAGCCGTTTTTGGGTGCTGGTGGTAGTCGGTGGGGTGCT
GGCTTGTTACTCTCTTCTCGTGACCGTCGCCTTTATAATCTTTTGGGTCAGATCCAAAAGA
AGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGA
AACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATT
TTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTG
AACCTGGGTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGA
TGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGA
CAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGT
CACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACA
TGCAGGCACTGCCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 61)

AA de la construcción 10E3 CD28 (la secuencia señal está

en negritas; las CDR están subrayadas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLINARMG
VSWIRQPPGKALEWLAHIFSNAEKSYRTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDTATYY
 CARIPGYGGNGDYHYYGMDVWGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASL
 GDRVTTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
 SLQPEDFATYYCLQHNNFPWTFGQGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKH
 LCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG
 PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGR
 DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQALPPR (SEQ ID NO: 62)

ADN de la construcción 10E3 CD28T (la secuencia señal
está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCCGCAAGTTACTTTGAAGGAGTCTGGACCTGTACTGGTGAAGCCAACCGAGACACTG
 ACACTCACGTGTACAGTGAGTGGTTTTTCTTGATCAACGCAAGGATGGGCGTCAGCTGGA
 TCAGGCAACCCCCTGGCAAGGCTCTGGAATGGCTCGCTCACATATTCAGCAATGCCGAAAA
 AAGCTACCGGACAAGCCTGAAATCCCGCCTGACTATTTCCAAGGACACTTCTAAGTCTCAG
 GTGGTGCTGACCATGACCAACATGGACCCGGTGGACACCGCCACCTATTACTGCGCAAGAA
 TCCCTGGGTATGGTGGGAATGGTGACTACCATTATTATGGGATGGATGTGTGGGGGCAAGG
 CACAACCGTAACGGTCTCAAGCGGTGGGGGAGGCTCAGGGGGCGGAGGCTCCGGAGGTGGC
 GGCTCCGACATTGAGATGACCCAAAGCCCGTCCAGCCTGTCCGCCAGCCTGGGAGATAGAG
 TGACAATCACGTGTAGAGCTTCCCAAGGGATAAGAAATGATCTCGGGTGGTATCAGCAGAA
 GCCCGGCAAAGCCCCCAAAGGCTTATATATGCTAGTAGTACACTGCAGTCTGGAGTTCCT
 TCCCGATTTTCAGGTAGCGGCTCCGGTACAGAGTTCACCCTCACGATAAGCTCACTCCAGC

CTGAGGATTTTCGCAACGTACTACTGCCTCCAGCACACAATTTTCCCTGGACTTTCGGCCA
 GGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGGGCCGCTGCCCTTGATAATGAAAAGTCAAACGGAACA
 ATCATTCACGTGAAGGGCAAGCACCTCTGTCCGTCACCCTTGTTCCCTGGTCCATCCAAGC
 CATTCTGGGTGTTGGTCGTAGTGGGTGGAGTCCTCGCTTGTTACTCTCTGCTCGTCACCGT
 GGCTTTTATAATCTTCTGGGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATG
 AATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTA
 GAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTA
 TCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTTCGAGAGAAGAGTACGAC
 GTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATC
 CTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGAT
 CGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGT
 ACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCCACGCTAG
 (SEQ ID NO: 63)

AA de la construcción 10E3 CD28T (la secuencia señal
 está en negritas; las CDR están subrayadas)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLINARMG
VSWIRQPPGKALEWLAHIFSNAEKSYRTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYY
 CARIPGYGGNGDYHYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASL
 GDRVITITCRASQGIRNDLGWYQOKPGKAPKRLIYASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
 SLQPEDFATYYCLQHNNFPWTFGQGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPG
 PSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
 APPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR
 RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
 R (SEQ ID NO: 64)

ADN de la construcción 10E3 CD8 (la secuencia señal está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCCGCAGGTGACACTCAAGGAATCAGGGCCCCGTACTGGTGAAACCTACTGAGACCCTG
ACACTGACTTGCACCGTGTCTGGGTCTCTCTGATTAACGCTCGAATGGGTGTGAGTTGGA
TACGCCAGCCTCCAGGGAAGGCTCTGGAGTGGTTGGCCACATTTTCTCCAACGCCGAGAA
GAGCTACAGGACTAGTCTGAAGTCCAGACTTACCATTTCCAAAGACACAAGTAAATCACAG
GTGGTGCTGACAATGACAAACATGGACCCGGTTGATACTGCTACCTATTATTGTGCCCGCA
TTCCCGGCTACGGCGGCAATGGCGACTATCACTATTATGGTATGGATGTCTGGGGGCAGGG
GACCACTGTTACCGTGTCCAGCGGGGGTGGTGGCAGCGGAGGTGGAGGGAGCGGTGGTGGG
GGGAGTGATATTCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCTCTTTCCGCTTCTCTGGGCGATAGAG
TCACCATCACCTGCCGGGCCTCTCAAGGCATCCGGAACGATCTTGGATGGTATCAGCAGAA
GCCCCGCAAGGCACCAAAAAGGCTGATCTACGCATCAAGCACCCCTGCAATCTGGGGTGCCG
TCCCGGTTTTCTGGTTCTGGTAGTGGGACCGAGTTTACTCTGACTATTTCTTCCCTGCAGC
CTGAGGACTTTGCTACGTACTATTGTCTGCAGCATAACAACCTCCCCTGGACGTTTCGGGCA
GGGTACGAAAGTGGAATTAAGCGCGCCGCGCCCTGTCCAACTCCATTATGTATTTCTCT
CATTTTGTCCCAGTGTTCCCTGCCCGCTAAACCCACAACCTACTCCGGCGCCCCGACCGCCAA
CTCCCGCACCTACCATCGCAAGCCAGCCATTGAGCCTCCGACCTGAGGCATGTAGACCAGC
AGCCGGCGGTGCCGTGCACACAAGGGGACTGGATTTTCGCCTGCGACATATATATTTGGGCC
CCTCTGGCTGGAACCTGTGGGGTTCTGCTGCTCTCTCTCGTTATTACACTGTATTGCAATC
ATCGCAATAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACG
CCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCC
TATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGA
ATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACG

CCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTG
TACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCG
AGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGA
CACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 65)

AA de la construcción 10E3 CD8 (la secuencia señal está en negritas; las CDR están subrayadas)

MALPVTALLPLALLHAARPQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLINARMG
VSWIRQPPGKALEWLAHIFSNAEKSYRTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDTATYY
CARIPGYGGNGDYHYGMDVWQGGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASL
GDRVITITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYASSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
SLQPEDFATYYCLQHNNFPWTFGQGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAP
RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCNHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ
QQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 66)

ADN de la construcción 8B5 CD28 (la secuencia señal está en negritas)

ATGGCACTCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCCGCAGATCCAGTTGGTGAATCAGGGGGCGGTGTGGTGCAGCCGGGTAGGAGCCTG
AGACTGTCATGCGTGGCGTCTGGCTTCACATTCAAGAACTACGGCATGCACTGGGTGCGAC
AGGCCCCCGGAAAGGGTTTGGAGTGGGTCGCCGTGATCTGGTACGACGGATCTAATGAGTA
TTACGGAGATCCTGTGAAGGGAAGGTTACCATCTCCCGCGACAATAGCAAAAATATGCTC
TACCTGCAAATGAACTCACTCAGGGCGGATGATACGGCGGTCTACTATTGCGCTCGCTCAG
GGATTGCTGTGGCCGGCGCATTCGATTACTGGGGACAGGGTACCCTGGTGACAGTATCAAG

CGGAGGCGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGATCTGGCGGGGGGGAAGTGAGATTGTGTTGACA
 CAGTCTCCCGATAACCCTGTCACTGTCACCCGGCGAGAAGGCAACGCTGAGTTGCAGAGCAA
 GCCAGTCAGTCTCCTCTTCTTTTCTGGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGTCAGGCACCATC
 TCTCCTGATTTACGTTGCCAGCAGACGGGCGGCTGGCATTCCCGACAGGTTCTCTGGAAGC
 GGATCTGGGACCGATTTTACCCTGACAATTAGCCGCTTGAGAGCCCGAAGACTTTGGTATGT
 TTTACTGCCAGCACTACGGAAGGACACCTTTCACATTTGGCCCGGGCACGAAAGTCGATAT
 AAAACGCGCAGCCGCCATTGAAGTAATGTACCCACCACCTTATTTGGACAATGAAAAGTCC
 AATGGTACCATTATTACGTCAAGGGAAGCATCTCTGTCCAAGCCCTCTGTTCCCCGGCC
 CCTCCAAACCATTCTGGGTGCTGGTGGTCGTCGGCGGAGTTCTGGCCTGCTATTCTCTGCT
 CGTGACTGTTGCATTCATCATTTTCTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGC
 GATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACG
 CACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGC
 TCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTTCGAGAGAA
 GAGTACGACGTTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAA
 GGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTA
 CTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAG
 GCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCCAC
 GCTAG (SEQ ID NO: 67)

AA de la construcción 8B5 CD28 (la secuencia señal está en negritas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFKNYGMH
 WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNEYYGDPVKGRFTISRDN SKNMLYLQMN SLRADD TAVYYC
 ARSGIAVAGAFDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGEKATLS
 CRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPSL LIYVASRRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED

FGMFYQCQHYGRTPFTFGPGTKVDIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP
 FPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
 QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
 LPPR (SEQ ID NO: 68)

ADN de la construcción 8B5 CD28T (la secuencia señal
 está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCGCAGATTCAGCTCGTGGAGTCAGGTGGTGGCGTGGTTCAGCCCGGACGGTCCCTG
 CCACTCTCTTGTGTGGCAAGCGGATTTACCTTTAAGAACTATGGCATGCACTGGGTGAGGC
 AGGCCCCTGGAAAAGGACTGGAGTGGGTTGCTGTGATCTGGTACGACGGGTCCAACGAATA
 TTATGGCGATCCTGTGAAGGGACGGTTTACAATCTCACGCGATAACTCAAAGAACATGCTG
 TACCTGCAAATGAACTCTCTGCGCGCTGATGACACTGCCGTGTATTATTGCGCTCGGAGTG
 GTATCGCCGTCGCAGGAGCATTGTGATTATTGGGGGCAAGGGACCCTCGTGACAGTGAGTTC
 CGGAGGGGGAGGTTCTGGTGGAGGCGGCTCTGGTGGGGGAGGCAGCGAGATCGTTCTGACC
 CAGTCTCCTGACACACTGTCACTGTCCCCTGGTGAAAAGGCCACACTGTCTTGTAGAGCGT
 CCCAGAGCGTTTCCAGTTCCTTCCTTGCATGGTATCAACAAAACCCGGGCAGGCTCCAAG
 CTTGCTGATCTACGTGGCCAGCCGCCGGGCCGAGGCATCCCTGATAGGTTTAGCGGTTCT
 GGGAGCGGGACGGACTTCACCTTGACAATATCACGGCTGGAACCCGAAGACTTCGGAATGT
 TTTATTGCCAGCACTACGGAAGAACTCCATTACCTTTGGCCCGGGAACGAAGGTAGACAT
 CAAGAGAGCAGCAGCCCTCGACAACGAGAAATCCAATGGAACCATTATCCATGTGAAGGGG
 AAACATCTCTGCCCTTCACCATTTGTTCCCTGGACCCAGCAAGCCTTTTTGGGTTCTGGTCG
 TGGTGGGGGGCGTCCTGGCTTGTTACTCCCTCCTCGTTACAGTCGCCTTCATAATCTTTTG
 GGTTAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGC

CCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATC
 GGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCA
 ACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGG
 GGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACA
 ACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCG
 GAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACC
 TATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 69)

AA de la construcción 8B5 CD28T (la secuencia señal está en negritas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFKNYGMH
 WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNEYYGDPVKGRFTISRDN SKNMLYLQMNSLRADDTAVYYC
 ARSGIAVAGAFDYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGEKATLS
 CRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPSLLIYVASRRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED
 FGMFYCQHYGRTPFTFGPGTKVDIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW
 VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF
 AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEINLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQE
 GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ
 ID NO: 70)

ADN de la construcción 8B5 CD8 (la secuencia señal está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCCGCAGATACAGCTTGTCTGAATCCGGTGGCGGGGTGGTGCAGCCTGGACGCAGCCTG
 CGGCTTTCTTGCGTGGCCAGCGGATTTACCTTCAAGAACTACGGGATGCATTGGGTCCGCC
 AGGCACCCGGCAAAGGCCTTGAGTGGGTGTCAGTGATCTGGTACGACGGCAGTAACGAGTA

TTATGGCGACCCCGTGAAGGGAAGGTTTACTATTTCAAGAGATAATAGTAAGAACATGTTG
TATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCGGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCTCGCTCCG
GCATCGCTGTGGCAGGGGCCTTTGACTACTGGGGTCAGGGGACGCTGGTCACGGTTAGTTC
CGGGGGCGGTGGTTCCGGAGGAGGCGGTTCGGGCGGCGGCGGATCAGAAATCGTTCTTACT
CAGAGTCCCGATACGCTGTCCTTGTCTCCGGGAGAAAAAGCCACACTGAGCTGCCGAGCCT
CACAGTCAGTAAGTTCTTCATTCCTCGCCTGGTACCAGCAAAAACCGGGGCAGGCCCCCTTC
CCTGCTTATCTACGTGGCCTCTAGGAGAGCCGCCGGTATTCCTGACCGGTTTACGCGGAAGT
GGTTCCGGGACTGATTTTACGCTCACGATCTCCCGATTGGAGCCCGAGGATTTTCGGGATGT
TCTACTGTCAGCATTATGGAAGAACGCCCTTTACCTTCGGTCCGGGAACCTAAGGTTGATAT
TAAGCGGGCTGCTGCCCTTAGCAACTCCATCATGTATTTTCTCACTTCGTGCCAGTATTC
CTGCCAGCCAAACCGACCACAACCCAGCACCTAGACCTCCTACTCCCGCTCCCACCATAG
CTTCACAGCCGCTGAGTTTGAGGCCAGAGGCCTGTCGGCCTGCTGCAGGCGGAGCAGTTCA
CACCAGGGGACTTGACTTTGCATGTGACATCTATATTTGGGCTCCACTGGCGGGAACCTGC
GGGGTGCTCCTTTTGTCACTCGTTATCACACTGTATTGCAATCATAGGAATAGATCCAAAA
GAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAG
GAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAA
TTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGC
TGAACCTGGGTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGA
GATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAA
GACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGG
GTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCA
CATGCAGGCACTGCCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 71)

AA de la construcción 8B5 CD8 (la secuencia señal está
en negritas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQIQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFKNYGMH
WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNEYYGDPVKGRFTISRDN SKNMLYLQMNSLRADDTAVYYC
ARSGIAVAGAFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGEKATLS
CRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPSL LIYVASRRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED
FGMFYCQHYGRTPFTFGPGTKVDIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPA
PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 72)

ADN de la construcción 4E9 CD28 (la secuencia señal está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGGGCAGAAGTAAAGAAGCCTGGTGCCTCTGTG
AAAGTTAGTTGCAAAGCATCTGGGTATACTTTCACCGTTACTATATCCATTGGGTTCGGC
AGGCCCCGGAGCAGGGACTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACCCAAATTCAGGCGGCACTAA
CTATGCTCAAAAGTTCCAGGGCAGGGTCACAATGGCCCGGATACTTCAATTAGCACCGTC
TATATGGATCTTAGTCGGCTGCGCAGTGACGATACCGCTGTCTACTATTGCGCAAGGATCA
GGGGCGGCAATTCTGTTTTTGA CTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACCGTCTCCTCTGG
TGGAGGCGGTAGTGGTGGAGGCGGGTCCGGAGGAGGGGGCTCCGATATAGTGATGACTCAA
AGTCCCGATAGCTTGGCAGTATCTCTTGGGGAACGCGCCACTATTA ACTGTAAATCCACCC
AGTCCATTCTCTATACCTCTAACAACAAGAATTTCTCGCGTGGTATCAGCAAAAACCCGG
GCAGCCACCTAAACTGCTTATATCCTGGGCCAGCATCAGGGAGTCCGGCGTCCCTGATCGG
TTCAGCGGTAGTGGCAGCGGGACAGACTTCGCTCTGACCATCAGTAGCCTCCAGGCTGAAG
ATGTCGCAGTGTATTATTGCCAGCAGTACTTCAGCACGATGTTTAGCTTCGGGCAGGGAAC

CAAGCTGGAAATAAAGAGAGCTGCAGCAATCGAGGTGATGTACCCACCTCCATATCTGGAC
 AATGAAAAGTCCAATGGCACTATCATAACAGTGAAGGGCAAACACCTGTGTCCATCTCCAC
 TTTTCCCGGGCCCGTCTAAACCTTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGCGGAGTTCTGGCCTG
 TTATTTCACTGCTGGTCACCGTGGCTTTTCATCATTTTTTTGGGTAAGATCCAAAAGAAGCCGC
 CTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACT
 ACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTCTGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAG
 ATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTG
 GGTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGG
 GGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAAT
 GGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGAT
 GGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGG
 CACTGCCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 73)

AA de la construcción 4E9 CD28 (la secuencia señal está en negritas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTGYYIH
 WVRQAPEQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRSDDTAVYYC
 ARIRGGNSVFDYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
 KSTQSILYTSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLISWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFALTISSL
 QAEDVAVYYCQQYFSTMFSGGQGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLG
 PSPLFPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPT
 RKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
 EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
 HMQALPPR (SEQ ID NO: 74)

ADN de la construcción 4E9 CD28T (la secuencia señal

está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTA**ACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC**
ACGCCCCGCAGGTACAGCTGGTGCAGAGCGGGGCCGAGGTCAAAAAGCCCGGGGCTTCAGTT
AAGGTTAGCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTTACCGGTTACTATATTCAGTGGGTTAGAC
AGGCACCTGAGCAAGGACTGGAGTGGATGGGGTGGATTAACCCCAATAGCGGTGGGACCAA
CTACGCCCAGAAGTTTCAAGGCCGAGTGACAATGGCACGAGACACCTCCATTTCCACTGTG
TACATGGACTTGAGCCGCCTCAGGTCAGACGACACCGCAGTGTACTACTGTGCGGAATCC
GCGGCGGAAACAGCGTGTTTGACTACTGGGGTCAGGGCACGTTGGTGACCGTGTCTTCCGG
AGGGGGGGGATCTGGTGGCGGGGGCTCCGGCGGAGGCGGTAGTGATATTGTGATGACTCAG
TCACCGGACAGTCTTGCTGTTTCACTTGGTGAGAGGGCCACCATAAATTGTAAAAGCACCC
AGAGCATTCTCTACACATCTAACAACAAAAATTTCCCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGG
ACAGCCACCCAAATTGCTGATTAGCTGGGCCAGCATTCGAGAATCTGGGGTTCCGGACCGC
TTTTCCGGGTCTGGCTCTGGGACCGACTTCGCTTTGACCATAAGCTCTCTTCAGGCCGAAG
ACGTGCGAGTATACTATTGTCAACAGTATTTTTCTACCATGTTTTCTTCGGCCAGGGAAC
TAAGTTGGAGATCAAGAGAGCAGCTGCATTGGATAATGAGAAGTCCAATGGCACTATTATC
CACGTGAAAGGTAAACACCTGTGTCCCTCACCCCTGTTTCCAGGACCTAGTAAACCATTCT
GGGTCTTGGTTGTAGTCGGGGGCGTTTTTGGCATGTTATTCCCTTCTTGTGACAGTCGCCTT
TATCATTTTTCTGGGTGAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATG
ACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATT
TCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCA
GGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGAGAGAAGAGTACGACGTTTTG
GACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAG
AAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCAT
GAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCC

ACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 75)

AA de la construcción 4E9 CD28T (la secuencia señal está en negritas)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYIH
WVRQAPEQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRSDDTAVYYC
ARIRGGNSVFDYWGGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
KSTQSILYTSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLISWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFALTISL
QAEDVAVYYCQQYFSTMFSFGQGTKLEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPS
KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAP
PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
(SEQ ID NO: 76)

ADN de la construcción 4E9 CD8 (la secuencia señal está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCCGCAAGTTCAGCTTGTGCAGAGCGGAGCTGAGGTGAAAAACCAGGCGCCTCCGTT
AAGGTGTCTTGCAAAGCCAGCGGATACACATTTACCGGGTACTATATTCAGTGGGTGAGGC
AGGCCCCTGAACAGGGCCTTGAATGGATGGGGTGGATCAATCCAAATTCCGGGGGAACCAA
TTATGCTCAGAAATTTAGGGCAGAGTGACAATGGCCAGGGACACCTCAATCAGCACAGTC
TACATGGACCTGAGCCGCCTGAGGTCTGATGACACAGCCGTCTACTACTGTGCCCGGATCA
GAGGGGGAAACAGTGTCTTCGACTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACTGTCTCCTCCGG
GGGAGGGGGTAGCGGGGGAGGCGGCAGCGGCGGGGGTGGTTCTGACATTGTTATGACCCAA
TCCCCAGACTCTCTGGCCGTGAGCCTGGGTGAGAGAGCCACCATCAATTGCAAGTCCACCC

AGAGCATACTCTATACGTCAAACAATAAGAATTTCTGGCGTGGTATCAGCAAAAGCCGGG
TCAACCACCCAAGTTGTTGATTAGCTGGGCATCAATTCGAGAATCTGGCGTCCCTGATAGG
TTTAGCGGGAGCGGTAGTGGAACCGACTTTGCGCTGACCATTTTCATCCCTTCAGGCAGAGG
ACGTGGCTGTGTATTACTGTCAACAGTACTTCAGCACGATGTTTTCTTTTCGGCCAGGGGAC
GAAGCTGGAGATAAAGCGGGCCGCAGCACTCAGCAACAGCATCATGTACTTTTCTCATTTTC
GTCCCAGTTTTTTCTCCCCGCCAAACCCACCACTACCCCTGCTCCTAGGCCTCCCACTCCCCG
CACCCACCATTTGCTTCCCAACCTCTGTCATTGAGGCCCGAAGCCTGCAGACCTGCCGCAGG
AGGGGCTGTGCACACCCGCGGTCTGGATTTTGCTTGTGATATCTACATTTGGGCCCTTTG
GCCGGAACCTGCGGAGTGTTGTTGCTGAGCCTTGTTATCACGTTGTACTGTAATCACAGAA
ACAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCC
TGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGG
AGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAAC
TTTACAATGAGCTGAACCTGGGTGCGAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGG
CCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAAC
GAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGA
GACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTA
TGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 77)

AA de la construcción 4E9 CD8 (la secuencia señal está en negritas)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYIH
WVRQAPEQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMARDTSISTVYMDLSRLRSDDTAVYYC
ARIRGGNSVFDYWQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
KSTQSILYTSNNKNFLAWYQQKPGQPPKLLISWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFAITISL
QAEDVAVYYCQQYFSTMFSGGQGTKLEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRP

PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
 NHRNRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG
 QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
 GERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 78)

ADN de la construcción 11F11 CD28 (la secuencia señal
 está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCG
ACGCCCCGCAGGTGCAGCTCCAAGAGTCAGGACCAGGACTTGTCAAACCAAGCCAGACCCTC
 AGCCTTACCTGCACCGTCAGCGGGGGCTCCATCAGCTCTGGGGCTTACTACTGGACATGGA
 TACGACAGCATCCCGGTAAAGGTCTGGAGTGGATCGGGTACATACTATAGTGGTTCCAC
 ATATTCTAATCCATCTCTTAAGAGTCGAATTACAATTTCACTCGATACTTCAAAGAATCAG
 TTCAGCTTGAAACTGAACTCCGTGACCGCGGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCACGCC
 AAGAGGATTATGGCGGACTGTTTCGATTATTGGGGGCAGGGAACCTCTCGTGACAGTGAGCTC
 CGGCGGGGGCGGCAGCGGTGGGGGTGGAAGTGGTGGAGGGGGCAGCGAGATCGTGATGACC
 CAGAGTCCTGCCACACTGTCAGTGAGTCCTGGGGAGCGAATCACACTTTCCTGTGAGCGT
 CTCAGTCCGTGACCACGGACCTGGCGTGGTACCAGCAGATGCCAGGCCAGGCGCCAAGACT
 CCTGATCTACGACGCTTCTACCCGCGCTACTGGTTTCCCCGCCAGATTCTCCGGAAGCGGG
 TCCGGGACGGATTTTACACTTACCATCTCTTCATTGCAGGCTGAGGATTTTGCCGTGTACT
 ACTGTCAGCATTACAAAACCTGGCCCCCTCACTTTCGGGGGCGGAACAAAAGTGGAATTA
 ACGGGCAGCAGCTATTGAGGTGATGTACCCACCCCCCTACCTGGACAACGAGAAATCCAAT
 GGCACCATCATCCACGTTAAGGGTAAGCACTTGTGTCCCTCACCCTCTTCCCTGGGCCTA
 GCAAGCCATTCTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGCTATTCCCTCCTGGT
 TACCGTTGCCTTTATCATATTTTGGGTCAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGAT
 TACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCAC

CACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCC
 CGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGAACCTGGGTCGCAGAGAAGAG
 TACGACGTTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGA
 AGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTC
 TGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGC
 CTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCCAGCT
 AG (SEQ ID NO: 79)

AA de la construcción 11F11 CD28 (la secuencia señal
 está en negritas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGAYY
 WTWIRQHPGKGLEWIGYIHYSGSTYSNP SLKSRITISLDTSKNQFSLKLN SVTAADTAVYY
 CARQEDYGG LFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERITLS
 CRASQSVTTDLAWYQQMPGQAPRLLIYDASTRATGFPARFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDF
 AVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LF
 PGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQ
 PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGK
 PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
 PPR (SEQ ID NO: 80)

Construcción 11F11 CD28T ADN (la secuencia señal está en
 negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCCGCAGGTGCAGTTGCAGGAGAGCGGGCCAGGCCTGGTGAAGCCCAGCCAAACACTG
 AGCCTCACCTGTACTGTGTCCGGTGGTAGCATTTCCAGCGGGGCGTATTATTGGACATGGA
 TACGCCAACACCCTGGAAAAGGGTTGGAGTGGATTGGATACATCCATTATTCTGGGTCCAC

CTATAGTAACCCTTCTCTCAAGTCTCGCATTACTATTAGTTTGGATACCTCTAAGAATCAG
 TTTAGTCTGAAGCTGAACAGTGTAAACGCCGCCGACACCGCGGTCTACTACTGTGCTAGGC
 AGGAGGATTACGGGGGACTGTTTCGATTACTGGGGCCAGGGGACATTGGTCACCGTTTCAAG
 CGGGGGCGGCGGATCTGGCGGAGGGGGATCTGGAGGCGGAGGCTCTGAGATCGTAATGACT
 CAGAGCCCAGCCACCCTGTCCGTCTCTCCCGGCGAACGCATCACTCTGAGCTGTAGGGCAT
 CACAGTCTGTTACCACAGATCTGGCTTGGTATCAACAAATGCCTGGGCAGGCCCCGCGACT
 GTTGATTTATGACGCCTCTACGCGGGCCACAGGATTTCTGCCCCGTTCTCCGGGTCTGGT
 TCTGGCACCGATTTTACCTTGACAATCAGTAGCTTGCAGGCAGAAGATTTTCGCTGTGTATT
 ACTGCCAACATTATAAGACATGGCCTTTGACATTCGGCGGGGGAACCAAAGTGGAGATCAA
 ACGCGCCGCAGCCCTGGACAATGAGAAGTCTAATGGGACCATCATTCACGTCAAAGGGAAA
 CACCTGTGCCCCTCTCCTCTGTTCCCAGGCCCTTCTAAGCCCTTCTGGGTCTCGTGGTGG
 TGGGCGGTGTCCTGGCCTGCTATTCCCTTCTTGTGACAGTGGCCTTTATCATTTTTTGGGT
 GAGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCT
 GGCCCCACAAGGAAACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGA
 GCCGAGTGAAATTTTCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACT
 TTACAATGAGCTGAACCTGGGTTCGAGAGAAGAGTACGACGTTTTTGGACAAACGCCGGGGC
 CGAGATCCTGAGATGGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACG
 AGCTTCAAAAAGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAG
 ACGAGGCAAGGGTCACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTAT
 GACGCCCTCCACATGCAGGCACTGCCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 81)

AA de la construcción 11F11 CD28T (la secuencia señal
 está en negritas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTL~~SLT~~CTVSGGSISSGAYY
 WTWIRQHPGKGLEWIGYIHYSGSTYSNP~~SL~~KSRITISLDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYY

CARQEDYGGFLFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERITLS
 CRASQSVTTDLAWYQQMPGQAPRLLIYDASTRATGFPARFSGSGSGTDFTLTIISSLQAEDF
 AVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFVW
 LVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA
 AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ
 ID NO: 82)

ADN de la construcción 11F11 CD8 (la secuencia señal
 está en negritas)

ATGGCACTCCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
ACGCCCCGCAGGTACAGTTGCAGGAAAGCGGCCCGGCCTTGTAACCAAGCCAGACTCTC
 AGTTTGACTTGCACCGTCTCAGGAGGAAGCATTTCCAGTGGGGCTTATTATTGGACTTGGA
 TTCGGCAGCATCCTGGGAAAGGGTTGGAATGGATCGGTTATATTCATTATAGCGGTAGCAC
 CTATTCCAATCCGTCTTTGAAAAGCAGAATCACTATTTCACTCGACACCTCTAAGAACCAG
 TTCAGTCTCAAACCTGAACTCCGTGACAGCGGCCGACACAGCTGTGTACTACTGTGCACGGC
 AAGAAGATTATGGGGGGCTGTTTCGATTATTGGGGCCAAGGCACACTGGTGACAGTATCAAG
 CGGTGGAGGAGGCTCCGGGGGCGGAGGAAGTGGAGGCGGGGGGAGCGAAATTGTGATGACC
 CAGTCTCCAGCCACGCTGTCAGTGTCTCCGGGAGAACGCATAACCCTCTCCTGCCGGGCCA
 GTCAGTCCGTCACGACCGATTTGGCTTGGTATCAACAGATGCCTGGGCAGGCCCCCGCTT
 GCTGATCTATGACGCCTCCACCAGAGCAACTGGTTTCCCCGCCCGGTTTCAGCGGATCTGGA
 AGCGGTACAGATTTTACACTTACCATCTCATCATTGCAAGCTGAGGATTTTGCCGTGTACT
 ACTGCCAGCACTACAAGACCTGGCCTTTGACGTTTCGGCGGCGGAACAAAAGTGGAGATTAA
 AAGAGCCGCTGCCCTCAGTAACTCAATCATGTACTTTAGTCACTTTGTGCCTGTGTTTCTG
 CCAGCAAAGCCAACAACACACCAGCACCCCGCCCTCCAACGCCTGCCCCAACCATCGCCT

CCCAGCCTCTGAGCTTGAGGCCTGAGGCTTGTCGCCCAGCTGCTGGAGGTGCTGTGCATAC
 ACGAGGACTGGATTTTCGCCTGCGATATCTATATCTGGGCACCACTTGCCGGTACTTGTGGT
 GTGTTGCTGCTCTCACTGGTCATCACGCTGTACTGTAACCATAGGAATAGATCCAAAAGAA
 GCCGCCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCCACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAA
 ACACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTTCGCTGCCTATCGGAGCCGAGTGAAATTT
 TCTAGATCAGCTGATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGACAGAATCAACTTTACAATGAGCTGA
 ACCTGGGTTCGCAGAGAAGAGTACGACGTTTTGGACAAACGCCGGGGCCGAGATCCTGAGAT
 GGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAATCCTCAAGAAGGCCTGTACAACGAGCTTCAAAAAGAC
 AAAATGGCTGAGGCGTACTCTGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGACGAGGCAAGGGTC
 ACGATGGCTTGTATCAGGGCCTGAGTACAGCCACAAAGGACACCTATGACGCCCTCCACAT
 GCAGGCACTGCCCCCACGCTAG (SEQ ID NO: 83)

AA de la construcción 11F11 CD8 (la secuencia señal está en negritas)

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGAYY
 WTWIRQHPGKGLEWIGYIHYSGSTYSNP SLKSRITISLDTSKNQFSLKLN SVTAADTAVYY
 CARQEDYGG LFDYWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERITLS
 CRASQSVTTDLAWYQQMPGQAPRL LIYDASTRATGF PARFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDF
 AVYYCQHYKTWPLTFGGGTKVEIKRAAALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
 SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
 NELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
 GKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 84)

AA del NM 004119 del FLT3 humano

MPALARDGGQLPLL VVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMV

SESPEDLGALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPH
 FDLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMEN
 QDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGR
 ECTRLFTIDLNQTPQTTLPLQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEGNYFEM
 STYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYTTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATNSSEDEI
 DQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQPGEYIFHAEN
 DDAQFTKMFTLNIRRKPVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSPNCTEEITEGVW
 NRKANRKFVFGQWVSSSTLNMSEAIKGLVKCCAYNSLGTSCETILLNSPGPFPPFIQDNISF
 YATIGVCLLFIVVLTLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFYVDFREYEDLKWEF
 PRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEKADSSEREALMSELKMMT
 QLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLSKREKFHRTWTEIFKEHNFSFYF
 TFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIEYENQKRLEEEEDLNVLT FEDL
 LCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVKICDFGLARDIMSDSNYVVRGNAR
 LPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLGVNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQ
 PFYATEEIIYIIMQSCWAFDSRKRPSPNLTSFLGCQLADAEAMYQNVDGRVSECPHTYQN
 RRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS (SEQ ID NO: 85)

ADN del péptido señal de CAR

ATGGCACTCCCGTAACTGCTCTGCTGCTGCCGTTGGCATTGCTCCTGCACGCCGC
 ACGCCCG (SEQ ID NO: 86)

Péptido señal de CAR: MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID
 NO: 87)

ADN del conector de scFv G4S

GGCGGTGGAGGCTCCGGAGGGGGGGGCTCTGGCGGAGGGGGCTCC (SEQ ID
 NO: 88)

Conector G4s del scFv: GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 89)

ADN del conector Whitlow de scFv

GGGTCTACATCCGGCTCCGGAAGCCCGGAAGTGGCGAAGGTAGTACAAAGGGG

(SEQ ID NO: 90)

Conector Whitlow del scFv: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 91)

Secuencia de ácidos nucleicos de 4-1BB (dominio intracelular)

AAGCGCGGCAGGAAGAAGCTCCTCTACATTTTAAAGCAGCCTTTTATGAGGCCCGT
ACAGACAACACAGGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCAGATTTCCCGAGGAGGAGGAAGGTGGG
TGCGAGCTG (SEQ ID NO: 92)

AA de 4-1BB (dominio intracelular)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 93)

AA de OX40

RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (SEQ ID NO: 94)

INCORPORACIÓN A MODO DE REFERENCIA

Todas las publicaciones, las patentes y las solicitudes de patentes mencionadas en esta descripción se incorporan en la presente a modo de referencia, en la misma extensión en que se incorporó cada publicación, patente o solicitud de patente individual específica e individualmente a modo de referencia. Sin embargo, la cita de una referencia en la presente no se debería interpretar como un reconocimiento que dicha

referencia constituye arte anterior para la presente invención. En la medida que cualquiera de las definiciones o términos provistos en las referencias incorporadas a modo de referencia difieran de los términos y la descripción provistos en la presente, prevalecerán los términos y definiciones de la presente.

EQUIVALENTES

Se considera que la Descripción escrita precedente es suficiente para que el especialista en la técnica pueda practicar la invención. La Descripción y los Ejemplos precedentes detallan determinadas formas de realización preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Sin embargo, se debe tener en cuenta que no importa cuán detallada pueda parecer el texto precedente, la invención puede ser practicada de muchas maneras y la invención debe ser considerada con referencia a las reivindicaciones adjuntas y cualquier equivalente de estas.

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos, solamente se proveen a efectos ilustrativos y no deben considerarse como limitaciones de la presente invención.

EJEMPLO 1

Las células Namalwa, MV4:11 y HL60 (ATCC) y las células EoL1

(Sigma-Aldrich) se cultivaron en medio RPMI1640 (Lonza) + 10% de FBS (Corning) + 1X de penicilina, estreptomicina L-glutamina (Corning) (R10) y se mantuvieron a una densidad de células de entre $0,5-2,0 \times 10^6$ células/ml. Para examinar la expresión sobre la superficie celular de FLT3, las células se incubaron con un anticuerpo anti-FLT3 (BD Pharmingen) o un anticuerpo IgG1 de control de isotipo (BD Pharmingen) en solución amortiguadora de tinción (BD Pharmingen) durante 30 minutos a 4 °C. Luego se lavaron las células y se volvieron a suspender en solución amortiguadora de tinción con yoduro de propidio (BD Pharmingen) antes de la adquisición de datos. La expresión de FLT3 sobre las células diana se muestra en la FIGURA 1.

EJEMPLO 2

Se linealizaron plásmidos que codifican un promotor T7, una construcción CAR y una secuencia estabilizante de beta globina mediante digestión durante la noche de 10 µg de ADN con EcoRI y BamHI (NEB). El ADN se digirió luego durante 2 horas a 50 °C con la proteinasa K (Thermo Fisher, 600 U/ml) purificada con fenol/cloroformo y se precipitó mediante adición de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol. Luego se secaron los sedimentos, se resuspendieron en agua libre de RNAsa/DNasa y se cuantificaron usando NanoDrop. Después se usó un µg del ADN lineal para la transcripción *in vitro*

usando mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra (Thermo Fisher) según las instrucciones del proveedor. El ARN se purificó adicionalmente usando el conjunto de elementos MEGAClear (Thermo Fisher) según las instrucciones del proveedor y se cuantificó usando NanoDrop. La integridad del ARNm se evaluó usando movilidad sobre un gel de agarosa. Las PBMC se aislaron a partir de Leukopaks de donantes sanos (Hemacare) usando centrifugación por densidad con Ficoll-Paque según las instrucciones del proveedor. Las PBMC se estimularon usando OKT3 (50 ng/ml, Miltenyi Biotec) en medio R10 + IL-2 (300 UI/ml, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). Siete días después de la estimulación, las células T se lavaron dos veces en medio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) y se volvieron a suspender a una concentración final de $2,5 \times 10^7$ células/ml en medio Opti-MEM. Se usaron 10 µg de ARNm por electroporación. La electroporación de las células se efectuó usando un sistema Gemini X2 (Harvard Apparatus BTX) para suministrar un solo pulso de 400 V durante 0,5 ms en cubetas de 2 mm (Harvard Apparatus BTX). Las células fueron transferidas inmediatamente a medio R10 + IL-2 y se dejó que se recuperaran durante 6 horas. Para examinar la expresión de CAR, se tiñeron células T con FLT-3-HIS (Sino Biological Inc.) o la Proteína L biotinilada (Thermo Scientific) en solución amortiguadora de tinción (BD

Pharmlngen) durante 30 minutos a 4 °C. Luego las células se lavaron y se tiñeron con anti-HIS-PE (Miltenyi Biotec) o PE estreptavidina (BD Pharmlngen) en solución amortiguadora de tinción durante 30 minutos a 4 °C. Luego se lavaron las células y se volvieron a suspender en solución amortiguadora de tinción con yoduro de propidio (BD Pharmlngen) antes de la adquisición de datos. La expresión de los CAR FLT3 en las células T sometidas a electroporación se muestra en la FIGURA 2.

EJEMPLO 3

Para examinar la actividad citolítica en células T FLT3 CAR sometidas a electroporación, las células efectoras se cultivaron con las células diana a una proporción de 1:1 de E:T en medio R10. A las 16 horas después del cocultivo, se analizaron los sobrenadantes mediante Luminex (EMD Millipore) y se evaluó la viabilidad de las células diana mediante análisis por citometría de flujo la captación de yoduro de propidio (PI) por las células CD3-negativas. La actividad citolítica de las células T CAR sometidas a electroporación se muestra en la FIGURA 3 y la producción de citoquinas se muestra en las FIGURAS 4A-4B.

EJEMPLO 4

Se usó un vector de transferencia lentiviral de tercera generación que contiene las diferentes construcciones CAR

junto con la mezcla de empaquetamiento lentiviral ViraPower (Life Technologies) para generar los sobrenadantes lentivirales. Brevemente, se generó una mezcla de transfección mediante mezclado de 15 µg de ADN y 22,5 µl de polietilenimina (Polysciences, 1 mg/ml) en 600 µl de medio OptiMEM. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Simultáneamente, se tripsinizaron células T 293 (ATCC), se contaron y se plaqueó un total de 10×10^6 células en total en un frasco T75 junto con la mezcla de transfección. Tres días después de la transfección, se recolectaron los sobrenadantes y se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm y se guardaron a -80 °C hasta el momento del uso. Las PBMC se aislaron a partir de Leukopaks de donantes sanos (Hemacare) usando centrifugación por densidad con Ficoll-Paque según las instrucciones del proveedor. Las PBMC se estimularon usando OKT3 (50 ng/ml, Miltenyi Biotec) en medio R10 + IL-2 (300 UI/ml, Proleukin®, Prometheus® Therapeutics and Diagnostics). A las 48 horas después de la estimulación, las células se transdujeron usando lentivirus a un MOI = 10. Las células se mantuvieron a $0,5-2,0 \times 10^6$ células/ml antes de su uso en los ensayos de actividad. Para examinar la expresión de CAR, se tiñeron células T con FLT-3-HIS (Sino Biological Inc.) o la Proteína L biotinilada (Thermo Scientific) en solución amortiguadora de tinción (BD

Pharmlngen) durante 30 minutos a 4 °C. Luego las células se lavaron y se tiñeron con anti-HIS-PE (Miltenyi Biotec) o PE estreptavidina (BD Pharmlngen) en solución amortiguadora de tinción durante 30 minutos a 4 °C. Después se lavaron las células y se volvieron a suspender en solución amortiguadora de tinción con yoduro de propidio (BD Pharmlngen) antes de la adquisición de datos. La expresión de los CAR FLT3 en células T de dos donantes sanos se muestra en la FIGURA 5.

EJEMPLO 5

Para examinar la actividad citolítica en células T FLT3 CAR transducidas con lentivirus, las células efectoras se cultivaron con las células diana a una proporción de 1:1 de E:T en medio R10. A las 16 horas después del cocultivo, se analizaron los sobrenadantes mediante Luminex (EMD Millipore) y se evaluó la viabilidad de las células diana mediante análisis por citometría de flujo la captación de yoduro de propidio (PI) por las células CD3-negativas. La actividad citolítica promedio de células T CAR transducidas con lentivirus de dos donantes sanos se muestra en la FIGURA 6 y la producción de citoquinas por las células T CAR de cada donante sano se muestra en las FIGURAS 7A-7C.

EJEMPLO 6

Para evaluar la proliferación de las células T CAR como respuesta a células diana que expresan FLT3, se marcaron

células T con CFSE antes de cocultivarlas con las células diana a una proporción 1:1 de E:T en el medio R10. Cinco días después, se evaluó la proliferación de células T mediante un análisis por citometría de flujo de la dilución CFSE. La proliferación de las células T CAR FLT3 se muestra en la FIGURA 8.

EJEMPLO 7

Para examinar la actividad anti leucémica *in vivo*, se generaron células T CAR FLT3 de utilidad en un modelo xenogénico de AML humana. La expresión de CAR de las diversas líneas efectoras usadas en el modelo xenogénico de AML humana se muestran en la FIGURA 9. Se inyectaron células MV4;11 marcadas con luciferasa (2×10^6 /animal) por vía intravenosa en ratones NSG hembra de 5 a 6 semanas de vida. Después de 6 días, se inyectaron 6×10^6 células T (~50% de CAR+) en 200 μ l de PBS por vía intravenosa y se midió la carga tumoral de los animales semanalmente usando obtención de imágenes por bioluminiscencia. Según se muestra en la FIGURA 10, la inyección de células T CAR que expresan 10E3-CD28T y 8B5-CD28T redujo significativamente la carga tumoral en todos los puntos de tiempo examinados. Según se muestra en la FIGURA 11, esto también se confirmó con un análisis de supervivencia, donde la inyección de las células T CAR que expresan 10E3-CD28T o 8B5-CD28T confería una ventaja de

supervivencia significativa con respecto a los animales que recibieron las células transducidas ficticiamente o células T CAR que expresan las construcciones 10E3-CD28 o 10E3-CD8. No se observaron diferencias significativas entre las construcciones 10E3-CD28T y 8B5-CD28T en términos de eficacia.