

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 876 974**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/505** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2016 PCT/US2016/026437**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16164580**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2016 E 16718786 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.03.2021 EP 3280795**

54 Título: **Combinación de terapia con receptor de antígeno quimérico y derivados de amino pirimidina**

30 Prioridad:

**07.04.2015 US 201562144188 P**

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

**15.11.2021**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH y  
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF  
PENNSYLVANIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BYRD, JOHN;  
DUBOVSKY, JASON;  
JOHNSON, AMY;  
JUNE, CARL, H.;  
MUTHUSAMY, NATARAJAN;  
PORTER, DAVID, L.;  
WASIK, MARIUSZ;  
ANGST, DANIELA;  
FRAIETTA, JOSEPH, A.;  
GESSIER, FRANCOIS;  
GILL, SAAR;  
MAUS, MARCELA;  
RUELLA, MARCO y  
VULPETTI, ANNA**

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

**ES 2 876 974 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Combinación de terapia con receptor de antígeno quimérico y derivados de amino pirimidina

5 Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 1 de abril de 2016, se denomina N2067-7092WO\_SL.txt y tiene un tamaño de 257.530 bits.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, al uso de células T modificadas por ingeniería genética para expresar un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR), p. ej., en combinación con otro agente, tal como, p. ej., un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), para tratar una enfermedad asociada con la expresión de la proteína Grupo de Diferenciación 19 (CD19).

15

Antecedentes de la invención

Muchos pacientes con neoplasias malignas de células B son incurables con la terapia estándar. Además, las opciones de tratamiento tradicionales tienen a menudo efectos secundarios graves. Se han realizado intentos en la inmunoterapia del cáncer, sin embargo, varios obstáculos hacen que este sea un objetivo muy difícil para lograr la eficacia clínica. Aunque se han identificado cientos de los denominados antígenos tumorales, estos generalmente se derivan de sí mismos y, por lo tanto, son poco inmunogénicos. Además, los tumores utilizan varios mecanismos para volverse hostiles al inicio y propagación del ataque inmunológico.

20

25

30

35

40

45

Desarrollos recientes que utilizan la terapia de células T autólogas (CART) modificadas con receptor de antígeno quimérico (CAR), que se basa en redirigir las células T a una molécula adecuada de la superficie celular en células cancerosas, tales como las neoplasias malignas de células B, muestran resultados prometedores en el aprovechamiento del poder del sistema inmunitario para tratar neoplasias malignas de células B y otros cánceres (véase, p. ej., Sadelain et al., Cancer Discovery 3: 388-398 (2013)). Los resultados clínicos de la CART19 derivada de murinos (es decir, "CTL019") se han mostrado prometedores para establecer remisiones completas en pacientes que padecen CLL, así como en la ALL infantil (véase, p. ej., Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73 (2011), Porter et al., NEJM 365:725-733 (2011), Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)). Además de la capacidad del receptor de antígeno quimérico en las células T genéticamente modificadas para reconocer y destruir las células fijadas como objetivo, una terapia de células T terapéutica exitosa debe tener la capacidad de proliferar y persistir en el tiempo, y vigilar adicionalmente fugas de las células leucémicas. La calidad variable de las células T, que resulta de la anergia, la supresión o el agotamiento, tendrá efectos sobre el rendimiento de las células T transformadas con CAR, sobre las que los médicos expertos tienen un control limitado en este momento. Para ser eficaces, las células T de pacientes transformadas con CAR deben persistir y mantener la capacidad de proliferar en respuesta a su antígeno afín. Se ha demostrado que células T de pacientes ALL pueden hacer esto con CART19 que comprende un scFv murino (véase, p. ej., Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)).

Martz, L (Science-Business eXchange (2014); 7 (33); doi: 10.1038/scibx2014.971) se refiere a la superación de la resistencia a ibrutinib.

Sumario de la invención

La divulgación presenta, al menos en parte, composiciones y métodos para tratar trastornos tales como el cáncer (p. ej., cánceres hematológicos u otras neoplasias malignas de células B) utilizando células efectoras inmunes (p. ej., células T o células NK) que expresan una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR), p. ej., un CAR que se une a un antígeno de células B, p. ej., proteína Grupo de Diferenciación 19 (CD19) (p. ej., OMIM N° Acc. 107265, Swiss Prot. N° Acc P15391). Las composiciones incluyen, y los métodos incluyen administrar células efectoras inmunes (p. ej., células T o células NK) que expresan un CAR que fija como objetivo células B, en combinación con un inhibidor de BTK (p. ej., un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo). En algunos casos, la combinación mantiene o tiene una mejor eficacia clínica en comparación con la terapia sola. La divulgación pertenece, además, al uso de células modificadas por ingeniería genética, p. ej., células efectoras inmunes (p. ej., células T o células NK), para expresar una molécula CAR que se une a un antígeno de células B, p. ej., CD19, en combinación con un inhibidor de BTK (p. ej., un inhibidor de BTK descrito en esta memoria) para tratar un trastorno asociado con la expresión de un antígeno de células B, p. ej., CD19 (p. ej., un cáncer, p. ej. un cáncer hematológico).

60

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación pertenece a un método de tratar un sujeto, p. ej., un mamífero, que tiene una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B, p. ej., CD19, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula, p. ej., una célula efectora inmunitaria (p. ej., una célula T o una célula NK) que expresa una molécula CAR que se une al antígeno de células B, p. ej., CD19, p. ej., una molécula CAR que

se une a CD19 descrita en esta memoria, en combinación con un Inhibidor de BTK, p. ej., un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En un caso, la molécula CAR se une a CD19, p. ej., una molécula CAR que se une a CD19 descrita en esta memoria. En otros casos, la molécula CAR se une a uno o más de CD20, CD22 o ROR1.

En un caso, la enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B (p. ej., la expresión de uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1) se selecciona de una enfermedad proliferativa tal como un cáncer o neoplasia maligna o una afección precancerosa tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia, o es una indicación no relacionados con el cáncer asociada con la expresión de un antígeno de células B, p. ej., uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1. En un caso, la enfermedad es un tumor sólido o líquido. En un caso, el cáncer es cáncer de páncreas. En un caso, la enfermedad es un cáncer hematológico. En un caso, el cáncer hematológico es leucemia. En un caso, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en una o más leucemias agudas que incluyen, pero no se limitan a leucemia linfocítica aguda de células B (BALL), leucemia linfocítica aguda de células T (TALL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), leucemia linfocítica aguda (ALL); una o más leucemias crónicas que incluyen, pero no se limitan a leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL). Cánceres hematológicos o afecciones hematológicas adicionales incluyen, pero no se limitan a linfoma de células del manto (MCL), leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmacitoides blástica, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difuso, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma de MALT, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasias plasmáticas y neoplasias de células dendríticas y macroglobulinemia de Waldenstrom. En determinados casos, la enfermedad asociada con la expresión de antígenos de células B (p. ej., uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1) es una "preleucemia" que es una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células de la sangre mieloides. En algunos casos, la enfermedad asociada con la expresión de antígenos de células B (p. ej., uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1) incluyen, pero no se limitan a los cánceres atípicos y/o no clásicos, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan un antígeno de células B (p. ej., uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1). Cualquier combinación de las enfermedades asociadas con la expresión de antígenos de células B (p. ej., uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1) descritas en esta memoria puede tratarse con los métodos y las composiciones descritos en esta memoria.

En un ejemplo, la enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B (p. ej., uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1) es un linfoma, p. ej., MCL o linfoma de Hodgkin. En un ejemplo, la enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B (p. ej., uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1) es leucemia, p. ej., SLL, CLL y/o ALL.

En un caso, la célula expresa una molécula CAR que comprende un dominio de unión anti-CD19 (p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo murino o humanizado que se une específicamente a CD19), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (p. ej., un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización primario). En un caso, el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria (p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo murino o humanizado que se une específicamente a CD19 tal como se describe en esta memoria), un dominio transmembrana descrito en esta memoria y un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización primario descrito en esta memoria).

En un caso, la molécula CAR es capaz de unirse a CD19 (p. ej., CD19 humano de tipo salvaje o mutante). En un caso, la molécula CAR comprende un dominio de unión anti-CD19 que comprende una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, y una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, p. ej., un dominio de unión anti-CD19 que comprende una o más, p. ej., las tres LC CDRs y una o más, p. ej., las tres HC CDRs. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 comprende una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, p. ej., el dominio de unión anti-CD19 tiene dos regiones de cadena pesada variable, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en esta memoria. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 comprende una región variable de cadena ligera murina descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 7) y/o una región variable de cadena pesada murina descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 7). En un caso, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv que comprende una cadena ligera murina y una cadena pesada murina de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 7. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 (p. ej., un scFv) comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada en la Tabla 7, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 7; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada proporcionada en la Tabla 7, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 7. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 59, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 7, está unida a una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 7, a través de un enlazador, p. ej., un enlazador descrito en esta memoria. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 incluye un enlazador (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un scFv pueden estar, p. ej., en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de la cadena ligera-enlazador-región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena pesada-enlazador-región variable de la cadena ligera.

En un caso, la molécula de CAR comprende un dominio de unión anti-CD19 humanizado que incluye una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en esta memoria, y una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en esta memoria, p. ej., un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende una o más, p. ej., las tres LC CDRs y una o más, p. ej., las tres HC CDRs. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende al menos HC CDR2. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una o más (p. ej., las tres) regiones determinantes de la complementariedad en la cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en esta memoria, p. ej., el dominio de unión anti-CD19 humanizado tiene dos regiones de cadena pesada variable, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en esta memoria. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende al menos HC CDR2. En un caso, la región variable de la cadena ligera comprende una, dos, tres o las cuatro regiones marco de la secuencia de la línea germinal VK3\_L25. En un caso, la región variable de la cadena ligera tiene una modificación (p. ej., sustitución, p. ej., una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de la cadena ligera murina de SEQ ID NO: 58, p. ej., una sustitución en una o más de las posiciones 71 y 87). En un caso, la región variable de la cadena pesada comprende una, dos, tres o las cuatro regiones marco de la secuencia de la línea germinal VH4\_4-59. En un caso, la región variable de la cadena pesada tiene una modificación (p. ej., sustitución, p. ej., una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de la cadena pesada murina de SEQ ID NO: 58, p. ej., una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73 y 78). En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una región variable de la cadena ligera descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 3) y/o una región variable de la cadena pesada murina descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 3). En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado (p. ej., un scFv) comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 3, está unida a una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 3, a través de un enlazador, p. ej., un enlazador descrito en esta memoria. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 incluye humanizado un enlazador (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un scFv pueden estar, p. ej., en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de la cadena ligera-enlazador-región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena pesada-enlazador-región variable de la cadena ligera.

- 5 En un caso, la molécula de CAR comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En un caso, el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15. En un caso, el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO: 15, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.
- 10 En un caso, el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana por una región de bisagra, p. ej., una región de bisagra descrita en esta memoria. En un caso, la región de bisagra codificada comprende SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma.
- 15 En un caso, la molécula de CAR comprende, además, una secuencia que codifica un dominio coestimulador, p. ej., un dominio coestimulador descrito en esta memoria. En un caso, el dominio coestimulador comprende un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 4-1BB (CD137). En un caso, el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16. En un caso, el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 51. En un caso, el dominio coestimulador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO: 16 o SEQ ID NO: 51, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO:51.
- 20 En un caso, la molécula de CAR comprende, además, una secuencia que codifica un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16 y/o la secuencia de SEQ ID NO:17. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 43. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de CD27 y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 51 y/o la secuencia de SEQ ID NO:17. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 51 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 43. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID. NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una sola cadena polipeptídica.
- 25 En un caso, la molécula de CAR comprende, además, una secuencia conductora, p. ej., una secuencia conductora descrita en esta memoria. En un caso, la secuencia conductora comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
- 30 En un caso, la molécula CAR comprende una secuencia conductora, p. ej., una secuencia conductora descrita en esta memoria, p. ej., una secuencia conductora de SEQ ID NO: 13, o que tiene 95-99% de identidad con la misma; un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, p. ej., un dominio de unión anti-CD19 que comprende una LC CDR1, una LC CDR2, una LC CDR3, una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en esta memoria, p. ej., un dominio de unión anti-CD19 murino descrito en la Tabla 7, un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en la Tabla 3, o una secuencia con 95-99% de identificación con la misma; una región de bisagra, p. ej., una región de bisagra descrita en esta memoria, p. ej., una región de bisagra de SEQ ID NO: 14 o que tiene 95-99% de identidad con la misma; un dominio transmembrana, p. ej., un dominio transmembrana descrito en esta memoria, p. ej., un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15 o una secuencia que tiene 95-99% de identidad con la misma; un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio de señalización primario). En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio coestimulador, p. ej., un dominio coestimulador descrito en esta memoria, p. ej., un dominio coestimulador 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51, o que tiene 95-99% de identidad con la misma, y/o un dominio de señalización primario, p. ej., un dominio de señalización primario descrito en esta memoria, p. ej., un dominio estimador de CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, o que tiene 95-99% identidad con la misma.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

En un caso, la molécula de CAR comprende (p. ej., consiste en SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 o SEQ ID NO:42) una secuencia de aminoácidos de, o un amino secuencia de ácido que tiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, 10, 15, 20 o 30 modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 60, 50 o 40 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 o SEQ ID NO:42, o una secuencia de aminoácidos que tiene 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 o SEQ ID NO:42.

En un caso, la célula que expresa la molécula de CAR comprende un vector que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la molécula de CAR. En un caso, el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector lentivirus, un vector adenoviral o un vector retrovírico. En un caso, el vector es un vector de lentivirus. En un caso, el vector comprende, además, un promotor. En un caso, el promotor es un promotor EF-1. En un caso, el promotor EF-1 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 100. En un caso, el vector es un vector transcrito *in vitro*, p. ej., un vector que transcribe ARN de una molécula de ácido nucleico descrita en esta memoria. En un caso, la secuencia de ácido nucleico en el vector *in vitro* comprende, además, una cola poli(A), p. ej. una cola poli A descrita en esta memoria, p. ej., que comprende aproximadamente 150 bases de adenosina (SEQ ID NO: 104). En un caso, la secuencia de ácido nucleico en el vector *in vitro* comprende, además, una 3'-UTR, por ejemplo, una 3'-UTR descrita en esta memoria, p. ej., que comprende al menos una repetición de una 3'-UTR derivada de beta-globulina humana. En un caso, la secuencia de ácido nucleico en el vector *in vitro* comprende, además, un promotor, p. ej., un promotor T2A.

En determinados casos de las composiciones y los métodos descritos en esta memoria, la célula que expresa la molécula de CAR (a la que también se alude en esta memoria como "célula que expresa CAR") es una célula o población de células tal como se describe en esta memoria, p. ej., una célula efectora inmunitaria humana o población de células (p. ej., una célula T humana o una célula NK humana, p. ej., una célula T humana descrita en esta memoria o una célula NK humana descrita en esta memoria). En un caso, la célula T humana es una célula T CD8+. En un caso, la célula es una célula autóloga. En un caso, la célula es una célula T alogénica. En un caso, la célula es una célula T y la célula T es deficiente en diacilglicerol quinasa (DGK). En un caso, la célula es una célula T y la célula T es deficiente en Icaros. En un caso, la célula es una célula T y la célula T es deficiente tanto en DGK como en Icaros. Debe entenderse que las composiciones y los métodos descritos en esta memoria que enumeran el término "célula" abarcan composiciones y métodos que comprenden una o más células, p. ej., una población de células.

En otro caso, la célula que expresa la molécula de CAR, p. ej., tal como se describe en esta memoria, puede expresar, además, otro agente, por ejemplo, un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR.

En un caso, el método incluye, además, administrar una célula que expresa la molécula CAR, tal como se describe en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, en combinación con un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR. En determinados casos, el agente es una citoquina, p. ej., IL-7, IL-15, IL-21 o una combinación de las mismas. En un caso, el método incluye administrar IL-7 al sujeto. La citoquina se puede administrar en combinación con, p. ej., simultáneamente o poco después, la administración de la célula que expresa el CAR. Alternativamente, la citoquina puede ser suministrada después de un período prolongado de tiempo después de la administración de la célula que expresa el CAR, p. ej., después de la evaluación de la respuesta del sujeto a la célula que expresa el CAR.

En otros casos, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa el CAR puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora inmune. Ejemplos de moléculas inhibidoras inmunes incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. En un caso, el agente que inhibe una molécula inhibidora inmune comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora inmune, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria. En un caso, el agente comprende un primer polipéptido, p. ej., de una molécula inhibidora, tal como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos (p. ej., al menos una porción del dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización descrito en esta memoria (p. ej., que comprende un dominio coestimulador (p. ej., 41BB, CD27 o CD28, p. ej., tal como se describe en esta memoria) y/o un dominio de señalización primaria (p. ej., un dominio de señalización CD3 zeta descrito en esta memoria). En un caso, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento del mismo (p. ej., al menos una porción del dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., un dominio de señalización de CD28 descrito en esta memoria y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en esta memoria).

- 5 En un caso, la infusión de linfocitos, por ejemplo, la infusión de linfocitos alogénicos, se utiliza en el tratamiento del cáncer, en donde la infusión de linfocitos comprende al menos una célula que expresa CAR que se une a un antígeno de células B, p. ej., CD19 (a la que también se alude en esta memoria como célula que expresa CD19 CAR), tal como se describe en esta memoria. En un caso, la infusión de linfocitos autólogos se utiliza en el tratamiento del cáncer, en donde la infusión de linfocitos autólogos comprende al menos una célula que expresa CD19.
- 10 En un caso, la célula que expresa CAR CD19, p. ej., célula T, se administra a un sujeto que ha recibido un trasplante previo de células madre, p. ej., un trasplante autólogo de células madre.
- 15 En un caso, la célula que expresa la molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administra en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula CAR, p. ej., un agente descrito en esta memoria.
- 20 En un caso, el inhibidor de BTK se administra en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de un inhibidor de BTK, p. ej., un agente descrito en esta memoria.
- 25 En un caso, la célula que expresa la molécula de CAR, p. ej., una molécula CAR descrita en esta memoria, y el inhibidor de BTK se administra en combinación con un adicional agente que trata la enfermedad asociada con un antígeno de células B, p. ej., CD19, p. ej., un agente adicional descrito en esta memoria.
- 30 En un caso, las células que expresan una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administran a una dosis y/o programa de dosificación descrito en esta memoria.
- 35 En un caso, la molécula de CAR se introduce en las células T, p. ej., utilizando transcripción *in vitro*, y el sujeto (p. ej., ser humano) recibe una administración inicial de células que comprenden una molécula de CAR, y una o más administraciones posteriores de células que comprenden una molécula de CAR, en donde la una o más administraciones posteriores se administran menos de 15 días, p. ej., 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días después de la administración anterior. En un caso, se administra al sujeto (p. ej., un ser humano) más de una administración de células que comprenden una molécula de CAR por semana, p. ej., se administran 2, 3 o 4 administraciones de células que comprenden una molécula de CAR por semana. En un caso, el sujeto (p. ej., un sujeto humano) recibe más de una administración de células que comprenden una molécula de CAR por semana (p. ej., 2, 3 o 4 administraciones por semana) (a lo que también se alude en esta memoria como un ciclo), seguido de una semana sin administración de células que comprenden una molécula de CAR, y luego se administra al sujeto una o más administraciones adicionales de células que comprenden una molécula de CAR (p. ej., más de una administración de las células que comprenden una molécula de CAR por semana). En otro caso, el sujeto (p. ej., un sujeto humano) recibe más de un ciclo de células que comprenden una molécula de CAR, y el tiempo entre cada uno de los ciclos es menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días. En un caso, las células que comprenden una molécula de CAR se administran cada dos días durante 3 administraciones por semana. En un caso, las células que comprenden una molécula de CAR se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.
- 45 En un caso, la combinación del inhibidor de BTK y las células que expresan una molécula CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administra como tratamiento de primera línea para la enfermedad, p. ej., el cáncer, p. ej., el cáncer descrito en esta memoria. En otro caso, la combinación del inhibidor de BTK y las células que expresan una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administra como tratamiento de segunda, tercera, cuarta línea para la enfermedad, p. ej., el cáncer, p. ej., el cáncer descrito en esta memoria.
- 50 En un caso, se administra al sujeto una célula (p. ej., una población de células) descrita en esta memoria.
- 55 En un caso, el método incluye administrar una población de células, una pluralidad de las cuales comprende una molécula de CAR descrita en esta memoria. En algunos casos, la población de células que expresan CAR comprende una mezcla de células que expresan diferentes CARs. Por ejemplo, en un caso, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión anti-CD19 diferente, p. ej., un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria que difiere del dominio de unión anti-CD19 en el CAR expresado por la primera célula. Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión anti-CD19, p. ej., tal como se describe en esta memoria, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión de antígeno a una diana distinto de CD19 (p. ej., CD123 o mesotelina). En un caso, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización intracelular primario y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario.
- 60

- En un caso, el método incluye administrar una población de células en donde al menos una célula de la población expresa un CAR que tiene un dominio anti-CD19 descrito en esta memoria, y un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR, p. ej., una segunda célula que expresa el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un caso, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora inmune.
- 5 Ejemplos de moléculas inhibidoras inmunes incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. En un caso, el agente que inhibe una molécula inhibidora inmune comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria. En un caso, el agente comprende un primer polipéptido, p. ej., de una molécula inhibidora, tal como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos (p. ej., al menos una porción del dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., que comprende un dominio coestimulador (p. ej., 41BB, CD27 o CD28, p. ej., tal como se describe en esta memoria) y/o un dominio de señalización primaria (p. ej., un dominio de señalización CD3 zeta descrito en esta memoria). En un caso, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento del mismo (p. ej., al menos una porción del dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., un dominio de señalización de CD28 descrito en esta memoria y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en esta memoria).
- 10
- 15
- 20 En otro aspecto, la divulgación pertenece a una célula que expresa una molécula CAR descrita en esta memoria para uso como un medicamento en combinación con un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I). En otro aspecto, la divulgación pertenece a un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento en combinación con una célula que expresa una molécula de CAR descrita en esta memoria.
- 25
- 30 En otro aspecto, la divulgación pertenece a una célula que expresa una molécula de CAR descrita en esta memoria para uso en combinación con un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de una enfermedad que expresa el antígeno de células B (p. ej., CD19). En otro aspecto, la divulgación pertenece a un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en combinación con una célula que expresa una molécula de CAR descrita en esta memoria, en el tratamiento de una enfermedad que expresa un antígeno de células B (p. ej., CD19). La enfermedad puede ser, p. ej., un cáncer tal como un cáncer hematológico. El cáncer puede ser, p. ej., un linfoma, CLL, MCL, ALL, DLBCL, mieloma múltiple u otro cáncer descrito en esta memoria.
- 35
- 40 En otro aspecto, la divulgación pertenece a una célula que expresa una molécula de CAR descrita en esta memoria para uso en combinación con un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una citoquina, p. ej., IL-7, IL-15 y/o IL-21 tal como se describe en esta memoria.
- 45
- 50 En otro aspecto, la divulgación pertenece a una célula que expresa una molécula de CAR descrita en esta memoria y un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de una enfermedad que expresa CD19.
- 55 En un caso, la célula que expresa una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administra en combinación con un agente que aumenta la eficacia de una célula que expresa una molécula de CAR, p. ej., un agente descrito en esta memoria.
- 60 En un caso, la célula que expresa la molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administra en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula de CAR, p. ej., un agente descrito en esta memoria.
- 65 En un caso, la célula que expresa una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administra en combinación con una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico de un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR descrito en esta memoria. Si bien no se desea estar ligado por la teoría, se cree que el tratamiento con una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico (p. ej., una dosis que es insuficiente para suprimir completamente el sistema inmunológico, pero suficiente para mejorar la función inmunológica) va acompañado de una disminución de células T PD-1 positivas o de un aumento en células PD-1 negativas. Las células T PD-1 positivas, pero no las células T PD-1 negativas pueden agotarse mediante el acoplamiento con células que expresan un ligando PD-1, p. ej., PD-L1 o PD-L2.

- 5 En un caso, este enfoque puede utilizarse para optimizar el rendimiento de una célula CAR descrita en esta memoria en el sujeto. Si bien no se desea estar ligado por la teoría, se cree que, en un caso, se mejora el rendimiento de células inmunitarias efectoras, endógenas, no modificadas, p. ej., células T. Si bien no se desea estar ligados por la teoría, se cree que, en un caso, se mejora el rendimiento de una célula que expresa CAR CD19. En otros casos, las células, p. ej., las células T, que han sido o serán manipuladas para expresar un CAR, pueden tratarse ex vivo por contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunes PD1 negativas, p. ej., células T o aumenta la relación de células efectoras inmunes negativas para PD1, p. ej., células T/células efectoras inmunitarias PD1 positivas, p. ej., células T.
- 10 En un caso, la administración de una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor alostérico, p. ej., RAD001, o un inhibidor catalítico, se inicia antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, p. ej., células T. En un caso, el inhibidor de mTOR es RAD001 o rapamicina. En un caso, las células CAR se administran después de un tiempo suficiente, o una dosificación suficiente, de un inhibidor de mTOR, de modo que el nivel de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, p. ej., células T, o la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, p. ej., las células T/células efectoras inmunitarias PD1 positivas, p. ej., células T, se ha incrementado, al menos transitoriamente.
- 15 En un caso, la célula, p. ej., una célula efectora inmune (p. ej., una célula T o célula NK), a ser manipulada para expresar un CAR, es recogida después de un tiempo suficiente, o después de la dosificación suficiente de la dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, dosis de un inhibidor de mTOR, de modo que el nivel de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, p. ej., células T, o la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas, p. ej., células T/células efectoras inmunitarias PD1 positivas, p. ej., células T, en el sujeto o recogidas del sujeto se ha incrementado, al menos transitoriamente.
- 20 En casos, cualquiera de los métodos descritos en esta memoria comprende, además, realizar la linfodepleción en un sujeto, p. ej., antes de administrar una o más células que expresan una molécula de CAR descrita en esta memoria, p. ej., una molécula de CAR que se une a CD19. La linfodepleción puede comprender, p. ej., administrar uno o más de entre melfalán, citoxano, ciclofosfamida y fludarabina.
- 25 En algunos casos, la célula que expresa CAR que se administra comprende un CAR regulable (RCAR), p. ej., un RCAR como se describe en esta memoria. El RCAR puede comprender, p. ej., un miembro de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización intracelular y un primer dominio de conmutación, un miembro de unión a antígeno que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a CD19 y un segundo dominio de conmutación; y un dominio transmembrana. El método puede comprender, además, la administración de una molécula de dimerización, p. ej., en una cantidad suficiente para provocar la dimerización del primer y segundo dominio de conmutación.
- 30 En algunos casos, la célula que expresa CAR y el inhibidor de BTK se administran de forma simultánea o sustancialmente simultánea, p. ej., como una primera línea de terapia. En algunos casos, el método comprende administrar una combinación del inhibidor de BTK y la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) al sujeto tal como una terapia de primera línea.
- 35 En otros casos, la célula que expresa CAR y el inhibidor de BTK se administran secuencialmente. Por ejemplo, el inhibidor de BTK se administra antes que la célula que expresa CAR, o la célula que expresa CAR se administra antes que el inhibidor de BTK.
- 40 En algunos casos, la enfermedad asociada con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico (p. ej., un cáncer hematológico descrito en esta memoria, tal como CLL, MCL, DLBCL o ALL) y el sujeto es, o se identifica como un respondedor parcial, un no respondedor o recidivante a una o más terapias para el cáncer hematológico, p. ej., a un inhibidor de BTK tal como ibrutinib. En algunos casos, el sujeto tiene, o se identifica que tiene una mutación BTK tal como C481S. La mutación puede ser, p. ej., una mutación puntual, una inserción o una delección. La mutación puede ser, p. ej., una mutación en el sitio de unión para el inhibidor de BTK, p. ej., en o cerca del bolsillo de unión a ATP. La mutación puede conferir una respuesta disminuida (p. ej., resistencia) al inhibidor de BTK.
- 45 En algunos casos de cualquiera de los métodos descritos en esta memoria, el método comprende administrar el inhibidor de BTK al sujeto, reducir la cantidad (p. ej., cesar la administración) del inhibidor de BTK y, posteriormente, administrar la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR 19) al sujeto.
- 50 En algunos casos, el método comprende administrar el inhibidor de BTK al sujeto y posteriormente administrar una combinación del inhibidor de BTK y la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) al sujeto.
- 55 En algunos casos, el método comprende administrar un inhibidor de BTK (p. ej., Ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13 o una combinación de los mismos) al sujeto, reducir la cantidad (p. ej., cesar o suspender la administración) del inhibidor de BTK, y posteriormente administrar al
- 60

sujeto una combinación de la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR 19) y un segundo inhibidor de BTK, en donde el segundo inhibidor de BTK es un inhibidor de BTK descrito en esta memoria.

En algunos casos, al paciente se le ha administrado un inhibidor de BTK tal como ibrutinib. En algunos casos, el paciente no tiene una respuesta completa al inhibidor de BTK tal como ibrutinib. Por ejemplo, en algunos casos, el paciente tiene (o se identifica que tiene) una respuesta parcial, una enfermedad estable, una enfermedad progresiva o una recaída al tratamiento con un inhibidor de BTK, tal como ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13 o una combinación de los mismos. En algunos casos, el paciente, que no tiene una respuesta completa al inhibidor de BTK tal como ibrutinib, es tratado con una combinación de una célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) y un segundo inhibidor de BTK, en donde el segundo inhibidor de BTK es un compuesto de fórmula (I). La célula que expresa CAR y el segundo inhibidor de BTK pueden administrarse, p. ej., sustancialmente de forma simultánea o secuencial, p. ej., la célula que expresa CAR puede administrarse antes que el segundo inhibidor de BTK o el segundo inhibidor de BTK puede administrarse antes que la célula que expresa CAR.

En algunos casos, la enfermedad asociada con la expresión del antígeno de células B (p. ej., CD19) es un cáncer hematológico (p. ej., un cáncer hematológico descrito en esta memoria, p. ej., CLL, MCL o ALL), y el método retrasa o disminuye la resistencia al inhibidor de BTK descrito en esta memoria, la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19), o ambos. En algunos casos, la enfermedad asociada con la expresión del antígeno de células B (p. ej., CD19) es un cáncer hematológico (p. ej., un cáncer hematológico descrito en esta memoria, p. ej., CLL, MCL, DLBCL o ALL), y en donde el método prolonga la remisión o retrasa la recaída del cáncer hematológico. Por ejemplo, se puede prolongar la remisión, se puede retrasar la recaída, se puede retrasar la resistencia o se puede disminuir la resistencia, en comparación con el curso esperado de la enfermedad cuando se trata con una monoterapia del inhibidor de BTK o la célula que expresa CAR.

Regímenes de tratamiento ejemplares que se pueden utilizar en cualquiera de los métodos mencionados anteriormente incluyen uno o más de los siguientes:

En un caso, el inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), y la célula que expresa CAR19 se administran al mamífero como una primera línea de terapia.

En otro caso, la célula que expresa CAR (p. ej., la célula que expresa CAR19) es administrada al mamífero después de la administración del inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I).

En otros casos, la célula que expresa CAR (p. ej., la célula que expresa CAR19) es administrada al mamífero después de cesar la administración del inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I).

En otros casos, la administración del inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se inicia antes de la administración de la célula que expresa CAR (p. ej., la célula que expresa CAR19), y se administra la célula que expresa CAR en combinación con la administración continuada del inhibidor de BTK.

En un caso, a un sujeto se le administra un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), p. ej., como terapia de primera línea. Después de un intervalo de tiempo predeterminado (p. ej., 1 o 2 meses, pero también 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 1,5 meses, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses o 18 meses), una célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) se administra al sujeto sola, o en combinación con el inhibidor de BTK. En algunos casos, la respuesta del sujeto al tratamiento se evalúa a intervalos de tiempo predeterminados, p. ej., antes o durante el tratamiento con el inhibidor de quinasa y/o célula que expresa CAR. Si la evaluación demuestra que el sujeto es un respondedor completo, no se administra la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19). Si la evaluación demuestra que el sujeto es un respondedor parcial, o tiene una enfermedad estable en respuesta, al inhibidor de BTK, la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) se administra en combinación con el inhibidor de BTK, p. ej., tal como se describe en esta memoria. Si la evaluación demuestra que el sujeto es un no respondedor o un paciente que ha sufrido una recaída, la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) se administra en combinación con el inhibidor de BTK o un segundo inhibidor de BTK, p. ej., un segundo inhibidor de BTK tal como se describe en esta memoria.

En otros casos, el mamífero es, o se identifica que es un respondedor completo o parcial al inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), o un respondedor completo o parcial a la célula que expresa CAR19.

En algunos casos, cuando un sujeto es (o se identifica que es) un respondedor completo al inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), al sujeto no se administra una célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) durante el período de respuesta completa. En otros casos, cuando un sujeto es (o se identifica que es) un respondedor completo (p. ej., un respondedor completo al inhibidor de BTK), se administra al sujeto una célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) durante el período de respuesta completa. En un caso, después de la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19), el sujeto experimenta una respuesta prolongada

o una recaída retardada (p. ej., en comparación con el curso esperado de la enfermedad cuando se tratan sin la terapia con CAR).

5 En algunos casos, cuando un sujeto es (o se identifica que es) un respondedor parcial al inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), al sujeto no se administra una célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) durante el período de respuesta parcial. En otros casos, cuando un sujeto es (o se identifica que es) un respondedor parcial al inhibidor de BTK, se administra al sujeto una célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) (sola o en combinación con el inhibidor de BTK) durante el período de respuesta parcial. En un caso, después de la terapia CAR, el sujeto experimenta una respuesta completa y/o una respuesta prolongada o una recaída retardada (p. ej., en comparación con el curso esperado de la enfermedad cuando se trata sin terapia con CAR).

15 En algunos casos, cuando un sujeto tiene (o se identifica que tiene) una enfermedad estable después del tratamiento con el inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), al sujeto no se le administra una terapia con CAR durante el período de enfermedad estable. En otros casos, cuando un sujeto tiene (o se identifica que tiene) una enfermedad estable después del tratamiento con el inhibidor de BTK, al sujeto se le administra una terapia con CAR durante el período de enfermedad estable. En un caso, después de la terapia con CAR, el sujeto experimenta una respuesta parcial, una respuesta completa y/o una respuesta prolongada o una recaída retardada (p. ej., en comparación con el curso esperado de la enfermedad cuando se trata sin terapia con CAR).

20 En algunos casos, cuando un sujeto tiene (o se identifica que tiene) una enfermedad progresiva después de tratamiento con el inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), no se administra al sujeto una célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) durante el período de enfermedad progresiva. En otros casos, cuando un sujeto tiene (o se identifica que tiene) una enfermedad progresiva después de tratamiento con el inhibidor de BTK, se administra al sujeto una célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) durante el período de enfermedad progresiva. En un caso, después de la terapia con CAR, el sujeto experimenta una enfermedad estable, una respuesta parcial, una respuesta completa y/o una respuesta prolongada o una recaída retardada (p. ej., en comparación con el curso esperado de la enfermedad cuando se trata sin terapia con CAR).

30 En otros casos, la célula que expresa CAR (p. ej., la célula que expresa CAR19) se administra en combinación con un segundo inhibidor de BTK, en donde el segundo inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I), cuando el mamífero es, o se identifica que es un no respondedor o que recae en un primer inhibidor de BTK, p. ej., ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13.

35 En otros casos, el sujeto, p. ej., el mamífero, es (o se identifica que es) un respondedor parcial al inhibidor de BTK, y al mamífero se le administra la célula que expresa CAR (p. ej., la célula que expresa CAR19), sola o en combinación con el inhibidor de BTK, durante el período de respuesta parcial.

40 En otros casos, el sujeto, p. ej., el mamífero, es (o se ha identificado que es) un no respondedor que tiene una enfermedad progresiva o estable después del tratamiento con el inhibidor de BTK, y al mamífero se le administra la célula que expresa CAR (p. ej., la célula que expresa CAR19), sola o en combinación con un segundo inhibidor de BTK, durante el período de enfermedad progresiva o estable, en donde el segundo inhibidor de BTK es un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I).

45 En otro aspecto, en esta memoria se describe un método para tratar a un sujeto, p. ej., un mamífero, que tiene una enfermedad asociada con la expresión del antígeno de células B (p. ej., CD19). El procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de BTK tal como se describe en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) en combinación (p. ej. simultáneamente (o de forma sustancialmente simultánea), o secuencialmente).

En algunos casos, el inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I) y la célula que expresa CAR (p. ej., una célula CAR19) se administran en combinación, p. ej., como una primera línea de terapia.

55 En algunos casos, el inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I) se administra inicialmente, p. ej., una monoterapia o primera línea de terapia; después de reducir la cantidad (p. ej., cesar o suspender la administración) del inhibidor de BTK, administrar la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) al sujeto.

60 En otros casos, el inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I) se administra inicialmente, p. ej., una monoterapia o primera línea de terapia; y posteriormente se administra una combinación del inhibidor de BTK y la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) al sujeto.

En otros casos, el inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I) se administra inicialmente, p. ej., una monoterapia o primera línea de terapia; después de reducir la cantidad (p. ej., cesar o suspender la administración)

del inhibidor de BTK, administrar una combinación de un segundo inhibidor de BTK y la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) al sujeto.

5 En algunos casos, la respuesta del sujeto al tratamiento se evalúa a intervalos de tiempo predeterminados, p. ej., antes o durante el tratamiento con el inhibidor de quinasa y/o célula que expresa CAR. Si la evaluación demuestra que el sujeto es un respondedor completo, no se administra la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19). Si la evaluación demuestra que el sujeto es un respondedor parcial, o tiene una enfermedad estable en respuesta al inhibidor de quinasa, la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) se administra en combinación con el inhibidor de BTK tal como se describe en esta memoria. Si la evaluación demuestra que el sujeto es un no respondedor o un paciente que ha sufrido una recaída, la célula que expresa CAR (p. ej., una célula que expresa CAR19) se administra en combinación con el inhibidor de BTK o un segundo inhibidor de BTK, p. ej., un segundo inhibidor de BTK tal como se describe en esta memoria. En algunos casos, el primer inhibidor de BTK, el segundo inhibidor de BTK, o ambos, son compuestos de fórmula (I).

15 En algunos casos, la enfermedad asociada con la expresión del antígeno de células B (p. ej., CD19) es un cáncer hematológico, leucemia, linfoma, MCL, CLL, ALL, DLBCL, linfoma de Hodgkin o mieloma múltiple.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para modular la actividad de BTK en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula (p. ej., una población de células) que expresa una molécula de CAR que se une al antígeno de células B (p. ej., CD19), en combinación con un inhibidor de BTK, en el que el inhibidor de BTK comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 En otro aspecto, la divulgación presenta una composición que comprende una célula que expresa una molécula de CAR que se une al antígeno de células B (p. ej., uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1) y uno o más inhibidores de BTK tal como se describe en esta memoria. p. ej., un compuesto de fórmula (I). La célula que expresa el CAR (p. ej., la célula que expresa CAR19) y el uno o más inhibidores de BTK pueden estar presentes en una forma de dosis única, o como dos o más formas de dosis.

30 En casos, las composiciones descritas en esta memoria son para uso como un medicamento.

En casos, las composiciones descritas en esta memoria se utilizan en el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B (p. ej., CD19).

#### 35 *Métodos y composiciones para producir células que expresan CAR*

La presente divulgación también proporciona, en determinados aspectos, un método para producir una población de células efectoras inmunes (p. ej., células T o células NK) que se pueden manipular para expresar un CAR (p. ej., un CAR descrito en esta memoria), comprendiendo el método: proporcionar una población de células efectoras inmunes; y poner en contacto las células efectoras inmunes con un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I), en condiciones suficientes para inhibir la BTK. El método puede comprender, además, poner en contacto, p. ej., transducir, las células efectoras inmunes con un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR.

45 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para producir una célula que expresa CAR (p. ej., una célula efectora inmune que expresa CAR o una población de células), que comprende: poner en contacto la célula o población de células con un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I); e introducir (p. ej., transducir) un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR en la célula o población de células en condiciones tales que se exprese la molécula de CAR.

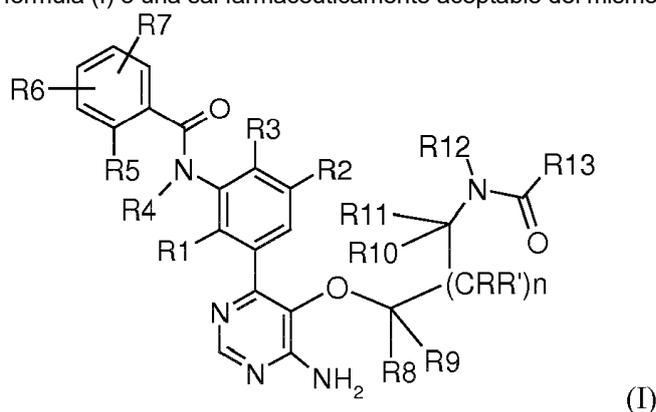
50 En determinados casos de los métodos de producir células que expresan CAR, la molécula de CAR codificada por el ácido nucleico es una molécula de CAR que se une a CD19. En casos, el método comprende, además, cultivar la célula o células en condiciones que permitan que la célula o al menos una sub-población de células expresen la molécula de CAR. En casos, la célula es una célula T o una célula NK, o la población de células incluye células T, células NK o ambas. En casos, el método comprende poner en contacto la célula o células con el inhibidor de BTK y posteriormente eliminar la mayor parte o la totalidad del inhibidor de BTK de la célula o células. En casos, el inhibidor de quinasa se añade después de que se recojan la célula o células o antes de que se estimule la célula o las células. En casos, la población de células también comprende células cancerosas, p. ej., células de leucemia o linfoma. Las células cancerosas pueden ser, p. ej., células CLL, MCL o ALL. En casos, el inhibidor de BTK inhibe BTK en las células cancerosas, p. ej., reduce su actividad en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%. En casos, el inhibidor de BTK inhibe una diana en las células efectoras inmunes, p. ej., reduce su actividad en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%. En casos, el método comprende, además, el agotamiento de las células T reguladoras (p. ej., células CD25+) de la población de células.

En algunos aspectos, la presente divulgación también proporciona una mezcla de reacción que comprende un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I) y una molécula de CAR o un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR. En algunos casos, la mezcla de reacción comprende, además, una población de células efectoras inmunes.

- 5 En algunos casos, una o más de las células efectoras inmunes expresa la molécula de CAR o comprende el ácido nucleico que codifica la molécula de CAR. En casos, la mezcla de reacción comprende células cancerosas, p. ej., células cancerosas hematológicas. Las células cancerosas pueden ser, p. ej., células que se recogen del sujeto cuando se recogen las células efectoras inmunes del sujeto.
- 10 En casos, una mezcla de reacción como se describe en esta memoria comprende, además, un tampón u otro reactivo, p. ej., una solución que contiene PBS. En casos, la mezcla de reacción comprende, además, un agente que activa y/o se expande a las células de la población, p. ej., un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y/o un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie del células. En casos, el agente es una perla conjugada con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento del mismo, y/o un anticuerpo anti-CD28, o un fragmento del mismo. En casos, la mezcla de reacción comprende, además, uno o más factores para la proliferación y/o
- 15 viabilidad, incluyendo suero (p. ej., suero bovino fetal o humano), interleuquina-2 (IL-2), insulina, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  y TNF- $\alpha$  o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células. En casos, la mezcla de reacción comprende, además, IL-15 y/o IL-7. En casos, una pluralidad de las células de la población en la mezcla de reacción comprenden una molécula de ácido nucleico, p. ej., una molécula de ácido nucleico descrita en esta memoria, que comprende una secuencia que codifica CAR, p. ej., una secuencia que codifica CAR CD19, p. ej., como se describe en esta memoria. En casos, una pluralidad de células de la población en la mezcla de reacción comprenden un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en esta memoria, p. ej., un CAR CD19 descrito en esta memoria. En casos, el vector es un vector descrito en esta memoria, p. ej., un vector seleccionado del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector de
- 20 lentivirus, un vector adenoviral o un vector de retrovirus. En casos, la mezcla de reacción comprende, además, un crioprotector o estabilizador tal como, p. ej., un sacárido, un oligosacárido, un polisacárido y un poliol (p. ej., trehalosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, glucosa y dextrano), sales y éteres corona. En un caso, el crioprotector es dextrano.
- 25 En algunos casos, el método de producción descrito en esta memoria comprende, además, poner en contacto la población de células efectoras inmunes con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT. El ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa puede ser ADN.
- 30 En algunos casos, el método de producción descrito en esta memoria comprende, además, cultivar la población de células efectoras inmunes en suero que comprende suero hAB al 2%.

#### Inhibidores de BTK

- 40 En algunos casos de los métodos, usos y composiciones de esta memoria, el inhibidor de BTK es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;



en donde

- R1 es hidrógeno, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo;
- R2 es hidrógeno o halógeno;
- 45 R3 es hidrógeno o halógeno;
- R4 es hidrógeno;
- R5 es hidrógeno o halógeno;
- o R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-; -CH<sub>2</sub>-CH=CH-; o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;

- R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;
- R8, R9, R, R', R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con alcoxi C1-C6; o cualesquiera dos de R8, R9, R, R', R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;
- R12 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o alcoxi C1-C6; o R12 y cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6;
- n es 0 o 1; y
- R13 es alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6, alcoxi C1-C6 o N,N-di-alquil C1-C6 amino; alquino C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; u óxido de alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.
- En algunos casos, R1 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo;
- R2 es halógeno;
- R3 es hidrógeno;
- R4 es hidrógeno;
- R5 es halógeno;
- o R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-; -CH<sub>2</sub>-CH=CH-; o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;
- R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;
- R8, R9, R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C1-C6; o cualesquiera dos de R8, R9, R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;
- R y R' son hidrógeno;
- R12 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con halógeno;
- o R12 y cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6;
- n es 0 o 1; y
- R13 es alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; alquino C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; u óxido de alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.
- En algunos casos,
- R1 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo;
- R2 es halógeno;
- R3 es hidrógeno;
- R4 es hidrógeno;
- R5 es halógeno;
- R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;
- R8, R9, R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C1-C6; o cualesquiera dos de R8, R9, R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;
- R y R' son hidrógeno;
- R12 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con halógeno;
- o R12 y cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6;
- n es 0 o 1; y
- R13 es alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; alquino C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; u óxido de alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.
- En algunos casos,
- R1 es hidrógeno, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo;
- R2 es hidrógeno o halógeno;
- R3 es hidrógeno o halógeno;
- R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-; -CH<sub>2</sub>-CH=CH-; o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;
- R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;

R8, R9, R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C1-C6; o cualesquiera dos de R8, R9, R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;

R y R' son hidrógeno;

5 R12 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con halógeno; o R12 y cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6;

n es 0 o 1; y

10 R13 es alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; alquino C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; u óxido de alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.

En algunos casos,

R1 es hidrógeno, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo;

15 R2 es hidrógeno o halógeno;

R3 es hidrógeno o halógeno;

R4 y R5 están unidos entre sí y representan un -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, o -CH=CH-;

R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;

20 R8, R9, R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C1-C6; o cualesquiera dos de R8, R9, R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;

R y R' son hidrógeno;

R12 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con halógeno;

25 o R12 y cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6;

n es 0 o 1; y

30 R13 es alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; alquino C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; u óxido de alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.

En algunos casos,

R1 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo;

35 R2 es halógeno;

R3 es hidrógeno;

R4 es hidrógeno;

R5 es halógeno;

R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;

40 R8, R9, R10 y R11, independientemente entre sí, representan H o alquilo C1-C6;

R y R' son hidrógeno;

R12 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con halógeno;

n es 0 o 1; y

45 R13 es alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; alquino C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; u óxido de alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.

En algunos casos,

R1 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo;

50 R2 es halógeno;

R3 es hidrógeno;

R4 es hidrógeno;

R5 es halógeno;

R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;

55 R8 y R9, independientemente entre sí, representan H o alquilo C1-C6;

R y R' son hidrógeno;

R12 y uno cualquiera de R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6;

60 n es 0 o 1; y

R13 es alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; alquino C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; u óxido de alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.

En algunos casos,

5 R1 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo;  
 R2 es halógeno;  
 R3 es hidrógeno;  
 R4 es hidrógeno;  
 R5 es halógeno;  
 R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo,  
 cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;  
 R8, R9, R10 y R11, independientemente entre sí, representan H o alquilo C1-C6;  
 R y R' son hidrógeno;  
 10 R12 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con halógeno;  
 n es 0 o 1; y  
 R13 es alqueno C2-C6 opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6.

15 En algunos casos,  
 R1 es hidrógeno o alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo;  
 R2 es fluoro;  
 R3 es hidrógeno;  
 R4 es hidrógeno;  
 R5 es halógeno;  
 20 R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C1-C6 opcionalmente sustituido con hidroxilo,  
 cicloalquilo C3-C6 opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;  
 R8 y R9, independientemente entre sí, representan H o alquilo C1-C6;  
 R12 y uno cualquiera de R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico  
 de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C1-  
 25 C6 o alcoxi C1-C6;  
 n es 0; y  
 R13 es alqueno C2-C6, opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; o alqueno C2-C6, opcionalmente  
 sustituido con alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6.

30 En algunos casos,  
 R1 es alquilo C1-C6;  
 R2 es fluoro;  
 R3 es hidrógeno;  
 R4 es hidrógeno;  
 35 R5 es fluoro;  
 R6 y R7, independientemente entre sí, representan H o cicloalquilo C3-C6 o halógeno;  
 R8, R9, R10 y R11 representan H;  
 R12 es hidrógeno;  
 n es 0; y  
 40 R13 es alqueno C2-C6 opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.

En algunos casos,  
 R1 es alquilo C1-C6;  
 R2 es fluoro;  
 45 R3 es hidrógeno;  
 R4 es hidrógeno;  
 R5 es fluoro;  
 R6 y R7, independientemente entre sí, representan H o cicloalquilo C3-C6 o halógeno;  
 R8, R9, R10 y R11 representan H;  
 50 R12 es metilo;  
 n es 0; y  
 R13 es alqueno C2-C6 opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6.

55 Con respecto a un compuesto de fórmula (I), los siguientes significados representan casos adicionales  
 independientemente, colectivamente o en cualquier combinación o en cualquier sub-combinación de los mismos:

1. R1 es metilo o hidroximetilo;
2. R2 es hidrógeno o flúor;
3. R3 es hidrógeno;
4. R1 es metilo o hidroximetilo y R2 y R3 son independientemente hidrógeno o fluoro;
- 60 5. R4 es hidrógeno;
6. R4 junto con R5 es -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- o -CH=CH-;
7. R5 es fluoro;
8. R6 es H y R7 es cicloalquilo C3-C6 y, en particular, ciclopropilo;
9. R7 es H y R6 es cicloalquilo C3-C6 y, en particular, ciclopropilo;

10. R8, R9, R10 y R11 representan H;  
 11. R12 y uno cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, alquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6;  
 5 12. R8, R9, R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C1-C6; o cualesquiera dos de R8, R9, R, R', R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;  
 13. R12 es hidrógeno y R13 representa alqueno C2-C6 opcionalmente sustituido con alquilo C1-C6;  
 14. n = 0;  
 10 15. R12 es metilo.

En algunos casos, el inhibidor de BTK se elige de:

- N-(3-(5-((1-acrilolazetidín-3-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 15 (E)-N-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-enil)azetidín-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-((1-propiololazetidín-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-inil)azetidín-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(5-((1-acrilolpiperidin-4-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 20 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilacrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (E)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilpropiolamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (E)-N-(3-(6-amino-5-(2-(4-metoxi-N-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 25 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-inamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(2-((4-amino-6-(3-(4-ciclopropil-2-fluorobenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-N-metiloxirano-2-carboxamida;  
 N-(2-((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-8-fluoro-1-oxoisoquinolin-2(1H)-il)fenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-N-metilacrilamida;  
 N-(3-(5-(2-acrilamidoetoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 30 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-etilacrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-(2-fluoroetil)acrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(5-((1-acrilamidociclopropil)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(5-(2-acrilamidopropoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 35 (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(but-2-inamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilacrilamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-inamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(3-(N-metilacrilamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 40 (S)- N-(3-(5-((1-acrilolpirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)- N-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-inil)pirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-2-(3-(5-((1-acrilolpirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona;  
 45 N-(2-((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-N-metilacrilamida;  
 50 N-(3-(5-(((2S,4R)-1-acrilol-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(((2S,4R)-1-(but-2-inil)-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 55 2-(3-(5-(((2S,4R)-1-acrilol-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona;  
 N-(3-(5-(((2S,4S)-1-acrilol-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 60 N-(3-(6-amino-5-(((2S,4S)-1-(but-2-inil)-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(5-(((2S,4R)-1-acrilol-4-fluoropirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;

N-(3-(6-amino-5-(((2S,4R)-1-(but-2-inoil)-4-fluoropirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)- N-(3-(5-((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(6-amino-5-((1-propioilazetidín-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-  
 5 fluorobenzamida;  
 (S)-2-(3-(5-((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona;  
 (R)- N-(3-(5-((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-  
 10 fluorobenzamida;  
 (R)- N-(3-(5-((1-acriloilpiperidin-3-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-  
 fluorobenzamida;  
 N-(3-(5-(((2R,3S)-1-acriloil-3-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-  
 fluorobenzamida;  
 N-(3-(5-(((2S,4R)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-  
 15 fluorobenzamida;  
 o  
 N-(3-(5-(((2S,4S)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-  
 fluorobenzamida.

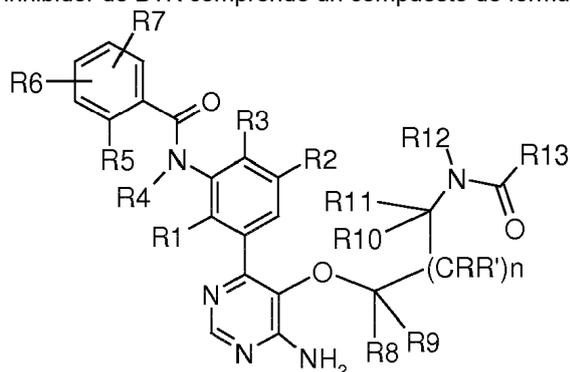
20 Los títulos, subtítulos o elementos numerados o con letras, p. ej., (a), (b), (i), etc., se presentan simplemente para facilitar la lectura. El uso de títulos o elementos numerados o con letras en este documento no requiere que las etapas o los elementos se realicen en orden alfabético o que las etapas o los elementos sean necesariamente distintos entre sí.

25 La divulgación incluye todas las combinaciones de uno o más de los aspectos y/o las realizaciones/casos anteriores, así como combinaciones con una cualquiera o más de las realizaciones o de los casos recogidos en la descripción detallada y los ejemplos.

30 Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Determinados casos de la presente divulgación proporcionan realizaciones de la presente invención. Más particularmente, la presente invención proporciona lo siguiente:

35 1. Una composición que comprende una célula (p. ej., una población de células) que expresa una molécula de CAR que se une a CD19 (una "célula que expresa CAR19") para uso, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), en el tratamiento de un mamífero que tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD19, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio o un cáncer, en donde el inhibidor de BTK comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;



(I)

40 en donde  
 R1 es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo;  
 R2 es hidrógeno o halógeno;  
 R3 es hidrógeno o halógeno;  
 45 R4 es hidrógeno;  
 R5 es hidrógeno o halógeno;  
 o R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-;  
 o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;  
 R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo  
 50 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;

R8, R9, R, R', R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; o cualesquiera dos de R8, R9, R, R', R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;

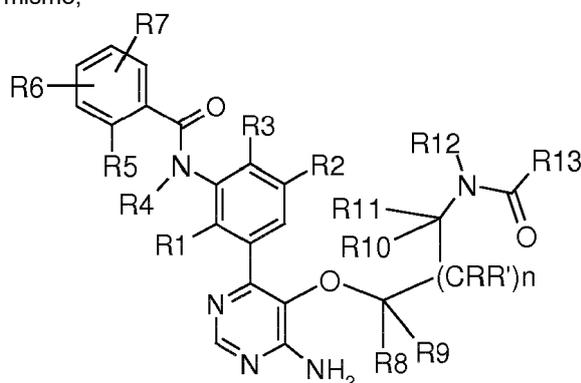
R12 es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

o R12 y uno cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

n es 0 o 1; y

R13 es alquilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o N,N-di-alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> amino; alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; u óxido de alquilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

2. Una composición, que comprende una célula que expresa una molécula de CAR que se une a CD19 (una "célula que expresa CAR19") y un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), en donde el inhibidor de BTK comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;



(I)

en donde

R1 es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo;

R2 es hidrógeno o halógeno;

R3 es hidrógeno o halógeno;

R4 es hidrógeno;

R5 es hidrógeno o halógeno;

o R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-; o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;

R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;

R8, R9, R, R', R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; o cualesquiera dos de R8, R9, R, R', R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;

R12 es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

o R12 y uno cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

n es 0 o 1; y

R13 es alquilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o N,N-di-alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> amino; alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; u óxido de alquilenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

opcionalmente, en donde la célula que expresa CAR19 y el inhibidor de BTK pueden estar presentes en una forma de dosis única, o como dos o más formas de dosis.

#### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa las estructuras de dos configuraciones de RCAR ejemplares. Los miembros de unión a antígeno comprenden un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de conmutación. Los miembros de unión intracelular comprenden un dominio de conmutación, un dominio de señalización co-estimulador y un dominio de señalización primario. Las dos configuraciones demuestran que el primer y segundo dominios de conmutación descritos en esta memoria pueden estar en diferentes orientaciones con respecto al miembro de unión a antígeno y al miembro de unión intracelular. Otras configuraciones de RCAR se describen con más detalle en esta memoria.

Las FIGs. 2A y 2B son dos gráficos que muestran la proliferación celular y el tamaño celular de las células CART19 cuando se tratan con concentraciones crecientes de ibrutinib (10 nM, 100 nM y 1000 nM).

Las FIGs. 3A y 3B muestran la proliferación de células CART19 estimuladas con líneas celulares MCL, en presencia o ausencia de ibrutinib. La FIG. 3A es una serie de histogramas que muestran la proliferación de células CART19 estimuladas con líneas de células tumorales MOLM14, JEKO-1 y RL, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de ibrutinib (10 nM, 100 nM y 1000 nM). Las células se tiñeron con CFSE y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células proliferantes, designado por la barra en cada uno de los histogramas. La FIG. 3B es una cuantificación de histogramas representativos en la FIG. 3A.

Las FIGs. 4A y 4B muestran la desgranulación de CD107a de células CART19 estimuladas con líneas celulares MCL en presencia o ausencia de ibrutinib. La FIG. 4A es una serie de perfiles de citometría de flujo que muestran la desgranulación de CD107a de células CART19 estimuladas con líneas de células tumorales (MOLM14, JEKO-1 y RL) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de ibrutinib (10 nM, 100 nM y 1000 nM). La expresión de CD107a se mide en el eje y. La FIG. 4B es la cuantificación de los resultados de la FIG. 4A.

La FIG. 5 es una serie de perfiles de citometría de flujo que muestran la producción de IL-2 por parte de células CART19 estimuladas con líneas de células tumorales (MOLM14, JEKO-1 y RL) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de ibrutinib (10 nM, 100 nM y 1000 nM). El eje y representa la expresión de IL-2.

La FIG. 6 es una serie de perfiles de citometría de flujo que muestran la producción intracitoplasmática de TNF- $\alpha$  por parte de células CART19 estimuladas con líneas de células tumorales (MOLM14, JEKO-1 y RL) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de ibrutinib (10 nM, 100 nM y 1000 nM). El eje y representa la expresión de TNF- $\alpha$ .

La FIG. 7 es una serie de perfiles de citometría de flujo que muestran la producción intracitoplasmática de IFN- $\gamma$  por parte de células CART19 estimuladas con líneas de células tumorales (MOLM14, JEKO-1 y RL) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de ibrutinib (10 nM, 100 nM y 1000 nM). El eje y representa la expresión de IFN- $\gamma$ .

La FIG. 8 es una serie de gráficos que muestran la secreción de citoquina a partir de células CART19 estimuladas con líneas de células tumorales (MOLM14, JEKO-1 y RL, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de ibrutinib (10) 100 nM y 1000 nM).

Las FIGs. 9A, 9B, 9C, 9D, 9E y 9F son gráficos que muestran el exterminio por CART19 de células tumorales, MOLM14 (Figs. 9A y 9D), JEKO (Figs. 9B y 9E), y RL (Figs. 9C y 9F), solo o en presencia de concentraciones crecientes de ibrutinib. Se incubaron células no transducidas (UTD) o CART19 con células tumorales en relaciones variables y se evaluó el flujo total de células (Figs. 9A, 9B y 9C) y el porcentaje de células muertas (9D, 9E y 9F).

Las FIGs. 10A, 10B y 10C son representaciones gráficas del exterminio por CART19 de células tumorales después de 24 horas, medido por citometría de flujo para contar el número total de células. Líneas de células tumorales MOLM14 (Fig. 10A), JEKO (FIG. 10B), y RL (FIG. 10C) se incubaron con (UTD) no transducido o células CART19 solas (SOLAS), o en combinación con concentraciones variables de ibrutinib.

Las FIGs. 11A, 11B, 11C y 11D son representaciones gráficas del hallazgo de dosis de CART19 en el modelo de ratón RL MCL. La carga tumoral se controló mediante formación de imágenes de bioluminiscencia (BLI) a lo largo del tiempo (Figs. 11A y 11B). La supervivencia global se controló a lo largo del tiempo (FIG. 11C).

Las FIGs. 12A y 12B son representaciones gráficas del hallazgo de dosis de CART19 en el modelo de ratón JEKO-1 MCL. El tamaño del tumor se controla mediante formación de imágenes de bioluminiscencia (BLI) a lo largo del tiempo (FIG. 12A) y la supervivencia global se controló también a lo largo del tiempo (FIG. 12B).

La FIG. 13, es un esquema que muestra el protocolo para administrar y evaluar la terapia de combinación de CART19 e ibrutinib en modelos de ratón *in vivo*.

Las FIGs. 14A y 14B son una representación gráfica que demuestra la sensibilidad de líneas celulares de MCL RL (FIG. 14A) y JEKO-1 (FIG. 14B) al tratamiento con ibrutinib.

La FIG. 15 es una representación gráfica que demuestra el efecto del tratamiento con ibrutinib en un modelo *in vivo* de MCL.

Las FIGs. 16A, 16B, 16C, 16D, 16E, 16F y 16G caracterizan las líneas celulares utilizadas para modelar el MCL sensible a ibrutinib y resistente a ibrutinib. La FIG. 16A es una imagen de una línea celular RL. La FIG. 16B es un conjunto de diagramas de dispersión de citometría de flujo que muestran la expresión de CD19 y CD5 en líneas celulares RL primarias y RL. La FIG. 16C es una imagen que muestra la translocación t(11; 14) por hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La FIG. 16D es un gráfico que muestra la CI50 (en porcentaje de conversión de MTT) de la inhibición de ibrutinib en diferentes líneas celulares. La FIG. 16E es un conjunto de imágenes y gráficos que muestran el injerto de células RL en ratones NOD-SCID- $\gamma$  inactivados en la cadena (NSG) y la carga tumoral resultante. La FIG. 16F es un conjunto de imágenes histológicas que muestran la localización de células MCL en diversos órganos en ratones. La FIG. 16G es un conjunto de imágenes histológicas de ratones a los que se les han inyectado células MCL-RL.

Las FIGs. 17A, 17B, 17C, 17D, 17E y 17F muestran la actividad de CART19 contra células MCL sensibles a ibrutinib y resistentes a ibrutinib. La FIG. 17A es un conjunto de gráficos que muestran el número de células CART19 CD107a+ cuando se exponen a diversas líneas celulares de MCL. La FIG. 17B es un conjunto de gráficos que muestran la cantidad de IL-2 y TNF- $\alpha$  producida por las células CART19 cuando se exponen a diversas líneas celulares de MCL. La FIG. 17C es un gráfico que muestra el porcentaje de exterminio de diversas líneas celulares MCL por parte de células CART19 en diversas proporciones de células efectoras. La FIG. 17D es un gráfico que muestra la cantidad de éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE), una medida de proliferación, en células

CART19 expuestas a diversas líneas celulares MCL. La FIG. 17E es un conjunto de gráficos que muestran el porcentaje de células T antes y después de la expansión. La FIG. 17F es un conjunto de gráficos que muestra el porcentaje de células T no transducidas o transducidas con CAR-19 que expresan o producen diversas biomoléculas (p. ej., citoquinas).

Las FIGs. 18A, 18B, 18C, 18D, 18E y 18F ensayan células CART19 expuestas a ibrutinib. La FIG. 18A es un conjunto de imágenes que muestran la activación de la quinasa de células T inducible por interleuquina-2 (ITK) cuando las células CART19 se estimularon de forma específica o no específica. La FIG. 18B es un conjunto de gráficos que muestran la expresión en superficie de CD107a (una medida de desgranulación), la producción de IL-2 y la producción de TNF-alfa por parte de células CART19 con diversas concentraciones con ibrutinib. La FIG. 18C es un conjunto de histogramas que muestran la cantidad de CFSE en las células CART19 con diversas concentraciones de ibrutinib y expuestas a diversas líneas celulares de MCL. La FIG. 18D es un conjunto de gráficos que muestran la expresión o producción de diversas citoquinas y biomarcadores como indicadores del estado Th1 o Th2 de las células CART19 cuando se combinan con diferentes concentraciones de ibrutinib. La FIG. 18E es un conjunto de gráficos que muestran el porcentaje de exterminio por parte de células CART19 de diversas líneas celulares MCL cuando se combinan con diferentes concentraciones de ibrutinib. La FIG. 18F es un gráfico de barras que muestra la expresión de diversos marcadores de la función citotóxica intrínseca de células CART19 cuando se combinan con diversas concentraciones de ibrutinib.

La FIG. 19 es un esquema de una configuración experimental de modelo de ratón in vivo para testar el efecto de CART19 y/o ibrutinib en ratones inyectados con MCL-RL, con una lectura de luminiscencia (una medida del número de células tumorales).

La FIG. 20 es un esquema de una configuración experimental de modelo de ratón in vivo para testar el efecto de CART19 y/o ibrutinib en ratones inyectados con MCL-RL, con una lectura de luminiscencia (una medida del número de células tumorales).

La FIG. 21 es un conjunto de gráficos que muestran la luminiscencia (una medida de la medida del número de células tumorales) en ratones tratados con ibrutinib a diferentes concentraciones y su supervivencia global después del tratamiento.

La FIG. 22 es un conjunto de gráficos que muestran la luminiscencia (una medida del número de células tumorales) en ratones tratados con ibrutinib o células CART19, así como su supervivencia global después del tratamiento.

La FIG. 23 es un gráfico que muestra la luminiscencia (una medida del número de células tumorales) en ratones después del tratamiento con ibrutinib, células T no transducidas, ibrutinib con células T no transducidas, células CART19 y células CART19 con ibrutinib.

La FIG. 24 es un gráfico que muestra la luminiscencia (una medida del número de células tumorales) en ratones después del tratamiento con ibrutinib solo, células CART19 solas o la combinación de ibrutinib con células CART19.

La FIG. 25A es un conjunto de gráficos que muestran el nivel de citoquinas Th1 producidas en ratones tratados con ibrutinib y/o células CART19. La FIG. 25B es un conjunto de gráficos que muestran el nivel de citoquinas Th2 producidas en ratones tratados con ibrutinib y/o células CART19. La FIG. 25C es un gráfico que muestra el porcentaje de células que expresan el marcador de proliferación Ki67 en ratones tratados con células CART19 o células CART19 más ibrutinib. La FIG. 25D es un gráfico que muestra el porcentaje de células que expresan el marcador anti-apoptótico BCL-2 en ratones tratados con células CART19 o células CART19 más ibrutinib.

#### Descripción detallada

#### Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la invención.

El término "un" y "una" se refiere a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "aproximadamente" cuando se refiere a un valor medible como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de  $\pm 20\%$  o en algunos casos  $\pm 10\%$ , o en algunos casos  $\pm 5\%$ , o en algunos casos  $\pm 1\%$ , o en algunos casos  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

La expresión "receptor de antígeno quimérico" o, alternativamente, un "CAR" se refiere a un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en las realizaciones más simples, que cuando están en una célula efectora inmune, proporcionan a la célula especificidad para una célula diana, típicamente una célula cancerosa y con generación de señales intracelulares. En algunas realizaciones, un CAR comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplasmático (al que también se alude en esta memoria como "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora y/o coestimuladora tal como se define más adelante. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos está en la misma cadena polipeptídica (p. ej., comprende una proteína de fusión quimérica). En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos no son contiguos entre sí, p. ej., están en diferentes cadenas polipeptídicas. En algunas realizaciones, el conjunto de polipéptidos incluye un conmutador de la dimerización que, tras la presencia

de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, p. ej., puede acoplar un dominio de unión a antígeno a un dominio de señalización intracelular. En un aspecto, el dominio de señalización citoplasmático comprende un dominio de señalización primario (p. ej., un dominio de señalización primario de CD3-zeta). En un aspecto, la molécula de estimulación es la cadena zeta asociada con el complejo receptor de células T. En un aspecto, el dominio de señalización citoplasmático comprende, además, uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula coestimuladora tal como se define más adelante. En un aspecto, la molécula coestimuladora se elige de las moléculas coestimuladoras descritas en esta memoria, p. ej., 4-1BB (es decir, CD137), CD27, CD28 y/o ICOS. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimulante. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula coestimuladora y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimulante. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimulante. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende al menos dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimulante. En un aspecto, el CAR comprende una secuencia conductora opcional en el extremo amino (N-ter) de la proteína de fusión CAR. En un aspecto, el CAR comprende, además, una secuencia conductora en el extremo N del dominio de unión al antígeno extracelular, en donde la secuencia conductora se escinde opcionalmente del dominio de unión al antígeno (p. ej., un scFv) durante el procesamiento celular y la localización del CAR a la membrana celular.

La expresión "dominio de señalización" se refiere a la parte funcional de una proteína que actúa transmitiendo información dentro de la célula para regular la actividad celular mediante rutas de señalización definidas, generando segundos mensajeros o funcionando como efectores respondiendo a dichos mensajeros.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "CD19" se refiere a la proteína grupos de diferenciación 19, que es un determinante antigénico detectable en las células precursoras de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tal como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de CD19 humana se puede encontrar como UniProt/Swiss-Prot N° de Acceso P15391 y la secuencia de nucleótidos que codifica la CD19 humana se puede encontrar en el N° de Acceso NM\_001178098. Tal como se utiliza en esta memoria, "CD19" incluye proteínas que comprenden mutaciones, p. ej., mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, deleciones y variantes de corte y empalme de CD19 de tipo salvaje de longitud completa. CD19 se expresa en la mayoría de los cánceres de linaje B, que incluyen, p. ej., leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica y linfoma no Hodgkin. Otras células con expresión de CD19 se proporcionan más adelante en la definición de "enfermedad asociada con la expresión de CD19". También es un marcador precoz de progenitores de células B. Véase, p. ej., Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157- 1165 (1997). En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CART reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD19. En un aspecto, la proteína CD19 se expresa en una célula cancerosa.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "CD20" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en las células B CD20 humano también se denomina membrana que abarca 4 dominios, subfamilia A, miembro 1; (MS4A1). Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tal como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de CD20 humano se puede encontrar en los N°s de Acceso NP\_690605.1 y NP\_068769.2, y la secuencia de nucleótidos que codifica las variantes de transcripción 1 y 3 del CD20 humano se puede encontrar en el N° de acceso NM\_152866.2 y NM\_021950.3, respectivamente. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD20. En un aspecto, la proteína CD20 se expresa en una célula cancerosa.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "CD22" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células precursoras de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tal como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1-5 de CD22 humano se pueden encontrar en los N°s de Acceso NP 001762.2, NP 001172028.1, NP 001172029.1, NP 001172030.1 y NP 001265346.1, respectivamente, y la secuencia de nucleótidos que codifica las variantes 1-5 del CD22 humano se puede encontrar en los N°s de Acceso NM 001771.3, NM 001185099.1, NM 001185100.1, NM 001185101.1 y NM 001278417.1, respectivamente. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína CD22. En un aspecto, la proteína CD22 se expresa en una célula cancerosa.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "ROR1" se refiere a un determinante antigénico conocido por ser detectable en células precursoras de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanos y murinos se pueden encontrar en una base de datos pública, tal como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las isoformas 1 y 2 precursoras de ROR1 humano se pueden encontrar en los N°s de Acceso NP\_005003.2 y NP\_001077061.1, respectivamente, y las secuencias de ARNm que las codifican se pueden encontrar en los N°s de Acceso NM\_005012.3 y NM\_001083592.1, respectivamente. En un aspecto, la porción de unión a antígeno del CAR reconoce y se une a un antígeno dentro del dominio extracelular de la proteína ROR1. En un aspecto, la proteína ROR1 se expresa en una célula cancerosa.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una proteína o secuencia polipeptídica derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena sencilla o múltiple, o inmunoglobulinas intactas, y pueden derivarse de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una porción de un anticuerpo que conserva la capacidad de interactuar específicamente con (p. ej., mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítipo de un antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, fragmentos de anticuerpo scFv, Fvs enlazados por disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único, tales como sdAb (ya sea VL o VH), dominios VHH de camélidos, anticuerpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticuerpo, tal como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de bisagra, y una CDR aislada u otros fragmentos de unión a epítipo de un anticuerpo. También se puede incorporar un fragmento de unión a antígeno en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, p. ej., Hollinger y Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden injertar en armazones basados en polipéptidos tales como una fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de EE.UU. N°: 6.703.199, que describe minicuerpos polipeptídicos de fibronectina).

El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en donde las regiones variables de la cadena ligera y pesada están enlazadas contiguamente, p. ej., a través de un enlazador sintético, p. ej., un corto enlazador de polipéptido flexible y capaz de ser expresado como un polipéptido de cadena sencilla, y en donde el scFv conserva la especificidad del anticuerpo intacto del que se deriva. A menos que se especifique, tal como se utiliza en esta memoria, un scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, p. ej., con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL.

La porción del CAR de la divulgación que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en una diversidad de formas en las que el dominio de unión al antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo biespecífico (Harlow et al., 1999, en: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, en: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de una composición de CAR de la divulgación comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv. Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar utilizando cualquiera de un cierto número de esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia"), o una combinación de los mismos.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" se refiere a una proteína, p. ej., una cadena de inmunoglobulina o fragmento de la misma, que comprende al menos una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. La expresión "dominio de unión" o "molécula de anticuerpo" abarca anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En una realización, una molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífica, p. ej., comprende una pluralidad de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina, en donde una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un primer epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de la pluralidad tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo multiespecífica es una molécula de anticuerpo biespecífica. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad por no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo.

La porción del CAR de la divulgación que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo puede existir en una diversidad de formas en las que el dominio de unión al antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua que incluye, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo biespecífico (Harlow et al., 1999, en: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, en: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426). En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de una composición de CAR de la divulgación comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv.

La expresión "cadena pesada del anticuerpo" se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones que se producen de forma natural y que normalmente determina la clase a la que pertenece el anticuerpo.

La expresión "cadena ligera de anticuerpo" se refiere al más pequeño de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones que se producen de forma natural. Las cadenas ligeras kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ) se refieren a los dos isotipos principales de cadenas ligeras de anticuerpos.

La expresión "región determinante de la complementariedad" o "CDR", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables del anticuerpo que confieren especificidad y afinidad de unión al antígeno. Por ejemplo, en general, hay tres CDRs en cada una de las regiones variables de cadena pesada (p. ej., HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y tres CDRs en cada una de las regiones variables de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar utilizando cualquiera de un cierto número de esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (esquema de numeración "Chothia"), o una combinación de los mismos. Bajo el esquema de numeración de Kabat, en algunas realizaciones, los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de la cadena pesada (VH) se numeran 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR en el dominio variable de cadena ligera (VL) se numeran 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). Bajo el esquema de numeración de Chothia, en algunas realizaciones, los aminoácidos de CDR en el VH se numeran 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los residuos de aminoácidos de CDR en la VL se numeran 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3). En un esquema de numeración combinado de Kabat y Chothia, en algunas realizaciones, las CDRs corresponden a los residuos de aminoácidos que forman parte de una CDR de Kabat, una CDR de Chothia o ambas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las CDRs corresponden a los residuos de aminoácidos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en una VH, p. ej., una VH de mamífero, p. ej., una VH humana; y los residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en una VL, p. ej., una VL de mamífero, p. ej., una VL humana.

La expresión "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se genera utilizando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago o un sistema de expresión de levadura. La expresión también debe interpretarse como un anticuerpo que ha sido generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido utilizando ADN recombinante o tecnología de secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

El término "antígeno" o "Ag" se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la materia comprenderá que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o los péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia comprenderá que cualquier ADN, que comprenda una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifique una proteína que provoca una respuesta inmune, codifica por lo tanto un "antígeno" tal como se utiliza ese término en esta memoria. Además, un experto en la técnica comprenderá que no es necesario que un antígeno sea codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es fácilmente evidente que la presente divulgación incluye, pero no se limita al uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen, y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en diversas combinaciones para codificar polipéptidos que provocan la respuesta inmune deseada. Además, un experto en la técnica comprenderá que un antígeno no necesita ser codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente evidente que un antígeno puede generarse sintetizado o puede derivarse de una muestra biológica, o puede ser una macromolécula además de un polipéptido. Una muestra biológica de este tipo puede incluir, pero no se limita a una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido con otros componentes biológicos.

La expresión "efecto anti-cáncer" se refiere a un efecto biológico que puede ser manifestado por diversos medios, incluyendo pero no limitados a, p. ej., una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células cancerosas, una disminución en el número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida, una disminución de la proliferación de células cancerosas, una disminución de la supervivencia de las células cancerosas o mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto anti-cáncer" también se puede manifestar por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de prevenir la aparición de cáncer en primer lugar. La expresión "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por diversos medios, que incluyen, pero no se limitan a una disminución del volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en la proliferación de células tumorales o una disminución en la supervivencia de las células tumorales.

El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo a quien más tarde se ha de reintroducir en el individuo.

El término "alogénico" se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se le introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser lo suficientemente diferente genéticamente como para interactuar antigénicamente.

El término "xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.

El término "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de diversos cánceres se describen en esta memoria e incluyen, pero no se limitan a cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares. Los términos "tumor" y "cáncer" se utilizan indistintamente en esta memoria, p. ej., ambos términos abarcan tumores sólidos y líquidos, p. ej., difusos o circulantes. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "cáncer" o "tumor" incluye cánceres y tumores premalignos, así como malignos.

La expresión "enfermedad asociada con la expresión de CD19" incluye, pero no se limita a una enfermedad asociada con la expresión de CD19 o afección asociada con células que expresan, o expresan en cualquier momento, CD19 incluyendo, p. ej., enfermedades proliferativas tales como un cáncer o tumor maligno o una afección precancerosa tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan CD19. Para evitar dudas, una enfermedad asociada con la expresión de CD19 puede incluir una afección asociada con células que actualmente no expresan CD19, p. ej., porque la expresión de CD19 se ha regulado a la baja, p. ej., debido al tratamiento con una molécula que fija como objetivo CD19, p. ej. CD19 CAR, pero que en un momento expresó CD19. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico. En un aspecto, el cáncer hematológico es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 incluye cánceres y tumores malignos, incluyendo, pero no limitados a, p. ej., uno o más leucemias agudas, incluyendo pero no limitadas a, p. ej., Leucemia Linfoide de células B aguda (BALL), Leucemia Linfoide de células T aguda (TALL), leucemia linfoide aguda (ALL); una o más leucemias crónicas que incluyen, pero no se limitan a, p. ej., leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoide crónica (CLL). Cánceres o afecciones hematológicas adicionales asociados con la expresión de CD19 comprenden, pero no se limitan a, p. ej., leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o un linfoma folicular de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto (MCL), linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoide, macroglobulinemia de Waldenström y «preleucemia», que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células de la sangre mieloides y similares. Enfermedades adicionales asociadas con la expresión de CD19 incluyen, pero no se limitan a, p. ej., cánceres atípicos y/o no clásicos, tumores malignos, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD19. Indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de CD19 incluyen, pero no se limitan a, p. ej., enfermedad autoinmune (p. ej., lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes. En algunas realizaciones, las células que expresan el antígeno tumoral expresan, o expresan en cualquier momento, el ARNm que codifica el antígeno tumoral. En una realización, las células que expresan el antígeno tumoral producen la proteína del antígeno tumoral (p. ej., de tipo salvaje o mutante), y la proteína del antígeno tumoral puede estar presente a niveles normales o niveles reducidos. En una realización, las células que expresan el antígeno tumoral produjeron niveles detectables de una proteína antigénica tumoral en un punto, y posteriormente no produjeron sustancialmente proteína antigénica tumoral detectable alguna.

La expresión «enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B incluye, pero no se limita a una enfermedad asociada con la expresión de CD19, CD20, CD22 o ROR1 o una afección asociada con células que

expresan, o expresan en cualquier momento, CD19, CD20, CD22 o ROR1, incluyendo, p. ej., enfermedades proliferativas tales como un cáncer o tumor maligno o una afección precancerosa tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan CD19, CD20, CD22 o ROR1. Para evitar dudas, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B puede incluir una afección asociada con células que actualmente no expresan el antígeno de células B, p. ej., porque la expresión del antígeno se ha regulado a la baja, p. ej., debido al tratamiento con una molécula que fija como objetivo el antígeno de células B, p. ej., un CAR que fija como objetivo células B, pero que en un momento expresó el antígeno. La expresión "enfermedad asociada con la expresión de un antígeno de células B" incluye una enfermedad asociada con la expresión de CD19, tal como se describe en esta memoria.

La expresión "modificaciones de secuencia conservativas" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran de manera significativa las características de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Modificaciones conservadoras de este tipo incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la divulgación mediante técnicas estándares conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de carácter básico (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de un CAR de la divulgación pueden reemplazarse por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el CAR alterado puede testarse utilizando los ensayos funcionales descritos en esta memoria.

El término "estimulación" se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (p. ej., un complejo TCR/CD3 o CAR) con su ligando afín (o antígeno tumoral en el caso de un CAR) mediando con ello un evento de transducción de señales, tales como, pero no limitados a la transducción de señales a través del complejo TCR/CD3 o la transducción de señales a través del receptor NK apropiado o los dominios de señalización del CAR. La estimulación puede mediar en la expresión alterada de determinadas moléculas.

La expresión "molécula estimulante" se refiere a una molécula expresada por una célula inmunitaria (p. ej., célula T, célula NK, célula B) que proporciona la o las secuencias de señalización citoplasmática que regulan la activación de la célula inmunitaria de forma estimulante para al menos algún aspecto de la vía de señalización de las células inmunitarias. En un aspecto, la señal es una señal primaria que se inicia, p. ej., mediante la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, y que conduce a la mediación de una respuesta de células T, que incluye, pero no se limita a proliferación, activación, diferenciación y similares. Una secuencia de señalización citoplasmática primaria (a la que también se alude como "dominio de señalización primario") que actúa de manera estimulante puede contener un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM. Ejemplos de una secuencia de señalización citoplasmática que contiene ITAM que es de uso particular en la divulgación incluye, pero no se limita a las derivadas de CD3 zeta, FcR gamma común (FCER1G), Fc gamma RIIa, FcR beta (Fc Epsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD79a, CD79b, DAP10 y DAP12. En un CAR específico de la divulgación, el dominio de señalización intracelular en uno o más CARS de la divulgación comprende una secuencia de señalización intracelular, p. ej., una secuencia de señalización primaria de CD3-zeta. En un CAR específico de la divulgación, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 17 (CD3 zeta mutante humano), o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares. En un CAR específico de la divulgación, la secuencia de señalización primaria de CD3-zeta es la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 43 (CD3 zeta humano de tipo salvaje), o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares.

La expresión "célula presentadora de antígeno" o "APC" se refiere a una célula del sistema inmunológico tal como una célula accesoria (p. ej., una célula B, una célula dendrítica y similares) que exhibe un antígeno extraño complejado con complejos principales de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Las células T pueden reconocer estos complejos utilizando sus receptores de células T (TCRs). Las APCs procesan antígenos y los presentan a las células T.

Un "dominio de señalización intracelular", tal como se utiliza la expresión en esta memoria, se refiere a una porción intracelular de una molécula. El dominio de señalización intracelular genera una señal que fomenta una función efectora inmunitaria de la célula que contiene el CAR, p. ej., una célula CART. Ejemplos de función efectora inmunitaria, p. ej., en una célula CART, incluyen actividad citolítica y actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citoquinas. En realizaciones, el dominio de señalización intracelular es la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque habitualmente se

5 puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar la cadena completa. En la medida en que se utilice una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede utilizar en lugar de la cadena intacta, siempre que transduzca la señal de la función efectora. Por lo tanto, la expresión dominio de señalización intracelular pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular, suficiente para transducir la señal de la función efectora.

10 En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización intracelular primario. Dominios de señalización intracelular primarios ejemplares incluyen los derivados de las moléculas responsables de la estimulación primaria o la simulación dependiente de antígeno. En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular coestimulador. Dominios de señalización intracelular coestimuladores ejemplares incluyen los derivados de moléculas responsables de las señales coestimuladoras o la estimulación independiente del antígeno. Por ejemplo, en el caso de una CART, un dominio de señalización intracelular primario puede comprender una secuencia citoplasmática de un receptor de células T, y un dominio de señalización intracelular coestimulador puede comprender una secuencia citoplasmática del co-receptor o molécula coestimuladora.

15 Un dominio de señalización intracelular primario puede comprender un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina o ITAM. Ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen, pero no se limitan a los derivados de CD3 zeta, FcR gamma, FcR gamma común (FCER1G), Fc gamma RIIa, FcR beta (Fc Epsilon R1b), CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"), FcεRI, CD66d, CD32, DAP10 y DAP12.

20 El término "zeta" o, alternativamente, "cadena zeta", "CD3-zeta" o "TCR-zeta" se define como la proteína proporcionada como GenBank N° de Acc. BAG36664.1, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares, y un "dominio estimulante zeta" o, alternativamente, un "dominio estimulante CD3-zeta" o un "dominio estimulante TCR- zeta" se define como los residuos de aminoácidos del dominio citoplasmático de la cadena zeta, o derivados funcionales de los mismos, que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de células T. En un aspecto, el dominio citoplasmático de zeta comprende los residuos 52 a 164 de GenBank N° de Acc. BAG36664.1 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares, que son ortólogos funcionales de los mismos. En un aspecto, el dominio "estimulante zeta" o un "dominio estimulante CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 17 En un aspecto, el dominio "estimulante zeta" o un "dominio estimulante CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 43

25 La expresión "molécula coestimuladora" se refiere al participante en la unión afín en una célula T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando con ello una respuesta coestimuladora por la célula T, tal como, pero no limitado a, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que contribuyen a una respuesta inmune eficaz. Moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a una molécula de MHC de clase I, una proteína receptora de TNF, una proteína similar a inmunoglobulina, un receptor de citoquina, una integrina, una molécula de activación linfocítica de señalización (proteína SLAM), un receptor de células NK activador, BTLA, un receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, 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,y un ligando que se une específicamente con CD83.

30 Un dominio de señalización intracelular coestimulador se refiere a la porción intracelular de una molécula coestimuladora. El dominio de señalización intracelular puede comprender la porción intracelular completa, o el dominio de señalización intracelular nativo completo, de la molécula de la que se deriva, o un fragmento funcional o derivado de la misma.

35 El término "4-1BB" se refiere a un miembro de la superfamilia TNFR con una secuencia de aminoácidos proporcionada como GenBank N° de Acc. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares ; y un "dominio coestimulador 4-1BB" se define como los residuos de aminoácidos 214-255 de GenBank N° de Acc AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares. En un aspecto, el "dominio coestimulador 4-1BB" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 16 o los residuos equivalentes de una especie no humana, p. ej., ratón, roedor, mono, simio y similares.

40 "Célula efectora inmunitaria", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una célula que está implicada en una respuesta inmunitaria, p. ej., en la promoción de una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de células efectoras

inmunes incluyen células T, p. ej., células T alfa/beta y células T gamma/delta, células B, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), mastocitos y fagocitos derivados de mieloides.

5 "Función efectora inmune o respuesta efectora inmune", tal como se utiliza esa expresión en esta memoria, se refiere a la función o respuesta, p. ej., de una célula efectora inmunitaria, que potencia o fomenta un ataque inmune de una célula diana. P. ej., una función o respuesta efectora inmunitaria se refiere a una propiedad de una célula T o NK que fomenta la muerte o la inhibición del crecimiento o la proliferación de una célula diana. En el caso de una célula T, la estimulación primaria y la co-estimulación son ejemplos de función o respuesta efectora inmunitaria.

10 La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citoquinas.

15 La expresión "que codifica" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen ya sea una secuencia definida de nucleótidos (p. ej., ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Por lo tanto, un gen, ADNc o ARN codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto a la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y habitualmente se proporciona en listados de secuencias, como a la cadena no codificante, utilizada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, se la puede aludir como codificante de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

20 A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La expresión secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener en alguna versión un intrón o intrones.

30 La expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza indistintamente en esta memoria, y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, tal como se describe en esta memoria, eficaz para conseguir un resultado biológico particular. En un caso no limitativo, la expresión "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto descrito en esta memoria que, cuando se administra a un sujeto, es eficaz para (1) al menos parcialmente aliviar, inhibir, prevenir y/o mejorar una afección, o un trastorno o una enfermedad (i) mediada por BTK, o (ii) asociada con la actividad de BTK, o (iii) caracterizada por la actividad (normal o anormal) de BTK; o (2) reducir o inhibir la actividad de BTK; o (3) reducir o inhibir la expresión de BTK. En otro caso no limitativo, la expresión "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del compuesto descrito en esta memoria que, cuando se administra a una célula, o un tejido, o un material biológico no celular, o un medio, es eficaz para reducir o inhibir al menos parcialmente la actividad de BTK; o reducir o inhibir la expresión de BTK parcial o completamente.

40 El término "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

45 El término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida por un promotor.

50 La expresión "vector de transferencia" se refiere a una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede utilizarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero no se limitan a polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilicos, plásmidos y virus. Por tanto, la expresión "vector de transferencia" incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. El término también debe interpretarse para incluir, además, compuestos no plásmidos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, un compuesto de polilisina, liposomas y similares. Ejemplos de vectores de transferencia viral incluyen, pero no se limitan a vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.

60 La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos a ser expresada. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en un sistema de expresión in vitro. Vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, incluyendo cósmidos, plásmidos (p. ej., desnudos o

contenidos en liposomas) y virus (p. ej., lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

5 El término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus al ser capaces de infectar células que no se dividen; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula huésped, por lo que son uno de los métodos más eficientes de un vector de suministro de genes. El VIH, el VIS y el VIF son todos ejemplos de lentivirus.

10 La expresión "vector lentivírico" se refiere a un vector derivado de al menos una porción de un genoma de lentivirus, que incluye especialmente un vector lentivírico auto-inactivante tal como se proporciona en Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453- 1464 (2009). Otros ejemplos de vectores de lentivirus que pueden ser utilizados en la clínica incluyen, pero se no limitan a, p. ej., la tecnología LENTIVECTOR® de suministro de genes de Oxford BioMedica, el sistema vector LENTIMAX™ de Lentigen y similares. También están disponibles tipos no clínicos de vectores lentivirales y serán conocidos por un experto en la técnica.

15 El término "homólogo" o "identidad" se refiere a la identidad de la secuencia de la subunidad entre dos moléculas poliméricas, p. ej., entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; p. ej., si la mitad (p. ej., cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50% homólogas; si el 90% de las posiciones (p. ej., 9 de 10) coinciden o son homólogas, las dos secuencias son 90% homólogas.

25 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados y sus fragmentos de anticuerpos son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o fragmento de anticuerpo) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos no humanos correspondientes. Además, un anticuerpo/fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o en las secuencias de marco. Estas modificaciones pueden refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo del mismo comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o una parte significativa de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

45 "Completamente humana" se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en que la molécula completa es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo o inmunoglobulina.

50 El término "aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o una proteína aislada puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no nativo tal como, p. ej., una célula huésped.

55 En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácido nucleico que se encuentran comúnmente. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina y "U" se refiere a uridina.

60 La expresión "enlazado operativamente" o "control transcripcional" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente enlazada con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente enlazado a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Secuencias de ADN operativamente enlazadas

pueden ser contiguas entre sí y, p. ej., cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteína, están en el mismo marco de lectura.

La expresión administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, p. ej., técnicas de inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) o intraesternal, intratumoral o por infusión.

La expresión "ácido nucleico" o el término "polinucleótido" se refiere a ácido desoxirribonucleico (DN la expresión "ácido nucleico" incluye un gen, ADNc o un ARNm. En una realización, la molécula de ácido nucleico es sintética (p. ej., es sintetizada químicamente) o recombinante. A) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma de cadena sencilla o de doble cadena. A menos que se limite específicamente, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos o derivados de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos que se producen de forma natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNPs y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y se refieren a un compuesto que comprende residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o un péptido deben contener al menos dos aminoácidos, y no se establece limitación alguna en el número máximo de aminoácidos que pueden comprender una secuencia de proteína o de péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en esta memoria, el término se refiere tanto a cadenas cortas, a las que también se alude comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, a las que generalmente se las alude en la técnica como proteínas, de las cuales hay muchos tipos. "Polipéptidos" incluyen, p. ej., fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Un polipéptido incluye un péptido natural, un péptido recombinante o una combinación de los mismos.

El término «promotor» se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

La expresión "secuencia promotora/reguladora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico enlazado operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y, en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, p. ej., una que exprese el producto génico de una manera específica para el tejido.

La expresión promotor "constitutivo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se enlaza operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula en la mayoría o en todas las condiciones fisiológicas de la célula.

La expresión promotor "inducible" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se enlaza operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

La expresión promotor "específico para el tejido" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se enlaza operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

La expresión "enlazador polipeptídico flexible" o "enlazador", tal como se utiliza en el contexto de un scFv, se refiere a un enlazador peptídico que consiste en aminoácidos tales como glicina y/o residuos de serina utilizados solos o en combinación, para enlazar entre sí regiones de cadena variable pesada y variable ligera. En una realización, el enlazador polipeptídico flexible es un enlazador Gly/Ser y comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>, en que n es un número entero positivo igual a o mayor que 1. Por ejemplo, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5, n=6, n=7, n=8, n=9 y n=10 (SEQ ID NO:105). En una realización, los enlazadores polipeptídicos flexibles incluyen, pero no se limitan a (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 106) o (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 107). En otra realización, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly<sub>2</sub>Ser), (GlySer) o (Gly<sub>3</sub>Ser) (SEQ ID NO: 108). En una realización, el enlazador es GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 142) También se incluyen dentro del alcance de la divulgación los enlazadores descritos en el documento WO2012/138475.

5 Como se utiliza en esta memoria, un casquete 5' (también denominado casquete de ARN, un casquete de ARN 7-metilguanosa o un casquete de ARN m<sup>7</sup>G) es un nucleótido de guanina modificado que ha sido añadido al "frente" o extremo 5' de un ARN mensajero de un eucariota poco después del inicio de la transcripción. El casquete 5' consiste en un grupo terminal que está enlazado al primer nucleótido transcrito. Su presencia es importante para el reconocimiento por parte del ribosoma y la protección contra RNasas. La adición del casquete está acoplada a la transcripción y se produce junto con la transcripción, de modo que cada uno influye sobre el otro. Poco después del inicio de la transcripción, el extremo 5' del ARNm que está siendo sintetizado se une mediante un complejo sintetizador del casquete asociado con la ARN polimerasa. Este complejo enzimático cataliza las reacciones químicas requeridas para el remate con casquete del ARNm. La síntesis prosigue como una reacción bioquímica multi-etapas. El resto de remate con casquete se puede modificar para modular la funcionalidad del ARNm, tal como su estabilidad o eficiencia de traducción.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, "ARN transcrito in vitro" se refiere a ARN, p. ej., ARNm, que ha sido sintetizado in vitro. Generalmente, el ARN transcrito in vitro se genera a partir de un vector de transcripción in vitro. El vector de transcripción in vitro comprende un molde que se utiliza para generar el ARN transcrito in vitro.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, un "poli(A)" es una serie de adenosinas unidas por poliadenilación al ARNm. En algunos casos de una construcción para la expresión transitoria, el poliA está entre 50 y 5000 (SEQ ID NO: 109), preferiblemente mayor que 64, p. ej., mayor que 100, p. ej., mayor que 300 o 400. Secuencias de poli(A) pueden ser modificadas química o enzimáticamente para modular la funcionalidad de ARNm, tal como la localización, la estabilidad o la eficiencia de la traducción.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, "poliadenilación" se refiere al enlace covalente de un resto poliadenililo, o su variante modificada, a una molécula de ARN mensajero. En los organismos eucarióticos, la mayoría de las moléculas de ARN mensajero (ARNm) están poliadeniladas en el extremo 3'. La cola 3' poli(A) es una secuencia larga de nucleótidos de adenina (a menudo varios cientos) añadidos al pre-ARNm mediante la acción de una enzima, poliadenilato polimerasa. En eucariotas superiores, la cola de poli(A) se añade a las transcripciones que contienen una secuencia específica, la señal de poliadenilación. La cola de poli(A) y la proteína unida a ella ayudan a proteger el ARNm de la degradación por parte de exonucleasas. La poliadenilación también es importante para la terminación de la transcripción, la exportación del ARNm del núcleo y la traducción. La poliadenilación se produce en el núcleo inmediatamente después de la transcripción del ADN en ARN, pero adicionalmente también se puede producir más tarde en el citoplasma. Una vez terminada la transcripción, la cadena de ARNm se escinde mediante la acción de un complejo de endonucleasa asociado con la ARN polimerasa. El sitio de escisión se caracteriza habitualmente por la presencia de la secuencia de bases AAUAAA cerca del sitio de escisión. Una vez que se ha escindido el ARNm, se añaden residuos de adenosina al extremo 3' libre en el sitio de escisión.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, "transitoria" se refiere a la expresión de un transgén no integrado durante un período de horas, días o semanas, en donde el período de tiempo de expresión es menor que el período de tiempo para la expresión del gen si está integrado en el genoma o está contenido dentro de un replicón plasmídico estable en la célula huésped.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de un trastorno proliferativo, o a la mejora de uno o más síntomas (p. ej., uno o más síntomas discernibles) de un trastorno proliferativo resultante de la administración de una o más terapias (p. ej., uno o más agentes terapéuticos tales como un CAR descrito en esta memoria). En realizaciones específicas, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la mejora de al menos un parámetro físico medible de un trastorno proliferativo, tal como el crecimiento de un tumor, no necesariamente discernible por el paciente. En otras realizaciones, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" - se refieren a la inhibición de la progresión de un trastorno proliferativo, ya sea físicamente mediante, p. ej., la estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente mediante, p. ej., la estabilización de un trastorno físico, parámetro, o ambos. En otras realizaciones, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la reducción o estabilización del tamaño del tumor o el recuento de células cancerosas.

55 La expresión "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señales que juegan un papel en la transmisión de una señal desde una porción de una célula a otra porción de una célula. La expresión "receptor de la superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitir la señal a través de la membrana de una célula.

60 El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmune (p. ej., mamíferos, seres humanos).

La expresión una célula "sustancialmente purificada" se refiere a una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que ha sido separada de otros tipos

de células con las que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a las células que han sido separadas de las células con las que están asociadas de forma natural en su estado natural. En algunos aspectos, las células se cultivan in vitro. En otros aspectos, las células no se cultivan in vitro.

El término "terapéutico", tal como se utiliza en esta memoria, significa un tratamiento. Se obtiene un efecto terapéutico mediante la reducción, supresión, remisión o erradicación de una enfermedad.

El término "profilaxis", tal como se utiliza en esta memoria, significa la prevención o el tratamiento protector de una enfermedad o estado patológico.

En el contexto de la presente divulgación, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo" se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos. En determinados aspectos, los antígenos del trastorno hiperproliferativo de la presente divulgación se derivan de cánceres que incluyen, pero no se limitan a melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer del cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y similares.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" se refiere a un proceso mediante el cual se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en la célula huésped. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula objeto primaria y su progenie.

La expresión "se une específicamente" se refiere a un anticuerpo, o un ligando, que reconoce y se une a una proteína asociada de unión presente en una muestra, pero cuyo anticuerpo o ligando no reconoce o une sustancialmente otras moléculas en la muestra.

"Receptor de antígeno quimérico regulable (RCAR)", tal como se utiliza esta expresión en esta memoria, se refiere a un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en las realizaciones más simples, que cuando están en una célula RCARX, proporcionan a la célula RCARX especificidad para una célula diana, típicamente una célula cancerosa, y con generación o proliferación de señales intracelulares regulables, que pueden optimizar una propiedad efectora inmunitaria de la célula RCARX. Una célula RCARX se basa, al menos en parte, en un dominio de unión a antígeno para proporcionar especificidad a una célula diana que comprende el antígeno unido por el dominio de unión a antígeno. En una realización, un RCAR incluye un conmutador de la dimerización que, tras la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar un dominio de señalización intracelular al dominio de unión al antígeno.

"Anclaje de membrana" o "dominio de anclaje de membrana", tal como se utiliza esta expresión en esta memoria, se refiere a un polipéptido o resto, p. ej., un grupo miristoílo, suficiente para anclar un dominio extracelular o intracelular a la membrana plasmática.

"Dominio de conmutación", tal como se utiliza esta expresión en esta memoria, p. ej., cuando se hace referencia a un RCAR, se refiere a una entidad, típicamente una entidad basada en polipéptidos, que, en presencia de una molécula de dimerización, se asocia con otro dominio de conmutación. La asociación da como resultado un acoplamiento funcional de una primera entidad enlazada, p. ej., fusionada a, un primer dominio de conmutación, y una segunda entidad enlazada a, p. ej., fusionada a, un segundo dominio de conmutación. A un primer y un segundo dominio de conmutación se les alude colectivamente como conmutador de la dimerización. En realizaciones, los dominios de conmutación primero y segundo son iguales entre sí, p. ej., son polipéptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos primaria, y se les alude colectivamente como conmutador de la homodimerización. En realizaciones, los dominios de conmutación primero y segundo son diferentes entre sí, p. ej., son polipéptidos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos primarios, y se les alude colectivamente como conmutador de la heterodimerización. En realizaciones, el conmutador es intracelular. En realizaciones, el conmutador es intracelular. En realizaciones, el dominio de conmutación es una entidad basada en polipéptidos, p. ej., basada en FKBP o FRB, y la molécula de dimerización es una molécula pequeña, p. ej., un rapálogo. En realizaciones, el dominio de conmutación es una entidad basada en polipéptidos, p. ej., un scFv que se une a un péptido myc, y la molécula de dimerización es un polipéptido, un fragmento del mismo o un multímero de un polipéptido, p. ej., un ligando myc o multímeros de un ligando myc que se unen a uno o más scFvs myc. En realizaciones, el dominio de conmutación es una entidad basada en polipéptidos, p. ej., receptor myc, y la molécula de dimerización es un anticuerpo o fragmentos del mismo, p. ej., anticuerpo myc.

"Molécula de dimerización", tal como se utiliza esta expresión en esta memoria, p. ej., cuando se refiere a un RCAR, se refiere a una molécula que fomenta la asociación de un primer dominio de conmutación con un segundo dominio de conmutación. En realizaciones, la molécula de dimerización no se produce de forma natural en el sujeto, o no se

produce en concentraciones que darían como resultado una dimerización significativa. En realizaciones, la molécula de dimerización es una molécula pequeña, p. ej., rapamicina o un rapálogo, p. ej., RAD001.

El término "bioequivalente" se refiere a una cantidad de un agente diferente al compuesto de referencia (p. ej., RAD001), requerida para producir un efecto equivalente al efecto producido por la dosis de referencia o la cantidad de referencia del compuesto de referencia (p. ej., RAD001). En una realización, el efecto es el nivel de inhibición de mTOR, p. ej., medido por la inhibición de la quinasa P70 S6, p. ej., según se evalúa en un ensayo *in vivo* o *in vitro*, p. ej., según se mide mediante un ensayo descrito en esta memoria, p. ej., el ensayo de Boulay o la medición de los niveles de S6 fosforilado por transferencia Western. En una realización, el efecto es la alteración de la relación de células T PD-1 positivas/PD-1 negativas, medida por clasificación celular. En una realización, una cantidad o dosis bioequivalente de un inhibidor de mTOR es la cantidad o dosis que alcanza el mismo nivel de inhibición de la quinasa P70 S6 que la dosis de referencia o la cantidad de referencia de un compuesto de referencia. En una realización, una cantidad o dosis bioequivalente de un inhibidor de mTOR es la cantidad o dosis que logra el mismo nivel de alteración en la relación de células T PD-1 positivas/PD-1 negativas que la dosis de referencia o la cantidad de referencia de un compuesto de referencia.

La expresión "dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico", cuando se utiliza junto con un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR alostérico, p. ej., RAD001 o rapamicina, o un inhibidor de mTOR catalítico, se refiere a una dosis de inhibidor de mTOR que parcialmente, pero no completamente inhibe la actividad de mTOR, p. ej., medida por la inhibición de la actividad de la quinasa P70 S6. Métodos para evaluar la actividad de mTOR, p. ej., mediante la inhibición de la quinasa P70 S6, se describen en esta memoria. La dosis es insuficiente para dar como resultado una inmunosupresión completa, pero es suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria. En una realización, la dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de inhibidor de mTOR da como resultado una disminución en el número de células T PD-1 positivas y/o un aumento en el número de células T PD-1 negativas, o un aumento en la relación de células T PD-1 negativas/células T PD-1 positivas. En una realización, la dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de inhibidor de mTOR da como resultado un aumento en el número de células T naíf. En una realización, la dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de inhibidor de mTOR da como resultado uno o más de lo siguiente:

- un aumento en la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD62L<sup>high</sup>, CD127<sup>high</sup>, CD27<sup>+</sup> y BCL2, p. ej., en células T de la memoria, p. ej., precursores de células T de la memoria;
- una disminución en la expresión de KLRG1, p. ej., en células T de la memoria, p. ej., precursores de células T de la memoria; y
- un aumento en el número de precursores de células T de la memoria, p. ej., células con una cualquiera o una combinación de las siguientes características: CD62L<sup>high</sup> incrementada, CD127<sup>high</sup> incrementada, CD27<sup>+</sup> incrementada, KLRG1 reducida y BCL2 incrementada;

en donde se produce cualquiera de los cambios arriba descritos, p. ej., al menos de forma transitoria, p. ej., en comparación con un sujeto no tratado.

"Refractario", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una enfermedad, p. ej., cáncer, que no responde a un tratamiento. En realizaciones, un cáncer refractario puede ser resistente a un tratamiento antes o al comienzo del tratamiento. En otras realizaciones, el cáncer refractario puede volverse refractario durante un tratamiento.

Un "respondedor completo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un sujeto que tiene una enfermedad, p. ej., un cáncer, que exhibe una respuesta completa, p. ej., una remisión completa, a un tratamiento. Una respuesta completa puede identificarse, p. ej., utilizando los criterios de Cheson tal como se describe en esta memoria.

Un "respondedor parcial", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un sujeto que tiene una enfermedad, p. ej., un cáncer, que exhibe una respuesta parcial, p. ej., una remisión parcial, a un tratamiento. Una respuesta parcial puede identificarse, p. ej., utilizando los criterios de Cheson.

Un "no respondedor", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un sujeto que tiene una enfermedad, p. ej., un cáncer, que no muestra una respuesta a un tratamiento, p. ej., el paciente tiene una enfermedad estable o una enfermedad progresiva. Un no respondedor puede identificarse, p. ej., utilizando los criterios de Cheson tal como se describe en esta memoria.

El término "recaída", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la reaparición de una enfermedad (p. ej., cáncer) después de un período inicial de respuesta (p. ej., respuesta completa o respuesta parcial). El período inicial de respuesta puede implicar que el nivel de células cancerosas caiga por debajo de un determinado umbral, p. ej., por debajo del 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%. La reaparición puede implicar que el nivel de células cancerosas se eleve por encima de un determinado umbral, p. ej., por encima del 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%. La recaída se puede identificar, p. ej., utilizando los criterios de Cheson tal como se describe en esta memoria. Por ejemplo, p. ej., en el contexto de B-ALL, la reaparición puede implicar, p. ej., una reaparición de blastos en la sangre, médula ósea (> 5%) o cualquier sitio extramedular, después de una respuesta completa. Una respuesta completa, en este contexto, puede implicar < 5% de blastos de BM. Más generalmente, en una realización, una respuesta (p. ej.,

respuesta completa o respuesta parcial) puede implicar la ausencia de MRD (enfermedad residual mínima) detectable. En una realización, el período inicial de respuesta dura al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días; al menos 1, 2, 3 o 4 semanas; al menos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o 12 meses; o al menos 1, 2, 3, 4 o 5 años.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un resto hidrocarbonado totalmente saturado, ramificado o no ramificado, que tiene hasta 6 átomos de carbono. A menos que se indique lo contrario, se refiere a restos hidrocarbonados que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, de 1 a 4 átomos de carbono o de 1 a 2 átomos de carbono. Ejemplos representativos de alquilo incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec.*-butilo, *iso*-butilo, *terc.*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *n*-hexilo y similares.

10 Tal como se utiliza en esta memoria, el término «alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>» se refiere a un resto hidrocarbonado insaturado, ramificado o no ramificado, que tiene de 2 a 6 átomos de carbono. A menos que se indique lo contrario, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> se refiere a restos que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, de 2 a 5 átomos de carbono o de 2 a 4 átomos de carbono. Ejemplos representativos de alqueno incluyen, pero no se limitan a, etenilo, *n*-propenilo, *iso*-propenilo, *n*-butenilo, *sec.*-butenilo, *iso*-butenilo, *terc.*-butenilo, *n*-pentenilo, isopentenilo, neopentenilo, *n*-hexenilo y similares.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un resto hidrocarbonado insaturado, ramificado o no ramificado, que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, que contiene al menos un triple enlace, y que está fijado al resto de la molécula por un solo enlace. El término "alquino C<sub>2-4</sub>" debe interpretarse en consecuencia. Ejemplos de alquino C<sub>2-6</sub> incluyen, pero no se limitan a, etinilo, prop-1-ino, but-1-ino, pent-1-ino y penta-1,4-dinilo y similares.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a alquil-O-, en donde alquilo se define arriba en esta memoria. Ejemplos representativos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi, *terc.*-butoxi, pentiloxi, hexiloxi, ciclopropiloxi, ciclohexiloxi y similares. Típicamente, los grupos alcoxi tienen aproximadamente 1 a 6 átomos de carbono, 1 a 4 átomos de carbono o 1 a 2 átomos de carbono.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "dialquilo C<sub>1-6</sub>amino" se refiere a un resto de la fórmula -N(R<sub>a</sub>)-R<sub>a</sub>, en que cada uno de los R<sub>a</sub> es un alquilo C<sub>1-6</sub> que puede ser el mismo o diferentes, como se define arriba.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a grupos hidrocarbonados monocíclicos saturados de 3-6 átomos de carbono. Al cicloalquilo también se le puede aludir como un anillo carbocíclico y viceversa, haciendo referencia, adicionalmente, al número de átomos de carbono presentes. A menos que se indique lo contrario, cicloalquilo se refiere a grupos hidrocarbonados cíclicos que tienen entre 3 y 6 átomos de carbono en el anillo o entre 3 y 4 átomos de carbono en el anillo. Grupos hidrocarbonados monocíclicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, "óxido de alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un resto hidrocarbonado ramificado o no ramificado que comprende un grupo epoxi y que tiene de 2 a 6 átomos de carbono. Ejemplos representativos incluyen óxido de etenilo, óxido de propilenilo, 1,2-óxido de butilenilo, 2,3-óxido de butilenilo, 3,4-óxido de butilenilo, óxido de pentilenilo, óxido de hexilenilo y similares.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión anillo "azacíclico" se refiere a un grupo hidrocarbonado monocíclico, saturado o insaturado, de 3-7 átomos de carbono tal como se define para "cicloalquilo", en donde un átomo de carbono se reemplaza por un átomo de nitrógeno. También se le puede aludir como "azacicloalquilo" o "aza-hidrocarburo". A menos que se indique lo contrario, azacicloalquilo se refiere a grupos aza-hidrocarburos cíclicos que tienen entre 2 y 6 átomos de carbono en el anillo y un átomo de nitrógeno, entre 2 y 4 átomos de carbono en el anillo y un átomo de nitrógeno, o entre 2 y 3 átomos de carbono en el anillo y un átomo de nitrógeno. Grupos azacíclicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a aziridinilo, azetidino, pirrolidinilo, piperidinilo, azepanilo, dihidroazepinilo y similares.

45 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "halógeno" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "sal" o "sales" se refieren a una sal por adición de ácidos o por adición de bases de un compuesto de la divulgación. "Sales" incluyen, en particular, "sales farmacéuticamente aceptables". La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los compuestos de esta divulgación y que típicamente no son biológicamente o de otro modo indeseables. En muchos casos, los compuestos de la presente divulgación son capaces de formar sales con ácidos y/o con bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

55 Intervalos: a lo largo de esta divulgación, se pueden presentar varios aspectos de la divulgación en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la divulgación. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha revelado específicamente todos los sub-intervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un

intervalo tal como de 1 a 6 tiene sub-intervalos específicamente descritos como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, p. ej., 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Como otro ejemplo, un intervalo tal como 95-99% de identidad, incluye algo con 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad, e incluye sub-intervalos tales como 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% y 98-99% de identidad. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

#### Descripción

En esta memoria se proporcionan composiciones de materia y métodos de uso para el tratamiento de una enfermedad tal como el cáncer (p. ej., cánceres hematológicos u otros tumores malignos de células B) utilizando células efectoras inmunitarias (p. ej., células T o células NK) que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) (p. ej., un CAR que fija como objetivo un marcador de células B tal como CD19). Los métodos incluyen, entre otros, administrar células efectoras inmunitarias (p. ej., células T o células NK) que expresan un CAR que fija como objetivo una célula B descrito en esta memoria en combinación con otro agente tal como un inhibidor de BTK, p. ej., un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I).

La presente divulgación proporciona, al menos en parte, experimentos que respaldan la alta eficacia de una combinación de una terapia con CAR (p. ej., una terapia con CAR que fija como objetivo células B) y un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I). La combinación de un inhibidor de BTK, tal como un compuesto de fórmula (I), con una terapia con CAR puede aumentar la eficacia de la terapia de combinación con relación a una monoterapia del inhibidor de BTK, o una dosis de células que expresan CAR, o ambas. Estos efectos beneficiosos pueden, p. ej., permitir una dosis más baja del inhibidor de BTK o las células que expresan CAR, o ambos, al tiempo que se mantiene la eficacia. Los resultados en esta memoria son aplicables a una amplia gama de cánceres, p. ej., cánceres hematológicos y otros tumores malignos de células B. Por ejemplo, la BTK está elevada en la mayoría de los linfomas. Una célula efectora inmunitaria (p. ej., células T o células NK) que expresa CAR19 fija como objetivo cánceres con la expresión en superficie de CD19, que se expresa en la mayoría de los tumores malignos de células B. Alternativamente o en combinación con CAR19, se puede utilizar cualquier otro CAR que fije como objetivo células B (p. ej., un CAR que fija como objetivo uno o más de: CD20, CD22 o ROR1) en las terapias de combinación descritas en esta memoria. Por lo tanto, la combinación de una terapia con CAR (p. ej., una o más de una terapia con CD19 CAR, CD20 CAR, CD22 CAR o ROR1 CAR) con un inhibidor de BTK (p. ej., un compuesto de fórmula (I)) es adecuada para tratar una amplia gama de cánceres que implican la proliferación excesiva de células B, incluyendo los linfomas (p. ej., linfoma de Hodgkin), MCL, CLL, DLBCL y mieloma múltiple.

De acuerdo con la presente divulgación, los inhibidores de BTK pueden reducir las masas tumorales y movilizar las células B neoplásicas en la sangre periférica (véase, p. ej., el Ejemplo 42 en esta memoria). Sin desear estar ligados por la teoría, determinados linfomas, tales como el MCL, se caracterizan por masas de células cancerosas en los centros de proliferación de los ganglios linfáticos. Las células efectoras inmunitarias que expresan CAR tienen a veces dificultades para penetrar en estas masas densamente empaquetadas. Por lo tanto, un inhibidor de BTK puede reducir las masas tumorales y movilizar las células B neoplásicas en la sangre periférica, haciendo que las células del linfoma sean más vulnerables a las células que expresan CAR.

Alternativamente o en combinación, los inhibidores de BTK, tales como los compuestos de fórmula (I), también pueden afectar a las células que expresan CAR. La presente invención demuestra que el tratamiento con ibrutinib (un inhibidor de BTK) aumenta el nivel de células CART19 circulantes (véanse, p. ej., los datos mostrados en el Ejemplo 42). Sin desear ligados por la teoría, el aumento en el nivel de células CART19 circulantes puede ser el resultado de, por ejemplo, una proliferación incrementada, una alteración del fenotipo de las células T u otros factores. Por ejemplo, ibrutinib puede inhibir ITK, una quinasa con homología con BTK. ITK se expresa en las células T, y su inhibición puede alterar el fenotipo de células T. El tratamiento con un inhibidor de BTK, tal como ibrutinib, puede alterar el fenotipo de las células T de un fenotipo Th2 a un fenotipo Th1 y, por lo tanto, aumentar la capacidad proliferativa de células T. El pretratamiento, o la co-administración a un sujeto, de un inhibidor de BTK puede aumentar la capacidad proliferativa de células T en el sujeto, aumentando así el nivel de células que expresan CAR circulantes. Además, un sujeto pretratado con un inhibidor de BTK puede tener una población de células T con una mayor capacidad proliferativa en su aféresis para la fabricación de CAR.

En un aspecto, la divulgación proporciona un cierto número de receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo manipulado para unirse de forma específica a un antígeno de células B (p. ej., seleccionado de una o más de la proteína CD19, CD20, CD22 o ROR1). En un aspecto, la divulgación proporciona una célula (p. ej., célula T) manipulada para expresar un CAR, en donde la célula T CAR ("CART") exhibe una propiedad anticancerígena. En un aspecto, una célula se transforma con el CAR y el CAR se expresa en la superficie de la célula. En algunos casos, la célula (p. ej., célula T) se transduce con un vector viral que codifica un CAR. En algunos casos, el vector viral es un vector retroviral. En algunos casos, el vector viral es un vector lentiviral. En algunos de estos casos, la célula puede expresar de forma estable el CAR. En otro caso, la célula (p. ej., célula T) se transfecta con un ácido nucleico, p. ej., ARNm, ADNc, ADN, que codifica un CAR. En algunos de estos casos, la célula puede expresar transitoriamente el CAR.

En un aspecto, la porción de unión a proteína anti- CD19 del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv. En un aspecto, fragmentos de anticuerpos de este tipo son funcionales, debido a que conservan la afinidad de unión equivalente, p. ej., se unen al mismo antígeno con una afinidad comparable a la del anticuerpo IgG del que se derivan. En un aspecto, fragmentos de anticuerpos de este tipo son funcionales, debido a que proporcionan una respuesta biológica que puede incluir, pero no se limita a la activación de una respuesta inmune, la inhibición del origen de la transducción de señales a partir de su antígeno diana, la inhibición de la actividad quinasas, y similares tal como entenderá un experto en la materia. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno anti-CD19 del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv que se humaniza en comparación con la secuencia murina del scFv del que se deriva. En un aspecto, la secuencia de scFv murina parental es la construcción CAR19 proporcionada en la publicación PCT WO2012/079000 y proporcionada en esta memoria como SEQ ID NO: 59. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv descrito en el documento WO2012/079000 y proporcionado en SEQ ID NO: 59.

En algunos aspectos, los anticuerpos de la divulgación se incorporan en un receptor de antígeno quimérico (CAR). En un aspecto, el CAR comprende la secuencia polipeptídica proporcionada como SEQ ID NO: 12 en la publicación PCT WO2012/079000, y proporcionada en esta memoria como SEQ ID NO: 58, en donde el dominio scFv está sustituido con una o más secuencias seleccionadas de SEQ ID NOS: 1-12. En un aspecto, los dominios scFv de SEQ ID NOS: 1-12 son variantes humanizadas del dominio scFv de SEQ ID NO: 59, que es un fragmento scFv de origen murino que se une específicamente a CD19 humano. La humanización de este scFv de ratón puede ser deseable para el entorno clínico, en que los residuos específicos para ratón pueden inducir una respuesta de antígeno anti-ratón humano (HAMA) en pacientes que reciben tratamiento con CART19, p. ej., tratamiento con células T transducidas con la construcción CAR19.

En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19, p. ej., scFv humanizado, porción de un CAR de la divulgación es codificado por un transgén cuya secuencia ha sido optimizada con codones para la expresión en una célula de mamífero. En un aspecto, la construcción CAR completa de la divulgación es codificada por un transgén, cuya secuencia completa ha sido optimizada con codones para la expresión en una célula de mamífero. La optimización con codones se refiere al descubrimiento de que la frecuencia de aparición de codones sinónimos (es decir, codones que codifican el mismo aminoácido) en el ADN codificante está sesgada en diferentes especies. Una degeneración de codones de este tipo permite que un polipéptido idéntico sea codificado por una diversidad de secuencias de nucleótidos. Se conoce en la técnica una diversidad de métodos de optimización de codones, e incluyen, p. ej., métodos descritos en al menos las Patentes de EE.UU. números 5.786.464 y 6.114.148.

En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 1. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 2. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 3. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 4. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 5. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 6. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 7. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 8. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 9. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 10. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 11. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en SEQ ID NO: 12.

En un aspecto, los CARs de la divulgación combinan un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo específico con una molécula de señalización intracelular. Por ejemplo, en algunos aspectos, la molécula de señalización intracelular incluye, pero no se limita a la cadena CD3-zeta, los módulos de señalización 4-1BB y CD28 y combinaciones de los mismos. En un aspecto, el CAR CD19 comprende un CAR seleccionado de la secuencia proporcionada en una o más de las SEQ ID NOS: 31 - 42. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 31. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 32. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 33. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 34. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 35. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 36. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 37. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 38. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 39. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 40. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 41. En un aspecto, el CAR CD19 comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 42.

Además, la presente invención proporciona composiciones de CAR CD19 y su uso en medicamentos o métodos para tratar, entre otras enfermedades, cáncer o cualquier tumor maligno o enfermedad autoinmunes que implican células o tejidos que expresan CD19.

En un aspecto, el CAR de la divulgación puede utilizarse para erradicar células normales que expresan CD19, por lo que es aplicable para su uso como terapia de acondicionamiento celular antes del trasplante de células. En un aspecto, la célula normal que expresa CD19 es una célula madre normal que expresa CD19 y el trasplante de células es un trasplante de células madre.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona una célula (p. ej., célula T) manipulada para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde la célula que expresa CAR, p. ej., célula T CAR ("CART"), exhibe una propiedad anticancerígena. Un antígeno preferido es CD19. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno del CAR comprende un fragmento de anticuerpo anti-CD19 parcialmente humanizado. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno del  
10 CAR comprende un fragmento de anticuerpo anti-CD19 parcialmente humanizado que comprende un scFv. Por consiguiente, la divulgación proporciona un CD19- CAR que comprende un dominio de unión anti-CD19 humanizado y está manipulado en una célula efectora inmunitaria, p. ej., una célula T o una célula NK, y métodos para su uso para terapia adoptiva.

15 En un aspecto, el CD19- CAR comprende al menos un dominio intracelular seleccionado del grupo de un dominio de señalización de CD137 (4-1BB), un dominio de señalización de CD28, un dominio de señal de CD3zeta y cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el CD19-CAR comprende al menos un dominio de señalización intracelular que proviene de una o más moléculas co-estimuladoras distintas de CD137 (4-1BB) o CD28.

## 20 Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)

La presente divulgación abarca una construcción de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican un CAR, en donde el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de células B (p. ej., CD19, p. ej., CD19 humano), en donde la secuencia del fragmento de anticuerpo es contiguo y  
25 está en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimulador y/o un dominio de señalización primario, p. ej., una cadena zeta. El dominio de señalización coestimulador se refiere a una porción del CAR que comprende al menos una porción del dominio intracelular de una molécula coestimuladora. En un caso, el dominio de unión al antígeno es un anticuerpo murino o un fragmento de anticuerpo descrito en esta  
30 memoria. En un caso, el dominio de unión al antígeno es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado.

En aspectos específicos, una construcción CAR de la divulgación comprende un dominio scFv seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-12 o un dominio scFV de SEQ ID NO: 59, en donde el scFv puede estar precedido por una secuencia conductora opcional, tal como se proporciona en SEQ ID NO: 13, y seguida de una secuencia de bisagra opcional tal como se proporciona en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49, una región de transmembrana tal como se proporciona en SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y una secuencia CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, en donde los dominios son contiguos a y en el mismo marco de lectura para formar una única proteína de fusión. También se incluye en la divulgación una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cada uno de los fragmentos scFv seleccionados del grupo que consiste en. SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:59 También se incluye en la divulgación una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cada uno de los fragmentos scFv seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:59, y cada uno de los dominios de SEQ ID NOS: 13-17, más la proteína de fusión CD19CAR codificada de la divulgación. En un aspecto, construcciones de CD19CAR ejemplares comprenden una secuencia conductora opcional, un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio de transmembrana y un dominio estimulante intracelular. En un aspecto, una construcción CD19CAR ejemplar comprende una secuencia conductora opcional, un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio de transmembrana, un dominio coestimulante intracelular y un dominio estimulante intracelular. Construcciones CD19 CAR específicas que contienen dominios scFv humanizados de la divulgación se proporcionan como SEQ ID NOS: 31-42, o un dominio scFv murino tal como se proporciona como SEQ ID NO: 59.

55 Secuencias CAR de longitud completa también se proporcionan en esta memoria como SEQ ID NOS: 31-42 y 58 tal como se muestra en la Tabla 7 y la Tabla 3.

Se proporciona una secuencia conductora ejemplar como SEQ ID NO: 13. Se proporciona una secuencia de bisagra/espaciador ejemplar como SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:47 o SEQ ID NO:49. Se proporciona una secuencia de transmembrana ejemplar como SEQ ID NO: 15. Se proporciona una secuencia ejemplar del dominio de señalización intracelular de la proteína 4-1BB como SEQ ID NO: 16. Se proporciona una secuencia ejemplar del dominio de señalización intracelular de CD27 como SEQ ID NO: 51. Se proporciona una secuencia de dominio de CD3zeta ejemplar como SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO:43.

En un aspecto, la presente divulgación abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión anti-CD19, p. ej., descrito en esta memoria, que es contiguo con y en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular.

5 En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 se selecciona de una o más de las SEQ ID NOS: 1-12 y 58. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la secuencia proporcionada en una o más de SEQ ID NOS: 61-72 y 59. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 61. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 62. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 63. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 64. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 65. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 66. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 67. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 68. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 69. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 70. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 71. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de SEQ ID NO: 72.

En un aspecto, la presente divulgación abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende un transgén que codifica un CAR, en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión anti-CD19, seleccionado de una o más de las SEQ ID NOS: 61-72, en donde la secuencia es contigua y está en el mismo marco de lectura que la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular ejemplar que puede utilizarse en el CAR incluye, pero no se limita a uno o más dominios de señalización intracelular de, p. ej., CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR de la divulgación se selecciona de uno o más de SEQ ID NOS: 85-96. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:85. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:86. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:87. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:88. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:89. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:90. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:91. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:92. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:93. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:94. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:95. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:96. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:97. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:98. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es SEQ ID NO:99.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, rastreando colecciones de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o aislando directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándares. Alternativamente, el ácido nucleico de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

La presente divulgación incluye construcciones de vectores retrovirales y lentivirales que expresan un CAR que puede transducirse directamente en una célula.

La presente divulgación también incluye una construcción de ARN que se puede transfectar directamente en una célula. Un método para generar ARNm para uso en la transfección implica la transcripción in vitro (IVT) de un molde con cebadores especialmente diseñados, seguida de la adición de poliA, para producir una construcción que contiene secuencias 3' y 5' no traducidas ("UTR"), un casquete 5' y/o un Sitio de Entrada al Ribosoma Interno (IRES), el ácido nucleico que se ha de expresar y una cola de poliA, típicamente de 50-2000 bases de longitud (SEQ ID NO: 131). El ARN así producido puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En un caso, el molde incluye secuencias para el CAR. En un caso, un vector ARN CAR se transduce en una célula T mediante electroporación.

#### Dominio de unión a antígeno

En un aspecto, el CAR de la divulgación comprende un elemento de unión específico para la diana, al que se alude de otro modo como dominio de unión a antígeno. La elección del resto depende del tipo y número de ligandos que

definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión al antígeno puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como marcador de la superficie de la célula en células diana asociadas con un estado patológico particular. Por lo tanto, ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión al antígeno en un CAR de la divulgación incluyen los asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunes y células cancerosas.

En un aspecto, la respuesta de células T mediada por CAR puede dirigirse a un antígeno de interés mediante la manipulación de un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno deseado en el CAR.

En un aspecto, la porción del CAR que comprende el dominio de unión a antígeno comprende un dominio de unión a antígeno que fija como objetivo CD19. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno fija como objetivo CD19 humano. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno del CAR tiene la misma o similar especificidad de unión que el fragmento scFv de FMC63 descrito en Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157- 1165 (1997). En una realización, el dominio de unión a antígeno del CAR incluye el fragmento scFv descrito en Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157- 1165 (1997).

El dominio de unión a antígeno puede ser cualquier dominio que se una al antígeno, incluyendo, pero no limitado a un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo murino, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento funcional del mismo, incluyendo, pero no limitado a un anticuerpo de un solo dominio, tales como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un nanocuerpo derivado del dominio variable (VHH) de camélido, y a un armazón alternativo conocido en la técnica para funcionar como dominio de unión a antígeno, tal como un dominio de fibronectina recombinante, y similares.

En una realización, la molécula de CAR comprende un dominio de unión anti-CD19 que comprende una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, y una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, p. ej., un dominio de unión anti-CD19 que comprende una o más, p. ej., las tres LC CDRs y una o más, p. ej., las tres HC CDRs. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 comprende una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la la cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, p. ej., el dominio de unión anti-CD19 tiene dos regiones de cadena pesada variable, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en esta memoria. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 comprende una región variable de cadena ligera murina descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 7) y/o una región variable de cadena pesada murina descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 7). En una realización, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv que comprende una cadena ligera murina y una cadena pesada murina de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 7. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 (p. ej., un scFv) comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada en la Tabla 7, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 7; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada proporcionada en la Tabla 7, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 7. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 59 o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 7, está unida a una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 7, a través de un enlazador, p. ej., un enlazador descrito en esta memoria. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 incluye un enlazador (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un scFv pueden estar, p. ej., en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de la cadena ligera-enlazador-región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena pesada-enlazador-región variable de la cadena ligera.

En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a antígeno se derive de la misma especie en la que se utilizará finalmente el CAR. Por ejemplo, para uso en seres humanos, puede ser beneficioso que el dominio de unión a antígeno del CAR comprenda residuos humanos o humanizados para el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Por lo tanto, en un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 2 (LC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 murino o humanizado descrito en esta memoria, y/o una o más (p. ej., las tres) región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 murino o humanizado descrito en esta memoria, p. ej., un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende una o más, p. ej., las tres LC CDRs y una o más, p. ej., las tres HC CDRs. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una o más (p. ej., las tres) regiones determinantes de la complementariedad en la cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante de la complementariedad en la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 murino o humanizado descrito en esta memoria, p. ej., el dominio de unión anti-CD19 humanizado tiene dos regiones de cadena pesada variable, cada una de las cuales comprende una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en esta memoria. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una región variable de la cadena ligera descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 3) y/o una región variable de la cadena pesada humanizada descrita en esta memoria (p. ej., en la Tabla 3). En una realización, el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 (p. ej., un scFv) comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3; y/o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (p. ej., sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (p. ej., sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:12, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71 y SEQ ID NO:72, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 3, está unida a una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria, p. ej., en la Tabla 3, a través de un enlazador, p. ej., un enlazador descrito en esta memoria. En una realización, el dominio de unión anti-CD19 humanizado incluye un enlazador (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferiblemente 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada de un scFv pueden estar, p. ej., en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de la cadena ligera-enlazador-región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena pesada-enlazador-región variable de la cadena ligera.

En un aspecto, la porción del dominio de unión a antígeno comprende una o más secuencias seleccionadas de SEQ ID NOS: 1-12. En un aspecto, el CAR humanizado se selecciona de una o más secuencias seleccionadas de SEQ ID NOS: 31-42. En algunos aspectos, se humaniza un anticuerpo no humano, en que las secuencias o regiones específicas del anticuerpo se modifican para aumentar la similitud con un anticuerpo o un fragmento del mismo producido de forma natural en un ser humano.

Se puede producir un anticuerpo humanizado utilizando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a injerto de CDR (véase, p. ej., la Patente Europea N° EP 239.400; la Publicación Internacional N° WO 91/09967; y las Pat. de EE.UU. N°s 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089, revestimiento o rejuvenecimiento (véanse, p. ej., las Patentes Europeas N°s EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28 (4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; y Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973, transposición de la cadena (véase, p. ej., la Pat. de EE.UU. N° 5.565.332), y técnicas descritas en, p. ej., la publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. N° US2005/0042664, la Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. N° US2005/0048617, la Pat. de EE.UU. N° 6.407.213, la Pat. de EE.UU. N° 5.766.886, la Publicación Internacional N° WO 9317105, Tan et al., *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.*, 55 (23 Sup):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.*, 55(8):1717-22 (1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994) y Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994). A menudo, los residuos de marco en las regiones de marco serán sustituidos por el residuo

correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, por ejemplo, mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., modelando las interacciones de la CDR y los residuos de estructura para identificar residuos de marco importantes para la unión de antígenos y comparación de secuencias para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, p. ej., Queen et al., Pat. de EE.UU. N° 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, Nature, 332: 323).

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos que permanecen en él de una fuente que no es humana. A estos residuos de aminoácidos no humanos se les alude a menudo como residuos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". Como se proporciona en esta memoria, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo humanizados comprenden una o más CDRs de moléculas de inmunoglobulina no humanas y regiones marco en donde los residuos de aminoácidos que comprenden el marco se derivan completa o principalmente de la línea germinal humana. Múltiples técnicas para la humanización de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos son bien conocidas en la técnica y se pueden realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al. al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDRs o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano, es decir, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT N° WO 91/09967; y Pat. de EE.UU. N°s 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640). En anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanizados de este tipo, sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados son, a menudo, anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos de marco (FR) están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La humanización de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también se puede lograr mediante recubrimiento o rejuvenecimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); y Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) o transposición de la cadena (Pat. de EE.UU. N° 5.565.332).

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, a utilizar en la preparación de anticuerpos humanizados es reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se rastrea frente a la colección completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana más cercana a la del roedor se acepta entonces como el marco (FR) humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987). Otro método utiliza un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (véase, p. ej., Nicholson et al., Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993). En algunas realizaciones, la región marco, p. ej., las cuatro regiones marco, de la región variable de la cadena pesada se derivan de una secuencia de línea germinal VH4\_4-59. En una realización, la región marco puede comprender uno, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones, p. ej., sustituciones, p. ej., a partir del aminoácido en la correspondiente secuencia murina (p. ej., de SEQ ID NO: 59). En una realización, la región marco, p. ej., las cuatro regiones marco de la región variable de la cadena ligera se derivan de una secuencia de línea germinal VK3\_1. 25. En una realización, la región marco puede comprender uno, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones, p. ej., sustituciones, p. ej., a partir del aminoácido en la correspondiente secuencia murina (p. ej., de SEQ ID NO: 59).

En algunos aspectos, la parte de una composición de CAR de la divulgación que comprende un fragmento de anticuerpo se humaniza con retención de alta afinidad por el antígeno diana y otras propiedades biológicas favorables. De acuerdo con un aspecto de la divulgación, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estos permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, p. ej., el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al antígeno diana. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir del receptor y las secuencias de importación de modo que se logre la característica del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo deseado, tal como una afinidad incrementada por el antígeno diana. En general, los residuos de CDR están directa y más sustancialmente implicados en influir en la unión del antígeno.

Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo humanizado puede conservar una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original, p. ej., en la presente divulgación, la capacidad de unirse a CD19 humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado puede tener una afinidad y/o especificidad mejorada de la unión a CD19 humano.

En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 se caracteriza por características o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, en un aspecto, la porción de una composición de CAR de la invención que comprende un dominio de unión a antígeno se une específicamente a CD19 humano. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno tiene la misma o similar especificidad de unión a CD19 humano que el scFv de FMC63 descrito en Nicholson et al. *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157- 1165 (1997). En un aspecto, la invención se refiere a un dominio de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en donde el dominio de unión al anticuerpo se une específicamente a una proteína CD19 o fragmento de la misma, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1-12 o SEQ ID NO: 59. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácido de un scFv seleccionado de SEQ ID NOs: 1-12 o SEQ ID NO: 59. En determinados aspectos, el scFv es contiguo y está en el mismo marco de lectura que una secuencia conductora. En un aspecto, la secuencia conductora es la secuencia polipeptídica proporcionada como SEQ ID NO: 13.

En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es un fragmento, p. ej., un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es un Fv, un Fab, un (Fab')<sub>2</sub>, o un anticuerpo híbrido bi-funcional (p. ej. bi-específico) (p. ej., Lanzavecchia et al., *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la divulgación se unen a una proteína CD19 con afinidad de tipo salvaje o potenciada.

En algunos casos, los scFvs pueden prepararse de acuerdo con un método conocido en la técnica (véase, p. ej., Bird et al., (1988) *Science* 242: 423-426 y Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879- 5883). Moléculas de ScFv se pueden producir enlazando las regiones VH y VL juntas utilizando enlazadores polipeptídicos flexibles. Las moléculas de scFv comprenden un enlazador (p. ej., un enlazador Ser-Gly) con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizadas. La longitud del enlazador puede afectar en gran medida cómo las regiones variables de un scFv se pliegan e interactúan. De hecho, si se emplea un enlazador polipeptídico corto (p. ej., entre 5-10 aminoácidos), se evita el plegamiento intracadena. También se requiere el plegamiento entre cadenas para reunir las dos regiones variables para formar un sitio de unión de epítipo funcional. Para ejemplos de orientación y tamaño del enlazador, véase, p. ej., Hollinger et al. 1993 *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448, Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, y Publicaciones PCT N°s WO2006/020258 y WO2007/024715.

Un scFv puede comprender un enlazador de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos de aminoácidos entre sus regiones VL y VH. La secuencia del enlazador puede comprender cualquier aminoácido que se produzca de forma natural. En algunas realizaciones, la secuencia del enlazador comprende los aminoácidos glicina y serina. En otra realización, la secuencia del enlazador comprende conjuntos de repeticiones de glicina y serina, tales como (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>, en donde n es un número entero positivo igual a o mayor que 1 (SEQ ID NO:18). En una realización, el enlazador puede ser (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:106) o (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:107). La variación en la longitud del enlazador puede conservar o potenciar la actividad, dando lugar a una eficacia superior en los estudios de actividad.

En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al antígeno (u otras porciones o el CAR completo) puede modificarse, p. ej., una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria puede modificarse, p. ej., mediante una sustitución conservadora. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales de carácter básico (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

El porcentaje de identidad en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas se refiere a dos o más secuencias que son iguales. Dos secuencias son «sustancialmente idénticas» si dos secuencias tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (p. ej., 60% de identidad, opcionalmente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad a lo largo de una región específica o, cuando no se especifica, a lo largo de toda la secuencia), cuando se compara y alinea para obtener la máxima correspondencia en una ventana de comparación, o región designada como medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe a lo largo de una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente a lo largo de una región que tiene 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden utilizar parámetros de

programa por defecto o se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; y Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en [www.gcg.com](http://www.gcg.com)), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En un aspecto, la presente invención contempla modificaciones de la secuencia de aminoácidos del fragmento o del anticuerpo de partida (p. ej., scFv) que generan moléculas funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, el VH o VL de un dominio de unión anti-CD19, p. ej., scFv, comprendido en el CAR puede modificarse para conservar al menos aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de la región marco VH o VL de partida del dominio de unión anti-CD19, p. ej., scFv. La presente invención contempla modificaciones de la construcción CAR completa, p. ej., modificaciones en una o más secuencias de aminoácidos de los diversos dominios de la construcción CAR con el fin de generar moléculas funcionalmente equivalentes. La construcción CAR se puede modificar para conservar al menos aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de la construcción CAR de partida.

*CAR biespecíficos*

En una realización una molécula de anticuerpo multiespecífico es una molécula de anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene especificidad por no más de dos antígenos. Una molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, el primer y segundo epítipos están en el mismo antígeno, p. ej., la misma proteína (o subunidad de una proteína multimérica). En una realización, el primer y segundo epítipos se solapan. En una realización, el primer y segundo epítipos no se solapan. En una realización, el primer y segundo epítipos se encuentran en diferentes antígenos, p. ej., diferentes proteínas (o diferentes subunidades de una proteína multimérica). En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un primer epítipo y una secuencia de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tienen especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un medio anticuerpo que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y un medio anticuerpo que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un medio anticuerpo, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y un medio anticuerpo, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo. En una realización, una molécula de anticuerpo biespecífico comprende un scFv, o un fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un primer epítipo y un scFv, o fragmento del mismo, que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo.

En determinadas realizaciones, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo multiespecífico (p. ej., uno biespecífico o uno triespecífico). Los protocolos para generar moléculas de anticuerpos biespecíficos o heterodiméricos, y diversas configuraciones para moléculas de anticuerpos biespecíficos, se describen, p. ej., en los párrafos 455-458 del documento WO2015/142675, presentado el 13 de marzo de 2015.

En un aspecto, la molécula de anticuerpo biespecífico se caracteriza por una primera secuencia de dominio variable de inmunoglobulina, p. ej., un scFv, que tiene especificidad de unión para CD19, p. ej., comprende un scFv como se

describe en esta memoria, o comprende las CDRs de cadena ligera y/o de cadena pesada de un scFv descrito en esta memoria y una segunda secuencia de dominio variable de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un segundo epítipo en un antígeno diferente.

#### *TCR quimérico*

5 En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación (p. ej., anticuerpos y fragmentos de CD19) pueden injertarse en uno o más dominios constantes de una cadena de receptor de células T ("TCR"), p. ej., una cadena alfa del TCR o beta del TCR, para crear un TCR quimérico. Sin desear estar ligados por la teoría, se cree que los TCRs quiméricos señalarán a través del complejo TCR tras la unión del antígeno. Por ejemplo, un scFv tal como se describe en esta memoria, puede injertarse en el dominio constante, p. ej., al menos una porción del dominio constante extracelular, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático, de una cadena del TCR, p. ej., la cadena alfa del TCR y/o la cadena beta del TCR. Como otro ejemplo, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un dominio VL tal como se describe en esta memoria, puede injertarse al dominio constante de una cadena alfa del TCR, y un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un dominio VH tal como se describe en esta memoria, puede injertarse al dominio constante de una cadena de beta del TCR (o alternativamente, un dominio VL puede injertarse en el dominio constante de la cadena beta del TCR y un dominio VH puede injertarse en una cadena alfa del TCR). Como otro ejemplo, las CDRs de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden injertarse en una cadena alfa y/o beta del TCR para crear un TCR quimérico. Por ejemplo, los LCDRs descritos en esta memoria pueden injertarse en el dominio variable de una cadena alfa del TCR y los HCDRs descritos en esta memoria pueden injertarse en el dominio variable de una cadena beta del TCR, o viceversa. TCRs quiméricos de este tipo pueden producirse, p. ej., mediante métodos conocidos en la técnica (Por ejemplo, Willemsen RA et al, Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al, Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al, Gene Ther. abril 2012;19(4):365-74).

#### *Amazonas No-Anticuerpos*

25 En realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un almacén que no es de anticuerpo, p. ej., una fibronectina, anquirina, anticuerpo dominio, lipocalina, inmuno-fármaco modular pequeño, maxicuerpo, Proteína A o filina. El almacén que no es de anticuerpo tiene la capacidad de unirse al antígeno diana en una célula. En realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un polipéptido o fragmento del mismo de una proteína que se produce de forma natural expresada en una célula. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un almacén que no es de anticuerpo. Puede emplearse una amplia diversidad de almacenes que no son de anticuerpos siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente al antígeno diana en una célula diana.

35 Almacenes que no son de anticuerpo incluyen: fibronectina (Novartis, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos dominio (Domantis, Ltd., Cambridge, MA y Ablynx nv, Zwijnaarde, Bélgica), lipocalina (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), agentes inmuno-farmacéuticos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc., Mountain View, CA), Proteína A (Affibody AG, Suecia) y afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

40 En una realización, el dominio de unión a antígeno comprende el dominio extracelular, o un fragmento de unión a contraligando del mismo, de la molécula que se une a un contraligando en la superficie de una célula diana.

#### Dominio transmembrana

45 Con respecto al dominio transmembrana, en diversas realizaciones se puede diseñar un CAR para que comprenda un dominio transmembrana que está fijado al dominio extracelular del CAR. Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales adyacentes a la región transmembrana, p. ej., uno o más aminoácidos asociados con la región extracelular de la proteína de la que se deriva la transmembrana (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la que se deriva la proteína transmembrana (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). En un aspecto, el dominio transmembrana es uno que está asociado con uno de los otros dominios del CAR, p. ej., en una realización, el dominio transmembrana puede ser de la misma proteína de la que se deriva el dominio de señalización, el dominio coestimulador o el dominio bisagra. En otro aspecto, el dominio transmembrana no se deriva de la misma proteína de la que se deriva cualquier otro dominio del CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dominios de este tipo a los dominios transmembrana de las mismas proteínas de membrana de superficie o diferentes, p. ej., para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de homodimerización con otro CAR en la superficie celular de una célula que expresa CAR. En un aspecto diferente, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana puede modificarse o sustituirse con el fin de minimizar las interacciones con los dominios del participante en la unión nativo presente en la misma célula que expresa el CAR.

El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o recombinante. En los casos en los que la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. En un aspecto,

el dominio transmembrana es capaz de señalar al dominio o dominios intracelulares siempre que el CAR se haya unido a una diana. Un dominio transmembrana de uso particular en esta divulgación puede incluir al menos la región o regiones transmembrana de, p. ej., la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. En algunas realizaciones, un dominio transmembrana puede incluir al menos la región o regiones transmembrana de, p. ej., KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R  $\alpha$ , ITGA1, 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, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C, o CD19.

En algunos casos, el dominio transmembrana puede unirse a la región extracelular del CAR, p. ej., el dominio de unión al antígeno del CAR, a través de una bisagra, p. ej., una bisagra de una proteína humana. Por ejemplo, en una realización, la bisagra puede ser una bisagra de Ig (inmunoglobulina) humana, p. ej., una bisagra de IgG4, una bisagra de IgD, un enlazador GS (p. ej., un enlazador GS descrito en esta memoria), una bisagra KIR2DS2 o una bisagra CD8a. En una realización, la bisagra o el espaciador comprende (p. ej., consiste en) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En un aspecto, el dominio transmembrana comprende (p. ej., consiste en) un dominio transmembrana de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra IgG4. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácido ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK M (SEQ ID NO:45). En algunas realizaciones, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGC  
 GTGTTCCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACC  
 TGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC  
 GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGT  
 GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGG  
 TGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCT  
 CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTC  
 CCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG  
 GCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC  
 TGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCC  
 GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAA  
 GATG (SEQ ID NO:46).

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra IgD. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácido RWPEPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEEKEEKEEERETKTPECPSTQPLGVYLLT PAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCT LNHPPLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPP QPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSVDH (SEQ ID NO:47). En algunas realizaciones, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

AGGTGGCCCGAAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCCTACTGCACAGCCCCAGGCAGA  
 AGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGG  
 AGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTG  
 AATGTCCATCCCATAACCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTG  
 GCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCATTT  
 GACTTGGGAGGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCC  
 ATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCG  
 GGACCTCTGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG  
 AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCC  
 AGAGGCCGCCAGCTGGCTTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCAT  
 GTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCC  
 AGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCC  
 AGCCAGCCACATACCTGTGTTGTGCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTA  
 GGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT (SEQ ID NO:48).

5 En un aspecto, el dominio transmembrana puede ser recombinante, en cuyo caso comprenderá predominantemente residuos hidrófobos, tales como leucina y valina. En un aspecto, se puede encontrar un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada uno de los extremos de un dominio transmembrana recombinante

10 Opcionalmente, un enlazador oligo- o poli-péptido corto, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y la región citoplasmática del CAR. Un doblete de glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:49). En algunas realizaciones, el enlazador es codificado por una secuencia de nucleótidos de GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO:50).

En un aspecto, la bisagra o el espaciador comprende una bisagra KIR2DS2.

15 Dominio citoplasmático

El dominio o la región citoplasmática del CAR incluye un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular es generalmente responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha introducido el CAR.

20 Ejemplos de dominios de señalización intracelular para su uso en el CAR de la divulgación incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T (TCR) y co-receptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después de la participación del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia recombinante que tenga la misma capacidad funcional.

25 Es conocido que las señales generadas a través del TCR solo son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria y/o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de células T está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmáticas: las que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través de los TCR (dominios de señalización primarios intracelulares) y los que actúan de una manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (dominio citoplasmático secundario, p. ej., un dominio coestimulador).

30 Un dominio de señalización primario regula la activación primaria del complejo TCR ya sea de una manera estimuladora o de una manera inhibitora. Los dominios de señalización intracelular primarios que actúan de una manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina o ITAM.

35 Ejemplos de ITAM que contienen dominios de señalización intracelular primarios, que son de uso particular en la divulgación, incluyen los de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (también conocido como " ICOS"), FcεRI, DAP10, DAP12 y CD66d. En una realización, un

CAR de la divulgación comprende un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización primario de CD3-zeta.

5 En una realización, un dominio de señalización primario comprende un dominio ITAM modificado, p. ej., un dominio ITAM mutado, que tiene actividad alterada (p. ej., incrementada o disminuida) en comparación con el dominio ITAM nativo. En una realización, un dominio de señalización primario comprende un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM modificado, p. ej., un dominio de señalización intracelular primario que contiene ITAM optimizado y/o truncado. En una realización, un dominio de señalización primario comprende uno, dos, tres, cuatro o más motivos ITAM.

10 Ejemplos adicionales de moléculas que contienen un dominio de señalización intracelular primario que son de uso particular en la divulgación incluyen las de DAP10, DAP12 y CD32.

*Dominio de Señalización Coestimulador*

15 El dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o puede combinarse con cualquier otro dominio o dominios de señalización intracelulares deseados útiles en el contexto de un CAR de la divulgación. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender una porción de la cadena zeta de CD3 y un dominio de señalización coestimulador. El dominio de señalización coestimulador se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. En una realización, el dominio intracelular está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio intracelular está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de ICOS.

25 Una molécula coestimuladora puede ser una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficaz de los linfocitos a un antígeno. Ejemplos de moléculas de este tipo incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares. Por ejemplo, se ha demostrado que la coestimulación de CD27 potencia la expansión, la función efectora y la supervivencia de células CART humanas in vitro y aumenta la persistencia de las células T humanas y la actividad antitumoral in vivo (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706). Ejemplos adicionales de moléculas coestimuladoras de este tipo incluyen CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Táctil), NKG2D, 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, y CD19a.

40 Las secuencias de señalización intracelular dentro de la porción citoplasmática del CAR de la divulgación pueden enlazarse entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un enlazador oligo- o polipéptido corto, p. ej., entre 2 y 10 aminoácidos (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos) de longitud puede formar el enlace entre secuencia de señalización intracelular. En una realización, se puede utilizar un doblete de glicina-serina como enlazador adecuado. En una realización, se puede utilizar un solo aminoácido, p. ej., una alanina, una glicina, como enlazador adecuado.

45 En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para que comprenda dos o más, p. ej., 2, 3, 4, 5 o más dominios de señalización coestimuladores. En una realización, los dos o más, p. ej., 2, 3, 4, 5 o más dominios de señalización coestimuladores están separados por una molécula de enlazador, p. ej., una molécula de enlazador descrita en esta memoria. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende dos dominios intracelulares coestimuladores. En algunas realizaciones, la molécula de enlazador es un residuo de glicina. En algunas realizaciones, el enlazador es un residuo de alanina.

50 En un aspecto, el dominio intracelular está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio intracelular está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En un aspecto, el dominio de señalización de 4-1BB es un dominio de señalización de SEQ ID NO: 16. En un aspecto, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización de SEQ ID NO: 17.

55 En un aspecto, el dominio intracelular está diseñado para que comprenda el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 comprende una secuencia de aminoácidos de QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO:51). En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos de

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGG  
 GCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC  
 (SEQ ID NO:52).

**Estrategias para Regular los Receptores de Antígenos Quiméricos** En algunas realizaciones, es deseable un CAR regulable (RCAR) en el que se pueda controlar la actividad de CAR para optimizar la seguridad y eficacia de una terapia con CAR. Existen muchas formas de regular las actividades de CAR. Por ejemplo, la apoptosis inducible utilizando, p. ej., una caspasa condensada a un dominio de dimerización (véase, p. ej., Di Stasa et al., N Engl. J. Med. 3 de noviembre de 2011; 365(18):1673-1683), se puede utilizar como un interruptor de seguridad en la terapia con CAR de la presente divulgación. En un caso, las células (p. ej., células T o células NK) que expresan un CAR de la presente divulgación comprenden, además, un interruptor de apoptosis inducible, en el que una caspasa humana (p. ej., caspasa 9) o una versión modificada se fusiona con una modificación de la proteína FKB humana que permite la dimerización condicional. En presencia de una molécula pequeña, tal como un rapálogo (p. ej., AP 1903, AP20187), la caspasa inducible (p. ej., caspasa 9) se activa y conduce a la rápida apoptosis y muerte de las células (p. ej., células T o células NK) que expresan un CAR de la presente divulgación. Se han descrito ejemplos de un conmutador de la apoptosis inducible basado en caspasa (o uno o más aspectos de dicho conmutador) en, p. ej., los documentos US2004040047; US20110286980; US20140255360; WO1997031899; WO2014151960; WO2014164348; WO2014197638; WO2014197638.

En otro ejemplo, las células que expresan CAR también pueden expresar una molécula de Caspasa-9 inducible (iCaspasa-9) que, tras la administración de un fármaco dimerizador (p. ej., rimiducid (también denominado AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) o AP20187 (Ariad)) conduce a la activación de la Caspasa-9 y a la apoptosis de las células. La molécula de iCaspasa-9 contiene un dominio de unión al inductor químico de dimerización (CID) que media en la dimerización en presencia de un CID. Esto da como resultado el agotamiento inducible y selectivo de las células que expresan CAR. En algunos casos, la molécula de iCaspasa-9 es codificada por una molécula de ácido nucleico separada del o de los vectores que codifican CAR. En algunos casos, la molécula de iCaspasa-9 es codificada por la misma molécula de ácido nucleico que la molécula que el vector que codifica CAR. La iCaspasa-9 puede proporcionar un conmutador de seguridad para evitar cualquier toxicidad de células que expresan CAR. Véase, p. ej., Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. N° NCT02107963; y Di Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673- 83.

Estrategias alternativas para regular la terapia con CAR de la presente divulgación incluyen utilizar moléculas pequeñas o anticuerpos que desactivan o desconectan la actividad de CAR, p. ej., eliminando células que expresan CAR, p. ej., induciendo citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en esta memoria también pueden expresar un antígeno que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, p. ej., ADCC o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en esta memoria también pueden expresar un receptor capaz de ser fijado como objetivo por un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Ejemplos de receptores de este tipo incluyen EpCAM, VEGFR, integrinas (p. ej., integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha4$ ,  $\alpha4\beta3$ ,  $\alpha4\beta7$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\gamma$ ), miembros de la superfamilia de receptores TNF (p. ej., TRAIL-R1, TRAIL-R2), receptor de PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, receptor de GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, IL-6 , , 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD1 1, CD1 1 a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/IgE Receptor , CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7, y EGFR, y versiones truncadas de los mismos (p. ej., versiones que conservan uno o más epítopos extracelulares pero que carecen de una o más regiones dentro del dominio citoplasmático).

Por ejemplo, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria también puede expresar un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFR) que carece de capacidad de señalización, pero conserva el epítipo que es reconocido por moléculas capaces de inducir ADCC, p. ej., cetuximab (ERBITUX®), de manera que la administración de cetuximab induce la ADCC y el posterior agotamiento de las células que expresan CAR (véase, p. ej., el documento WO2011/056894 y Jonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860). Otra estrategia incluye expresar un gen marcador/suicida altamente compacto que combina epítopos diana de antígenos tanto CD32 como CD20 en las células que expresan CAR descritas en esta memoria, que se une a rituximab, lo que da como resultado un agotamiento selectivo de las células que expresan CAR, p. ej., por ADCC (véase, p. ej., Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287). Otros métodos para agotar las células que expresan CAR descritos en esta memoria incluyen la administración de CAMPATH, un anticuerpo anti-CD52 monoclonal que se une selectivamente y fija como objetivo linfocitos maduros, p. ej., células que expresan CAR, para su destrucción, p. ej., induciendo ADCC. En otros casos, la célula que expresa CAR puede ser fijada selectivamente como objetivo utilizando un ligando de CAR, p. ej., un anticuerpo antiidiotípico. En algunos casos, el anticuerpo anti-idiotípico puede provocar actividad de células efectoras, p. ej., actividades de ADCC o ADC, reduciendo con ello el número de células que expresan CAR. En otros casos, el ligando de CAR, p. ej., el anticuerpo anti-idiotípico, puede acoplarse a un agente que induce la muerte celular, p. ej., una toxina, reduciendo con ello el número de células que expresan CAR. Alternativamente, las propias moléculas de

CAR pueden configurarse de manera que la actividad pueda regularse, p. ej., conectarse y desconectarse tal como se describe más adelante.

En otros casos, una célula que expresan CAR descrita en esta memoria también puede expresar una proteína diana reconocida por el agente de agotamiento de células T. En un caso, la proteína diana es CD20 y el agente de agotamiento de células T es un anticuerpo anti-CD20, p. ej., rituximab. En tales casos, el agente de agotamiento de células T se administra una vez que es deseable reducir o eliminar la célula que expresa CAR, p. ej., para mitigar la toxicidad inducida por CAR. En otros casos, el agente de agotamiento de células T es un anticuerpo anti-CD52, p. ej., alemtuzumab.

En un aspecto, un RCAR comprende un conjunto de polipéptidos, típicamente dos en las realizaciones más simples, en el que los componentes de un CAR estándar descrito en esta memoria, p. ej., un dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular, se dividen en polipéptidos o miembros separados. En algunos casos, el conjunto de polipéptidos incluye un conmutador de la dimerización que, tras la presencia de una molécula de dimerización, puede acoplar los polipéptidos entre sí, p. ej., puede acoplar un dominio de unión a antígeno a un dominio de señalización intracelular. En un caso, los CARs de la presente divulgación utilizan un conmutador de la dimerización como los descritos en, p. ej., el documento WO2014127261. En esta memoria se proporcionan una descripción adicional y configuraciones ejemplares de CARs regulables de este tipo y en, p. ej., los párrafos 527-551 de la Publicación Internacional N° WO 2015/090229 presentada el 13 de marzo de 2015.

En algunas realizaciones, un RCAR implica un dominio de conmutación, p. ej., un dominio de conmutación de FKBP, tal como se recoge en SEQ ID NO: 122, o comprende un fragmento de FKBP que tiene la capacidad de unirse con FRB, p. ej., tal como se recoge en SEQ ID NO: 123. En algunas realizaciones, el RCAR implica un dominio de conmutación que comprende una secuencia de FBR, p. ej., tal como se recoge en SEQ ID NO: 124, o una secuencia de FRB mutante, p. ej., tal como se recoge en cualquiera de SEQ ID N°s 125-130.

DVPDYASLGGPSSPKKKRKRKVS RGVQVETISP GDGR TFPKRGQTCVVH  
 YTGML EDGKKFDSSRDRNKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQR  
 AKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETSY (SEQ ID NO: 122)  
 VQVETISP GDGR TFPKRGQTCVVHYTGML EDGKKFDSSRDRNKPFK F  
 MLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQR AKLTISP DYAYGATGHPGIIPPHA  
 TLVFDVELLKLETS (SEQ ID NO: 123)

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER GPQTLKETS F

NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFR RISK (SEQ ID NO: 124)

Tabla 13 FRB mutante ejemplar que tiene afinidad incrementada por una molécula de dimerización

Mutante FRB	Secuencia de Aminoácido	SEQ ID NO:
mutante E2032I	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFR RISKTS	125
mutante E2032L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFR RISKTS	126
mutante T2098L	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFR RISKTS	127
mutante E2032, T2098	ILWHEMWHEGLX <del>E</del> ASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLX <del>Q</del> AWDLYYHVFR RISKTS	128
mutante E2032I, T2098L	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFR RISKTS	129
mutante E2032L, T2098L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFR RISKTS	130

Transfección de ARN

En esta memoria se describen métodos para producir un ARN CAR transcrito in vitro. La presente divulgación también incluye un ARN que codifica un CAR que se puede transfectar directamente en una célula. Un método para generar ARNm para uso en la transfección puede implicar la transcripción in vitro (IVT) de un molde con cebadores especialmente diseñados, seguida de la adición de poliA, para producir una construcción que contiene secuencias 3' y 5' no traducidas ("UTR"), un casquete 5' y/o un Sitio de Entrada al Ribosoma Interno (IRES), el ácido nucleico que se ha de expresar y una cola de poliA, típicamente de 50-2000 bases de longitud (SEQ ID NO: 131). El ARN así producido puede transfectar eficazmente diferentes tipos de células. En un aspecto, el molde incluye secuencias para el CAR.

En un aspecto, el CAR anti-CD19 es codificado por un ARN mensajero (ARNm). En un aspecto, el ARNm que codifica el CAR anti-CD19 se introduce en una célula efectora inmunitaria, p. ej., una célula T o una célula NK, para la producción de una célula que expresa CAR, p. ej., una célula CART o una célula CAR NK.

En un caso, el ARN de CAR transcrito in vitro puede introducirse en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN se produce mediante transcripción in vitro utilizando un molde generado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente se puede convertir directamente mediante PCR en un molde para la síntesis de ARNm in vitro utilizando cebadores apropiados y ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, p. ej., ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN. El molde deseado para la transcripción in vitro es un CAR de la presente divulgación. Por ejemplo, el molde para el ARN de CAR comprende una región extracelular que comprende un dominio variable de cadena sencilla de un anticuerpo antitumoral; una región de bisagra, un dominio transmembrana (p. ej., un dominio transmembrana de CD8a); y una región citoplásmica que incluye un dominio de señalización intracelular, p. ej., que comprende el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB.

En un caso, el ADN a utilizar para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede proceder de una secuencia de ADN que se produce de forma natural del genoma de un organismo. En un caso, el ácido nucleico puede incluir algunas o todas las regiones no traducidas (UTR) 5' y/o 3'. El ácido nucleico puede incluir exones e intrones. En un caso, el ADN a utilizar para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humano. En otro caso, el ADN a utilizar para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humano que incluye las UTRs 5' y 3'. Alternativamente, el ADN puede ser una secuencia de ADN artificial que normalmente no se expresa en un organismo que se produce de forma natural. Una secuencia de ADN artificial ejemplar es aquella que contiene porciones de genes que se ligan entre sí para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que se ligan entre sí pueden ser de un solo organismo o de más de un organismo.

La PCR se utiliza para generar un molde para la transcripción in vitro de ARNm que se utiliza para la transfección. Métodos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Cebadores para uso en la PCR están diseñados para tener regiones que sean sustancialmente complementarias a las regiones del ADN a utilizar como un molde para la PCR. "Sustancialmente complementarias", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a secuencias de nucleótidos en las que la mayoría o todas las bases en la secuencia del cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias o están emparejadas erróneamente. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de reasociarse o hibridarse con la diana de ADN pretendida bajo las condiciones de reasociación utilizadas para la PCR. Los cebadores pueden diseñarse para que sean sustancialmente complementarios a cualquier porción del molde de ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse para amplificar la porción de un ácido nucleico que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluyendo las UTRs 5' y 3'. Los cebadores también pueden diseñarse para amplificar una porción de un ácido nucleico que codifica un dominio de interés particular. En un caso, los cebadores están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluyendo todas o porciones de las UTRs 5' y 3'. Cebadores útiles para la PCR se pueden generar mediante métodos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. "Cebadores directos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos en el molde de ADN que están aguas arriba de la secuencia de ADN que se ha de amplificar. "Aguas arriba" se utiliza en esta memoria para referirse a una ubicación 5 con respecto a la secuencia de ADN que se ha de amplificar en relación con la cadena codificante. "Cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a un molde de ADN de doble cadena que se encuentran aguas abajo de la secuencia de ADN que se ha de amplificar. "Aguas abajo" se utiliza en esta memoria para referirse a una ubicación 3' de la secuencia de ADN que se ha de amplificar en relación con la cadena codificante.

Se puede utilizar cualquier ADN polimerasa útil para la PCR en los métodos descritos en esta memoria. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente de un cierto número de fuentes.

También se pueden utilizar estructuras químicas con la capacidad de fomentar la estabilidad y/o la eficiencia de la traducción. El ARN tiene preferiblemente UTRs 5' y 3'. En un caso, la UTR 5' tiene una longitud de entre uno y 3000 nucleótidos. La longitud de las secuencias de UTR 5' y 3' a añadir a la región codificante puede alterarse mediante diferentes métodos, que incluyen, pero no se limitan al diseño de cebadores para la PCR que se hibridan con diferentes

regiones de las UTRs. Utilizando este enfoque, un experto ordinario en la técnica puede modificar las longitudes de UTRs 5' y 3' requeridas para lograr una eficiencia óptima de la traducción después de la transfección del ARN transcrito

5 Las UTR 5' y 3' pueden ser las UTR 5' y 3' endógenas que se producen de forma natural para el ácido nucleico de interés. Alternativamente, las secuencias de UTR que no son endógenas al ácido nucleico de interés pueden añadirse incorporando las secuencias de UTR en los cebadores directo e inverso o mediante cualquier otra modificación del molde. El uso de secuencias de UTR que no son endógenas al ácido nucleico de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en las secuencias UTR 3' pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, las UTR 3' pueden seleccionarse o  
10 diseñarse para aumentar la estabilidad del ARN transcrito basándose en las propiedades de las UTRs que son bien conocidas en la técnica.

15 En un caso, la UTR 5' puede contener la secuencia Kozak del ácido nucleico endógeno. Alternativamente, cuando se añade mediante PCR una UTR 5' que no es endógena al ácido nucleico de interés como se describe arriba, se puede rediseñar una secuencia Kozak de consenso añadiendo la secuencia UTR 5'. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficiencia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parece ser necesario para que todos los ARNs permitan una traducción eficiente. El requisito de secuencias de Kozak para muchos ARNm es conocido en la técnica. En otros casos, la UTR 5' puede ser la UTR 5' de un virus de ARN, cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otros casos, se pueden utilizar diversos análogos de nucleótidos en la UTR 3' o 5' para  
20 impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

25 Para permitir la síntesis de ARN a partir de un molde de ADN sin la necesidad de clonación de genes, debe fijarse un promotor de la transcripción al molde de ADN aguas arriba de la secuencia que se ha de transcribir. Cuando se añade una secuencia que funciona como un promotor de una ARN polimerasa al extremo 5' del cebador directo, el promotor de ARN polimerasa se incorpora en el producto de la PCR aguas arriba del marco de lectura abierto que se ha de transcribir. En un caso preferido, el promotor es un promotor de la polimerasa T7 tal como se describe en otra parte de esta memoria. Otros promotores útiles incluyen, pero no se limitan a promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias de nucleótidos consenso para los promotores T7, T3 y SP6 se conocen en la técnica.

30 En un caso preferido, el ARNm tiene tanto un casquete en el extremo 5' como una cola poli(A) 3' que determina la unión del ribosoma, el inicio de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En un molde de ADN circular, p. ej., ADN plasmídico, la ARN polimerasa produce un producto concatémico largo que no es adecuado para la expresión en células eucarióticas. La transcripción del ADN plasmídico linearizado al final de la UTR 3' da como resultado un ARNm de tamaño normal que no es eficaz en la transfección eucariótica incluso si está poliadenilado  
35 después de la transcripción.

40 En un molde de ADN lineal, la ARN polimerasa del fago T7 puede extender el extremo 3' de la transcripción más allá de la última base del molde (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva y Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

45 El método convencional de integración de tramos poliA/T en un molde de ADN es la clonación molecular. Sin embargo, la secuencia poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede provocar inestabilidad del plásmido, razón por la cual los moldes de ADN plasmídico obtenidos de células bacterianas están a menudo muy contaminados con deleciones y otras aberraciones. Esto hace que los procedimientos de clonación no solo sean laboriosos y prolongados, sino que a menudo no sean fiables. Esa es la razón por la que es muy deseable un método que permita la construcción de moldes de ADN con tramo poliA/T 3' sin clonación.

50 El segmento poliA/T del molde de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR utilizando un cebador inverso que contiene una cola poliT, tal como la cola de 100T (SEQ ID NO: 110) (el tamaño puede ser 50-5000 T (SEQ ID NO: 111)), o después de la PCR mediante cualquier otro método, incluyendo, pero no limitado a ligamiento de ADN o la recombinación in vitro. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARNs y reducen su degradación. Generalmente, la longitud de una cola poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En un caso, la cola poli(A) está entre 100 y 5000 adenosinas (SEQ ID NO: 112).

55 Las colas poli(A) de ARN se pueden extender adicionalmente después de la transcripción in vitro con el uso de una poli(A) polimerasa, tal como la poliA polimerasa de *E. coli* (E-PAP). En un ejemplo, el aumento de la longitud de una cola poli(A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos (SEQ ID NO: 113) resulta en un aumento de aproximadamente dos veces en la eficiencia de la traducción del ARN. Además, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Una fijación de este tipo puede contener nucleótidos modificados/artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, análogos de ATP se pueden incorporar en la cola poli(A) utilizando poli(A) polimerasa. Análogos de ATP pueden aumentar adicionalmente la estabilidad del ARN  
60

Los casquetes de 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En un caso preferido, los ARNs producidos por los métodos descritos en esta memoria incluyen un casquete 5'. El casquete 5' se proporciona

utilizando técnicas conocidas en la técnica y descritas en esta memoria (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

5 Los ARN producidos mediante los métodos descritos en esta memoria también pueden contener una secuencia de sitio de entrada al ribosoma interno (IRES). La secuencia de IRES puede ser cualquier secuencia viral, cromosómica o diseñada artificialmente que inicie la unión del ribosoma independiente del casquete al ARNm y facilite el inicio de la traducción. Puede incluirse cualquier soluto adecuado para la electroporación celular, que pueda contener factores que faciliten la permeabilidad y la viabilidad celular, tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes y tensioactivos.

10 El ARN se puede introducir en las células diana utilizando cualquiera de un cierto número de métodos diferentes, por ejemplo, métodos disponibles comercialmente que incluyen, pero no se limitan a electroporación (Amatax Nucleofector-II (Amatax Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colorado), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo Alemania), transfección mediada por liposomas catiónicos utilizando lipofección, encapsulación de polímeros, transfección mediada por péptidos o sistemas de suministro de partículas biolísticas, tales como "pistolas de genes" (véase, p. ej., Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12 (8): 861-70 (2001).

## 20 Métodos de suministro no virales

En algunos aspectos, se pueden utilizar métodos no virales para suministrar un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en esta memoria en una célula, o tejido o un sujeto.

25 En algunos casos, el método no viral incluye el uso de un transposón (también denominado elemento transponible). En algunos casos, un transposón es un trozo de ADN que puede insertarse por sí mismo en un lugar de un genoma, por ejemplo, un trozo de ADN que es capaz de auto-replicarse e insertar su copia en un genoma, o un trozo de ADN que se puede cortar y empalmar de un ácido nucleico más largo e insertarse en otro lugar del genoma. Por ejemplo, un transposón comprende una secuencia de ADN formada por repeticiones invertidas que flanquean genes para la transposición.

30 Métodos ejemplares de suministro de ácidos nucleicos utilizando un transposón incluyen un sistema de transposones Sleeping Beauty (SBTS) y un sistema de transposones piggyBac (PB). Véase, p. ej., Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20.R1(2011):R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang et al. Mol. Ther. 16(2008):580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al. Blood. 122.21(2013):166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65; y Ding et al. Cell. 122.3(2005):473-83.

40 El SBTS incluye dos componentes: 1) un transposón que contiene un transgén y 2) una fuente de enzima transposasa. La transposasa puede transponer el transposón de un plásmido de soporte (u otro ADN donante) a un ADN diana, tal como el cromosoma/genoma de una célula huésped. Por ejemplo, la transposasa se une al plásmido soporte/ADN donante, corta el transposón (incluidos el o los transgenes) del plásmido y lo inserta en el genoma de la célula huésped. Véase, p. ej., Aronovich et al. *supra*.

45 Transposones ejemplares incluyen un transposón basado en pT2. Véase, p. ej., Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47; y Singh et al. Cancer Res. 68.8(2008): 2961-2971. Ejemplos de transposasas incluyen una transposasa de tipo Tc1/mariner, p. ej., la transposasa SB10 o la transposasa SB11 (una transposasa hiperactiva que puede expresarse, p. ej., a partir de un promotor de citomegalovirus). Véase, p. ej., Aronovich et al.; Kebriaei et al.; y Grabundzija et al.

50 El uso del SBTS permite la integración y expresión eficientes de un transgén, p. ej., un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en esta memoria. En esta memoria se proporcionan métodos para generar una célula, p. ej., una célula T o una célula NK, que expresa de manera estable un CAR descrito en esta memoria, p. ej., utilizando un sistema de transposones tal como SBTS.

55 De acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, en algunos casos, uno o más ácidos nucleicos, p. ej., plásmidos, que contienen los componentes SBTS se administran a una célula (p. ej., célula T o NK). Por ejemplo, el o los ácidos nucleicos se suministran mediante métodos estándares de administración de ácidos nucleicos (p. ej., ADN plasmídico), p. ej., métodos descritos en esta memoria, p. ej., electroporación, transfección o lipofección. En algunos casos, el ácido nucleico contiene un transposón que comprende un transgén, p. ej., un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en esta memoria. En algunos casos, el ácido nucleico contiene un transposón que comprende un transgén (p. ej., un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en esta memoria), así como una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima transposasa. En otros casos, se proporciona un sistema con dos ácidos nucleicos, p. ej., un sistema de plásmido dual, p. ej., en que un primer plásmido contiene un transposón que comprende un transgén, y un segundo plásmido contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima transposasa. Por

ejemplo, el primer y el segundo ácidos nucleicos se suministran conjuntamente a una célula huésped.

En algunos casos, se generan células, p. ej., células T o NK, que expresan un CAR descrito en esta memoria utilizando una combinación de inserción de genes utilizando SBTS y edición genética utilizando una nucleasa (p. ej., nucleasas de dedos de zinc (ZFNs), Nucleasas Efectoras de Tipo Activador de la Transcripción (TALENs), el sistema CRISPR/Cas o las endonucleasas autodirigidas re-modificadas genéticamente con meganucleasas modificadas genéticamente).

En algunos casos, el uso de un método de suministro no viral permite la reprogramación de células, p. ej., células T o NK, y la infusión directa de las células en un sujeto. Las ventajas de los vectores no virales incluyen, pero no se limitan a, la facilidad y el coste relativamente bajo de producir cantidades suficientes requeridas para satisfacer una población de pacientes, la estabilidad durante el almacenamiento y la falta de inmunogenicidad.

#### Construcciones de Ácidos Nucleicos que Codifican un CAR

La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una o más construcciones CAR descritas en esta memoria. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una transcripción de ARN mensajero. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una construcción de ADN. Las moléculas de ácido nucleico descritas en esta memoria pueden ser una molécula de ADN, una molécula de ARN o una combinación de las mismas. En otros casos, la molécula de ácido nucleico es un vector que incluye cualquiera de las moléculas de ácido nucleico antes mencionadas.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación pertenece a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en donde el CAR comprende un dominio de unión anti-CD19 (p. ej., un dominio de unión anti-CD19 humanizado), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulante, p. ej., un dominio de señalización coestimulador y/o un dominio de señalización primario, p. ej., cadena zeta. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 es un dominio de unión anti-CD19 descrito en esta memoria, p. ej., un dominio de unión anti-CD19 que comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:59, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma. En un caso, el dominio transmembrana es el dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En un caso, el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana por una región de bisagra, p. ej., una región de bisagra descrita en esta memoria. En un caso, la región de bisagra comprende SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:47 o SEQ ID NO:49, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma. En un caso, la molécula de ácido nucleico aislada comprende, además, una secuencia que codifica un dominio coestimulador. En un caso, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). En un caso, el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma y la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica.

En otro aspecto, la divulgación pertenece a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una construcción CAR que comprende una secuencia conductora de SEQ ID NO: 13, un dominio scFv que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, y SEQ ID NO:59, (o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma), una región de bisagra de SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:47 o SEQ ID NO:49 (o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma), un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15 (o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma), un dominio coestimulador 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o un dominio coestimulador CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 51 (o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma), y un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43 (o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma).

En otro aspecto, la divulgación pertenece a una molécula polipeptídica aislada codificada por la molécula de ácido nucleico. En un caso, la molécula de polipéptido aislada comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID

NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:59 o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma.

En otro aspecto, la divulgación pertenece a una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión anti-CD19, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulante, y en donde dicho dominio anti-CD19 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:59, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma.

En un caso, la molécula de CAR codificada comprende, además, una secuencia que codifica un dominio coestimulador. En un caso, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 4-1BB (CD137). En un caso, el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16. En un caso, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En un caso, el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y un dominio de señalización funcional de zeta. En un caso, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16 y la secuencia de SEQ ID NO: 17, en donde las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una sola cadena polipeptídica. En un caso, el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana por una región de bisagra. En un caso, la región de bisagra comprende SEQ ID NO: 14. En un caso, la región de bisagra comprende SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49.

En otro aspecto, la divulgación pertenece a una molécula de CAR codificada que comprende una secuencia conductora de SEQ ID NO: 13, un dominio scFv que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, y SEQ ID NO:59, o una secuencia con 95-99% de identidad con la misma, una región de bisagra de SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:47 o SEQ ID NO:49, un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15, un dominio coestimulador 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o un dominio coestimulador CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 51 y un dominio estimulante CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43. En un caso, la molécula de CAR codificada comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, y SEQ ID NO:59, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener utilizando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, rastreando colecciones de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo, o aislando directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando técnicas estándares. Alternativamente, el gen de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

La presente divulgación también proporciona vectores en los que se inserta un ADN de la presente divulgación. Vectores derivados de retrovirus tales como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de onco-retrovirus, tales como los virus de la leucemia murina, de que pueden transducir células no proliferantes tales como hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de una baja inmunogenicidad. Un vector retroviral también puede ser, p. ej., un vector gammaretroviral. Un vector gammaretroviral puede incluir, p. ej., un promotor, una señal de empaquetamiento ( $\psi$ ), un sitio de unión del cebador (PBS), una o más (p. ej., dos) repeticiones terminales largas (LTR) y un transgén de interés, p. ej., un gen que codifica un CAR. Un vector gammaretroviral puede carecer de genes estructurales virales tales como gag, pol y env. Vectores gammaretrovirales ejemplares incluyen el virus de la leucemia murina (MLV), el virus formador del foco del bazo (SFFV) y el virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), y vectores derivados de los mismos. Otros vectores gammaretrovirales se describen, p. ej., en Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" *Viruses*. Junio de 2011; 3(6): 677-713.

En otro caso, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el CAR deseado de la divulgación es un vector adenoviral (A5/35). En otro caso, la expresión de ácidos nucleicos que codifican CARs se puede lograr utilizando transposones tales como la bella durmiente, crisper, CAS9 y nucleasas de dedos de zinc. Véase, más adelante June et al. 2009 *Nature Reviews Immunology* 9.10: 704-716.

Un vector también puede incluir, p. ej., una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de la transcripción (p. ej., del gen de la hormona de crecimiento bovina (BGH)), un elemento que permite

la replicación episomal y la replicación en procariontes (p. ej., origen SV40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y/o elementos para permitir la selección (p. ej., gen de resistencia a ampicilina y/o marcador de zeocina).

En un breve resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican CARs se logra típicamente enlazando operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o porciones del mismo a un promotor e incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para eucariotas de replicación e integración. Vectores de clonación típicos contienen terminadores de la transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

Las construcciones de expresión de la presente divulgación también pueden utilizarse para la inmunización de ácidos nucleicos y terapia génica, utilizando protocolos estándares de suministro de genes. Métodos para el suministro de genes son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Pat. de EE.UU. N°s 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otro caso la divulgación proporciona un vector de terapia génica.

El ácido nucleico se puede clonar en un cierto número de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico puede clonarse en un vector que incluye, pero no se limita a un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

Además, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), y en otros manuales de virología y biología molecular. Virus que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia de promotor, sitios convenientes de endonucleasas de restricción y uno o más marcadores seleccionables (p. ej., documentos WO 01/96584; WO 01/29058; y Pat. de EE.UU. N° 6.326.193).

Se ha desarrollado un cierto número de sistemas basados en virus para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de suministro de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales utilizando técnicas conocidas en la técnica. A continuación, el virus recombinante puede aislarse y suministrarse a las células del sujeto in vivo o ex vivo. Se conocen en la técnica un cierto número de sistemas retrovirales. En algunos casos, se utilizan vectores de adenovirus. Se conocen en la técnica un cierto número de vectores de adenovirus. En un caso, se utilizan vectores de lentivirus.

Elementos promotores adicionales, p. ej., potenciadores, regulan la frecuencia de inicio de la transcripción. Típicamente, estos se encuentran en la región de 30-110 pb aguas arriba del sitio de inicio, aunque se ha demostrado que un cierto número de promotores también contienen elementos funcionales aguas abajo del sitio de inicio. El espaciado entre los elementos promotores es frecuentemente flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor de timidina quinasa (tk), el espaciado entre los elementos del promotor se puede incrementar a 50 pb antes de que la actividad comience a declinar. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción. Promotores ejemplares incluyen los promotores del gen IE de CMV, EF-1 $\alpha$ , ubiquitina C o fosfogliceroquinasa (PGK). En un caso, el promotor es un promotor de PGK, p. ej., un promotor de PGK truncado tal como se describe en esta memoria.

Un ejemplo de un promotor que es capaz de expresar un transgén CAR en una célula T de mamífero es el promotor Ef1a. El promotor EF1a nativo impulsa la expresión de la subunidad alfa del complejo factor de elongación 1, que es el responsable del suministro enzimático de los ARNt de aminoácido al ribosoma. El promotor EF1a se ha utilizado ampliamente en los plásmidos de expresión de mamíferos y ha demostrado ser eficaz en la impulsión de la expresión de CAR a partir de transgenes clonados en un vector lentiviral. Véase, p. ej., Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). En un aspecto, el promotor EF1a comprende la secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 100.

Otro ejemplo de un promotor es la secuencia del promotor temprano de citomegalovirus (CMV). Esta secuencia de promotor es una secuencia de promotor constitutiva fuerte capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica enlazada operativamente a la misma. Sin embargo, también se pueden utilizar otras secuencias de promotor constitutivas, que incluyen, pero no se limitan al promotor temprano del virus simio 40 (SV40), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos, tales como, pero no limitados al promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor del factor de elongación 1 $\alpha$ , el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina quinasa. Además, la divulgación no debe

limitarse al uso de promotores constitutivos. Promotores inducibles también se contemplan como parte de la divulgación. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de conectar la expresión de la secuencia de polinucleótidos a la que está operativamente enlazada cuando se desea una expresión de este tipo, o desconectar la expresión cuando no se desea la expresión. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

Otro ejemplo de un promotor es el promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK). En casos, se puede desear un promotor de PGK truncado (p. ej., un promotor de PGK con una o más, p. ej., 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300 o 400 deleciones de nucleótidos en comparación con la secuencia del promotor de PGK de tipo salvaje). Las secuencias de nucleótidos de promotores de PGK ejemplares se proporcionan a continuación.

Promotor de PGK WT

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCG  
AACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGG  
AGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACC  
GGTGTTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCAT  
GATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGG  
GCTGAATCCCCGCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCGGGTGTTCATCGCCGCTTCTAGGCC  
ACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCAGCCGCGGGCGACGCAAAGGGCC  
TTGGTGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCGCGTTGG

GGTTGGGGCACCATAAGCT (SEQ ID NO: 137)

Promotores de PGK ejemplares  
PGK100;

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCG  
AACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTG (SEQ ID NO:

138)

PGK200;

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCG  
AACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGG  
AGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACC  
GGTGTTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG (SEQ ID NO:139)

PGK300;

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCG  
AACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGG  
AGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACC  
GGTGTTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCAT  
GATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGG  
GCTGAATCCCCG (SEQ ID NO:140)

PGK400;

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCG  
AACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGG  
AGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACC  
GGTGTCCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCAT  
GATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAAGG  
10 GCTGAATCCCCGCTCGTCTTCGCAGCGGCCCGGGTGTTCATCGCCGCTTCTAGGCC  
15 ACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG (SEQ ID NO:141)

5 Un vector también puede incluir, p. ej., una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de la transcripción (p. ej., del gen de la hormona de crecimiento bovina (BGH)), un elemento que permite la replicación episomal y la replicación en procariontes (p. ej., origen SV40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y/o elementos para permitir la selección (p. ej., gen de resistencia a ampicilina y/o marcador de zeocina).

10 Con el fin de evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen informador o ambos para facilitar la identificación y selección de células de expresión de la población de células buscadas para ser transfectadas o infectadas a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede ser portado en un trozo separado de ADN y utilizarse en un proceso de co-transfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes informadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las  
15 células huésped. Marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

Los genes informadores se utilizan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen informador es un gen que no está presente en ni es expresado por el  
20 organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, p. ej., la actividad enzimática. La expresión del gen informador se ensaya en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Genes informadores adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada o el gen de la proteína verde fluorescente (p. ej., Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Sistemas de expresión  
25 adecuados son bien conocidos y pueden prepararse utilizando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente. En general, la construcción con la región flanqueante 5' mínima que muestra el nivel más alto de expresión del gen informador se identifica como el promotor. Dichas regiones de promotor pueden enlazarse a un gen informador y utilizarse para evaluar la capacidad de los agentes para modular la transcripción impulsada por el promotor.

30 En casos, el vector puede comprender dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican un CAR, p. ej., un CAR descrito en esta memoria, p. ej., un CAR CD19 y un segundo CAR, p. ej., un CAR inhibidor o un CAR que se une específicamente a un antígeno distinto de CD19. En tales casos, las dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican el CAR están codificadas por una única molécula nucleica en el mismo marco y como una única cadena polipeptídica. En este aspecto, los dos o más CARs pueden, p. ej., estar separados por uno o más sitios de escisión  
35 de péptidos. (p. ej., un sitio de auto-escisión o un sustrato para una proteasa intracelular). Ejemplos de sitios de escisión de péptidos incluyen sitios T2A, P2A, E2A o F2A.

Se conocen en la técnica métodos para introducir y expresar genes en una célula. En el contexto de un vector de expresión, el vector se puede introducir fácilmente en una célula huésped, p. ej., una célula de mamífero, bacteriana,  
40 de levadura o de insecto mediante cualquier método en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula huésped por medios físicos, químicos o biológicos.

Métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen precipitación con fosfato cálcico, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Métodos para producir células que  
45 comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volúmenes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY). Un método adecuado para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped es la transfección con fosfato de calcio.

50 Métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más ampliamente utilizado para insertar genes en células de mamíferos, p. ej., humanas. Otros vectores virales pueden

derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adeno-asociados y similares. Véanse, p. ej., las Pat. de EE.UU. N°s 5.350.674 y 5.585.362.

Medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para uso como vehículo de suministro *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (p. ej., una vesícula de la membrana artificial). Están disponibles otros métodos de suministro fijado como objetivo del estado de la técnica de ácidos nucleicos, tales como el suministro de polinucleótidos con nanopartículas fijadas como objetivo u otro sistema de suministro de tamaño sub-micrónico adecuado.

En el caso de que se utilice un sistema de suministro no viral, un vehículo de suministro ejemplar es un liposoma. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula huésped (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido puede encapsularse en el interior acuoso de un liposoma, intercalarse dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, fijarse a un liposoma mediante una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atraparse en un liposoma, formar complejo con un liposoma, dispersarse en una solución que contiene un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, estar contenido como una suspensión en un lípido, estar contenido o formar complejo con una micela, o asociarse de otro modo con un lípido. Las composiciones asociadas a lípidos, lípidos/ADN o lípidos/vectores de expresión no se limitan a estructura particular en solución alguna. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, tales como micelas o con una estructura "colapsada". También pueden simplemente estar intercaladas en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos naturales o sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotitas grasas que se producen de forma natural en el citoplasma, así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes y aldehídos.

Lípidos adecuados para uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, la dimiristilfosfatidilcolina ("DMPC") se puede obtener de Sigma, St. Louis, MO; el fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener de K & K Laboratories (Plainview, NY); el colesterol ("Choi") se puede obtener de Calbiochem-Behring; el dimiristilfosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol pueden almacenarse a aproximadamente -20°C. "Liposoma" es un término genérico que abarca una diversidad de vehículos lipídicos simples y multilaminares formados por la generación de bicapas o agregados lipídicos encerrados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se auto-reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Sin embargo, también se abarcan composiciones que tienen estructuras en solución diferentes a la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. También se contemplan complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula huésped o exponer de otro modo una célula al inhibidor de la presente divulgación, con el fin de confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula huésped, se puede realizar una diversidad de ensayos. Ensayos de este tipo incluyen, p. ej., ensayos "moleculares biológicos" bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como la transferencia Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular, p. ej., por medios inmunológicos (ELISA y transferencias Western) o mediante ensayos descritos en esta memoria para identificar agentes que caen dentro del alcance de la divulgación.

La presente divulgación proporciona, además, un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR. En un aspecto, un vector del CAR se puede transducir directamente en una célula, p. ej., una célula T. En un aspecto, el vector es un vector de clonación o expresión, p. ej., un vector que incluye, pero no se limita a uno o más plásmidos (p. ej., plásmidos de expresión, vectores de clonación, minicírculos, minivectores, cromosomas de doble minuto), construcciones de vectores retrovirales y lentivirales. En un aspecto, el vector es capaz de expresar la construcción CAR en células T de mamíferos. En un aspecto, la célula T de mamífero es una célula T humana.

#### CARs de receptores de células asesinas naturales (NKR)

En un caso, la molécula de CAR descrita en esta memoria comprende uno o más componentes de un receptor de células asesinas naturales (NKR), formando con ello un NKR-CAR. El componente NKR puede ser un dominio transmembrana, un dominio bisagra o un dominio citoplasmático de cualquiera de los siguientes receptores de células asesinas naturales: receptor similar a inmunoglobulina de células asesinas (KIR), p. ej., KIR2DL1, KIR2DL2/L3,

KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, DIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 y KIR3DP1; receptor de citotoxicidad natural (NCR), p. ej., NKp30, NKp44, NKp46; familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización (SLAM) de receptores de células inmunitarias, p. ej., CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME y CD2F-10; receptor de Fc (FcR), p. ej., CD16 y CD64; y receptores Ly49, p. ej., LY49A, LY49C. Las moléculas NKR-CAR descritas en esta memoria pueden interactuar con una molécula adaptadora o un dominio de señalización intracelular, p. ej., DAP12. Configuraciones y secuencias ejemplares de moléculas de CAR que comprenden componentes NKR se describen en la Publicación Internacional N° WO2014/145252.

#### **CAR dividido**

En algunas realizaciones, la célula que expresa CAR utiliza un CAR dividido. El enfoque de CAR dividido se describe con más detalle en las publicaciones WO2014/055442 y WO2014/055657. Brevemente, un sistema CAR dividido comprende una célula que expresa un primer CAR que tiene un primer dominio de unión a antígeno y un dominio coestimulador (p. ej., 41BB), y la célula también expresa un segundo CAR que tiene un segundo dominio de unión a antígeno y un dominio de señalización intracelular (p. ej., CD3 zeta). Cuando la célula topa con el primer antígeno, el dominio coestimulador se activa y la célula prolifera. Cuando la célula topa con el segundo antígeno, el dominio de señalización intracelular se activa y comienza la actividad de exterminio celular. Por lo tanto, la célula que expresa CAR sólo se activa completamente en presencia de ambos antígenos.

#### Células Efectoras Inmunitarias

También se describen en esta memoria células que contienen una molécula de CAR descrita en esta memoria o un ácido nucleico que codifica un CAR tal como se describe en esta memoria. También se describen en esta memoria células que han sido transfectadas o transformadas con un ácido nucleico descrito en esta memoria, p. ej., un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., tal como se describe en esta memoria. En un caso, la célula es una célula descrita en esta memoria, p. ej., una célula T humana, p. ej., una célula T humana descrita en esta memoria, o una célula NK humana, p. ej., una célula NK humana descrita en esta memoria. En un caso, la célula T humana es una célula T CD8+. En algunos casos, la célula es autóloga del sujeto que se ha de tratar con la célula. En algunos casos, la célula es alogénica del sujeto que se ha de tratar con la célula.

En un aspecto, la célula que expresa un CAR descrita en esta memoria puede comprender, además, un segundo CAR, p. ej., un segundo CAR que incluye un dominio de unión a antígeno diferente, p. ej., a la misma diana o una diana diferente (p. ej., una diana que no sea un antígeno tumoral descrito en esta memoria o un antígeno tumoral diferente del descrito en esta memoria). En una realización, el segundo CAR incluye un dominio de unión de antígeno a una diana que expresa el mismo tipo de célula cancerosa que el antígeno tumoral. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que fija como objetivo un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador, pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que fija como objetivo un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario, pero no un dominio de señalización coestimulador. Sin desear estar ligado por la teoría, la colocación de un dominio de señalización coestimulador, p. ej., 4-1BB, CD28, ICOS, CD27 u OX-40, en el primer CAR, y el dominio de señalización primario, p. ej., CD3 zeta, en el el segundo CAR puede limitar la actividad del CAR a las células en las que se expresan ambos objetivos. En un caso, la célula que expresa un CAR comprende un primer CAR de antígeno tumoral que incluye un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno diana descrito en esta memoria, un dominio transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que fija como objetivo un antígeno diana diferente (p. ej., un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización primario. En otro caso, la célula que expresa un CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno diana descrito en esta memoria, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización primario y un segundo CAR que fija como objetivo un antígeno distinto del primer antígeno diana (p. ej., un antígeno expresado en el mismo tipo de célula cancerosa que el primer antígeno diana) e incluye un dominio de unión al antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización coestimulador.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células que expresan un CAR, p. ej., al menos una o más de las cuales comprende una molécula de ácido nucleico descrita en esta memoria. En algunos casos, la población de células que expresan CAR comprende una mezcla de células que expresan diferentes CARs.

Por ejemplo, en un caso, la población de células CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión de antígeno a un antígeno tumoral descrito en esta memoria, y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno diferente, p. ej., un dominio de unión de antígeno a un antígeno tumoral diferente descrito en esta memoria, p. ej., un dominio de unión de antígeno a un antígeno tumoral descrito en esta memoria que difiere del antígeno tumoral unido por el dominio de unión a antígeno del CAR expresado por la primera célula.

Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión a antígeno a un antígeno tumoral descrito en esta memoria, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión de antígeno a una diana distinto de un antígeno tumoral descrito en esta memoria. En un caso, la población de células que expresan CAR incluye, p. ej., una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización intracelular primario y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de células en la que al menos una célula de la población expresa un CAR que tiene un dominio de unión de antígeno a un antígeno tumoral descrito en esta memoria, y una segunda célula que expresa otro agente, p. ej., un agente que potencia la actividad de una célula que expresa un CAR. En un caso, el agente puede ser un agente que inhiba una molécula inhibidora. Moléculas inhibidoras, p. ej., PD-1, pueden, en algunos casos, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR para montar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (CEACAM-1, CEACAM-3, y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFRbeta). En un caso, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria. En un caso, el agente comprende un primer polipéptido, p. ej., de una molécula inhibidora, tal como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3, y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos, y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., que comprende un dominio coestimulador (p. ej., 41BB, CD27, OX40 o CD28, p. ej., tal como se describe en esta memoria) y/o un dominio de señalización primaria (p. ej., un dominio de señalización CD3 zeta descrito en esta memoria). En un caso, el agente comprende un primer polipéptido de PD-1 o un fragmento del mismo y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., un dominio de señalización de CD28 descrito en esta memoria y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en esta memoria).

Co-expresión de CAR con Otras Moléculas o Agentes  
*Co-expresión de un Segundo CAR*

En un aspecto, la célula que expresa un CAR descrita en esta memoria puede comprender, además, un segundo CAR, p. ej., un segundo CAR que incluye un dominio de unión a antígeno diferente, p. ej., a la misma diana (p. ej., CD19) o una diana diferente (p. ej., una diana distinta de CD19, p. ej., una diana descrita en esta memoria). En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que fija como objetivo un primer antígeno e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización coestimulador, pero no un dominio de señalización primario, y un segundo CAR que fija como objetivo un segundo antígeno diferente e incluye un dominio de señalización intracelular que tiene un dominio de señalización primario, pero no un dominio de señalización coestimulador. La colocación de un dominio de señalización coestimulador, p. ej., 4-1BB, CD28, CD27, OX-40 o ICOS, en el primer CAR, y el dominio de señalización primario, p. ej., CD3 zeta, en el segundo CAR puede limitar la actividad de CAR a las células en donde se expresan ambas dianas. En una realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio coestimulador y un segundo CAR que fija como objetivo otro antígeno e incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización primario. En otra realización, la célula que expresa CAR comprende un primer CAR que incluye un dominio de unión a antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización primario y un segundo CAR que fija como objetivo otro antígeno e incluye un dominio de unión al antígeno, un dominio de transmembrana y un dominio de señalización coestimulador.

En un caso, la célula que expresa CAR comprende un XCAR descrito en esta memoria y un CAR inhibidor. En un caso, el CAR inhibidor comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno que se encuentra en células normales pero no en células cancerosas. En un caso, el CAR inhibidor comprende el dominio de unión al antígeno, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de una molécula inhibidora. Por ejemplo, el dominio intracelular del CAR inhibidor puede ser un dominio intracelular de PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3, y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej., TGFRbeta).

En una realización, cuando la célula que expresa CAR comprende dos o más CARs diferentes, los dominios de unión al antígeno de los diferentes CARs pueden ser tales que los dominios de unión al antígeno no interactúen entre sí. Por ejemplo, una célula que expresa un primer y segundo CAR puede tener un dominio de unión a antígeno del primer CAR, p. ej., como un fragmento, p. ej., un scFv, que no forma una asociación con el dominio de unión a antígeno del segundo CAR, p. ej., el dominio de unión al antígeno del segundo CAR es un VHH.

En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende moléculas de unión a antígeno de un dominio único (SDAB) que incluyen moléculas cuyas regiones determinantes de la complementariedad son parte de un

- polipéptido de dominio único. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a dominios variables de cadena pesada, moléculas de unión desprovistas de forma natural de cadenas ligeras, dominios únicos derivados de anticuerpos de 4 cadenas convencionales, dominios manipulados y armazones de dominio único distintos de los derivados de anticuerpos. Las moléculas de SDAB pueden ser cualquiera de la técnica o cualesquiera molécula futuras de dominio único. Las moléculas de SDAB pueden derivarse de cualquier especie que incluye, pero no se limita a, ratón, ser humano, camello, llama, lamprea, pez, tiburón, cabra, conejo y bovino. Este término también incluye moléculas de anticuerpos de dominio único que se producen de forma natural de especies distintas de camélidos y tiburones.
- En un aspecto, una molécula de SDAB puede derivarse de una región variable de la inmunoglobulina que se encuentra en el pez, tal como, por ejemplo, la que se deriva del isotipo de inmunoglobulina conocido como Receptor de Antígeno Nuevo (NAR) que se encuentra en el suero de tiburón. Métodos para producir moléculas de dominio único derivadas de una región variable de NAR ("IgNARs") se describen en el documento WO 03/014161 y Streltsov (2005) *Protein Sci.* 14:2901-2909.
- De acuerdo con otro aspecto, una molécula de SDAB es una molécula de unión a antígeno de dominio único que se produce de forma natural conocida como cadena pesada desprovista de cadenas ligeras. Moléculas de dominio único de este tipo se describen en el documento WO 9404678 y Hamers-Casterman, C. et al. (1993) *Nature* 363:446-448, por ejemplo. Por razones de claridad, este dominio variable derivado de una molécula de cadena pesada desprovista de forma natural de cadena ligera se conoce en esta memoria como VHH o nanocuerpo para distinguirla del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Una molécula de VHH de este tipo se puede derivar de especies de Camélidos, p. ej. en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de Camelidae pueden producir moléculas de cadena pesada desprovistas de forma natural de cadena ligera; VHH de este tipo están dentro del alcance de la divulgación.
- Las moléculas de SDAB pueden ser recombinantes, injertadas con CDR, humanizadas, camelizadas, desinmunizadas y/o generadas in vitro (p. ej., seleccionadas mediante presentación de fagos).
- También se ha descubierto que las células que tienen una pluralidad de receptores quiméricos embebidos en la membrana que comprenden un dominio de unión a antígeno que interactúa entre el dominio de unión a antígeno de los receptores pueden ser indeseables, p. ej., porque inhiben la capacidad de uno o más de los dominios de unión de unirse a su antígeno afín. Por consiguiente, en esta memoria se describen células que tienen un primer y un segundo receptor quimérico embebido en la membrana que no se produce de forma natural que comprende dominios de unión a antígeno que minimizan interacciones de este tipo. También se describen en esta memoria ácidos nucleicos que codifican un primer y un segundo receptor quimérico embebido en la membrana que no se produce de forma natural que comprende dominios de unión a antígeno que minimizan interacciones de este tipo así como métodos para fabricar y utilizar células y ácidos nucleicos de este tipo. En una realización, el dominio de unión al antígeno de uno del primer y segundo receptor quimérico embebido en la membrana que no se produce de forma natural comprende un scFv, y el otro comprende un dominio de VH único, p. ej., un dominio de VH único de camélido, tiburón o lamprea, o un dominio de VH único derivado de una secuencia humana o de ratón.
- En algunas realizaciones, la célula comprende un primer y un segundo CAR, en donde el dominio de unión a antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR no comprende un dominio ligero variable y un dominio pesado variable. En algunas realizaciones, el dominio de unión al antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR es un scFv y el otro no es un scFv. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un único dominio VH, p. ej., un único dominio VH de camélido, tiburón o lamprea, o un único dominio VH derivado de una secuencia humana o de ratón. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un nanocuerpo. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un dominio VHH de camélido.
- En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un scFv y el otro comprende un único dominio VH, p. ej., un único dominio VH de camélido, tiburón o lamprea, o un único dominio VH derivado de una secuencia humana o de ratón. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un scFv y el otro comprende un nanocuerpo. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno de uno del primer CAR y el segundo CAR comprende un scFv y el otro comprende un dominio VHH de camélido.
- En algunas realizaciones, cuando está presente en la superficie de una célula, la unión del dominio de unión a antígeno del primer CAR a su antígeno afín no se reduce sustancialmente por la presencia del segundo CAR. En algunas realizaciones, la unión del dominio de unión a antígeno del primer CAR a su antígeno afín en presencia del segundo CAR es el 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la unión del dominio de unión a antígeno del primer CAR a su antígeno afín en ausencia del segundo CAR.
- En algunas realizaciones, cuando están presentes en la superficie de una célula, los dominios de unión a antígeno del primer CAR y del segundo CAR, se asocian entre sí menos que si ambos fueran dominios de unión a antígeno scFv.

En algunas realizaciones, los dominios de unión a antígeno del primer CAR y del segundo CAR se asocian entre sí un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% menos que si ambos fueran dominios de unión al antígeno scFv.  
*Co-expresión de un Agente que Potencia la Actividad CAR*

5 En otro aspecto, la célula que expresa CAR descrita en esta memoria puede expresar, además, otro agente, p. ej., un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR.

Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de células T. En algunas realizaciones, la molécula que modula o regula la función de células T es una molécula inhibidora. Moléculas inhibidoras, p. ej., PD1, pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de montar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina o TGFR beta.

15 En una realización, un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ARNdc, p. ej., ARNip o ARNhc, repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) o una endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), p. ej., tal como se describe en esta memoria, puede utilizarse para inhibir la expresión de una molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T en la célula que expresa CAR. En una realización, el agente es un ARNhc, p. ej., un ARNhc descrito en esta memoria. En una realización, el agente que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T es inhibido dentro de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de una molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T está enlazada al ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes del CAR.

25 En una realización, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, p. ej., una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, p. ej., un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria. En una realización, el agente comprende un primer polipéptido, p. ej., de una molécula inhibidora, tal como PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina o TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de estos (p. ej., al menos una porción de un dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., que comprende un dominio coestimulador (p. ej., 41BB, CD27 o CD28, p. ej., tal como se describe en esta memoria) y/o un dominio de señalización primario (p. ej., un dominio de señalización CD3 zeta descrito en esta memoria). En una realización, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento del mismo (p. ej., al menos una porción de un dominio extracelular de PD1) y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en esta memoria (p. ej., un dominio de señalización de CD28 descrito en esta memoria y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en esta memoria). PD1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 se expresa en células B activadas, células T y células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Se ha demostrado que dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 regulan a la baja la activación de células T al unirse a PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). La inmunosupresión se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD1 con PD-L1.

50 En una realización, el agente comprende el dominio extracelular (ECD) de una molécula inhibidora, p. ej., Muerte Programada 1 (PD1) puede fusionarse con un dominio transmembrana y dominios de señalización intracelular tales como 41BB y CD3 zeta (a los que también se alude en esta memoria como un CAR PD1). En una realización, el CAR PD1, cuando se utiliza en combinaciones con un CD19 CAR descrito en esta memoria, mejora la persistencia de la célula T. En una realización, el CAR es un CAR PD1 que comprende el dominio extracelular de PD1 indicado como subrayado en SEQ ID NO: 121. En una realización, el CAR PD1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121.

Malpvtallplallhaarppgwflsdprpwnpptsfpallvvtgednatftcsfsntsescfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgq  
dcrfrvtqlpnrgrdfhmsvvrarndsgtylcgaislapkaqikeslraclrvterraevptahpspsrpagqfqlvtvtpaprptpaptiasqplslrpe  
 acrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrvpvtqtqeedgcscrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykq  
 gqnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp  
 pr (SEQ ID NO:121).

55 En una realización, el CAR PD1 comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada a continuación (SEQ ID NO: 132).

pgwflsdpdrpwnpftspallvvtgednatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvtqlpnrdfhmsvv  
rarndsstytcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprppptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdi  
yiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqtteedgcscrpfceeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvld  
krrrdpemgkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO:132).

En una realización, el agente comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el CAR PD1, p. ej., el CAR PD1 descrito en esta memoria. En una realización, la secuencia de ácido nucleico para el CAR PD1 se muestra a continuación, con el PD1 ECD subrayado a continuación en SEQ ID NO: 120

atggcctccctgtcactgcctgtctccccctcgcactcctgctccacgccgtagaccacccggatggtttctggactctccggatcggcc  
gtggaatcccccaacctctcaccggcactcttggtgtgactgagggcgataatgcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgctga  
actggtaccgcatgagccccgtcaaacaccagaccgacaagctcggcggcttccggaagatcggcgcgaaccgggacagagattgctgggtccgcgtgactca  
actgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgctagggcgaaacgactccgggacctacctgtcggagccatctcgtggcgcctaaggc  
ccaaatcaaaagagagcttgaaggccgaactgagagtgaccgagcgcagagctgaggtgccaaactgcacatccatccccatcgctcggcctcgggggc  
agtttcagaccctggtcacgaccactccggcggcggccaccgactccggcccaactatcgcgagccagcccctgctgctgaggccggaagcatgcc  
gccctgccgcccggaggtgctgtgcataccggggattggacttcgcatgcgacatctacattgggctcctcgcggaaactgtggcgtgctccttctgct  
cctggtcatcacctgtactgcaagcgggctcggaaaaagcttctgtacattttcaagcagccctcatgaggccccgtgcaaacaccaggaggaggagc  
gttctcctgccggttccccgaagaggaagaaggaggttcgagctgcgcgtgaagtctccggagcggcggacccccgcctataagcaggggccag  
aacagctgtacaacgaactgaacctgggacggcgggaagatgatgtgctgacaagcggcggcgggacccccgaaatggcggggaagcct  
agaagaagaaccctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgagggcctactccgaaattgggatgaaggagagcggcgga  
ggggaaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtccaccgccaccaaggacacatacgtgcctgacatgaggccctccccctcgc (SEQ  
ID NO: 120).

En otro ejemplo, en una realización, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR puede ser una molécula coestimuladora o un ligando de molécula coestimuladora. Ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen una molécula MHC clase I, una proteína receptora de TNF, una proteína tipo inmunoglobulina, un receptor de citoquina, una integrina, una molécula de activación linfocítica de señalización (proteína SLAM), un receptor de células NK activante, BTLA, un receptor de ligando Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, 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, y un ligando que se une específicamente con CD83, p. ej., tal como se describe en esta memoria. Ejemplos de ligandos de moléculas coestimuladoras incluyen CD80, CD86, CD40L, ICOSL, CD70, OX40L, 4-1BBL, GITRL y LIGHT. En realizaciones, el ligando de la molécula coestimuladora es un ligando para una molécula coestimuladora diferente del dominio de la molécula coestimuladora del CAR. En realizaciones, el ligando de la molécula coestimuladora es un ligando para una molécula coestimuladora que es el mismo que la molécula coestimuladora del CAR. En una realización, el ligando de la molécula coestimuladora es 4-1BBL. En una realización, el ligando coestimulador es CD80 o CD86. En una realización, el ligando de la molécula coestimuladora es CD70. En realizaciones, una célula efectora inmunitaria que expresa CAR descrita en esta memoria se puede manipular adicionalmente para expresar una o más moléculas coestimuladoras adicionales o ligandos de moléculas coestimuladoras.

Fuentes de Células

Antes de la expansión y modificación genética u otra modificación, puede obtenerse de un sujeto una fuente de células, p. ej., células T o células asesinas naturales (NK). Ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, monos, chimpancés, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Las células T pueden obtenerse de un cierto número de fuentes, incluyendo células mononucleares de la sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios

linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores.

En determinados aspectos de la presente divulgación, las células efectoras inmunitarias, p. ej., las células T, pueden obtenerse de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la materia, tales como la separación Ficoll™. En un aspecto, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis. El producto de aféresis contiene típicamente linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y, opcionalmente, colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En un caso, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En un caso alternativo, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, los cationes divalentes.

Las etapas de activación iniciales en ausencia de calcio pueden conducir a una activación ampliada. Como apreciarán fácilmente los expertos ordinarios en la técnica, una etapa de lavado puede llevarse a cabo por métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como mediante el uso de una centrífuga de "flujo continuo" semi-automatizada (p. ej. el procesador de células Cobe 2991, el CytoMate de Baxter o el Cell Saver 5 de Haemonetics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una diversidad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS libre de Ca, libre de Mg, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Alternativamente, se pueden eliminar los componentes indeseables de la muestra de aféresis y las células se resuspenden directamente en el medio de cultivo.

Se reconoce que los métodos de la solicitud pueden utilizar condiciones de medios de cultivo que comprende 5% o menos, p. ej. 2% de suero AB humano, y pueden emplear condiciones de medios de cultivo y composiciones conocidas, p. ej. las descritas en Smith *et al.*, "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement" *Clinical & Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31.

En un aspecto, las células T se aíslan de los linfocitos de la sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o mediante elutriación centrífuga en contraflujo.

Los métodos descritos en esta memoria pueden incluir, p. ej., la selección de una subpoblación específica de células efectoras inmunitarias, p. ej., células T, que son una población agotada en células T reguladoras, células agotadas en CD25+, utilizando, p. ej., una técnica de selección negativa, p. ej., descrita en esta memoria. En algunos casos, la población de células T agotadas reguladoras contiene menos de 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% de células CD25+.

En un caso, las células T reguladoras, p. ej., las células T CD25+, se eliminan de la población utilizando un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, p. ej., IL-2. En un caso, el anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, o el ligando de unión a CD25 se conjuga con un sustrato, p. ej., una perla, o se recubre de otro modo sobre un sustrato, p. ej., una perla. En un caso, el anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, se conjuga con un sustrato tal como se describe en esta memoria.

En un caso, las células T reguladoras, p. ej., células T CD25+, se eliminan de la población utilizando reactivo de agotamiento de CD25 de Miltenyi™. En un caso, la relación de células a reactivo de agotamiento de CD25 es 1e7 células a 20 uL, o 1e7 células a 15 uL, o 1e7 células a 10 uL, o 1e7 células a 5 uL, o 1e7 células a 2,5 uL, o 1e7 células a 1,25 uL. En un caso, p. ej., para células T reguladoras, p. ej., el agotamiento de CD25+, se utilizan más de 500 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 600, 700, 800 o 900 millones de células/ml.

En un caso, la población de células efectoras inmunitarias a agotar incluye aproximadamente  $6 \times 10^9$  células T CD25+. En otros aspectos, la población de células efectoras inmunitarias a agotar incluyen aproximadamente  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  células T CD25+, y cualquier valor entero entremedias. En un caso, la población resultante de células T reguladoras agotadas tiene  $2 \times 10^9$  células T reguladoras, p. ej., células CD25+, o menos (p. ej.,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$  o menos células CD25+).

En un caso, las células T reguladoras, p. ej., células CD25+, se eliminan de la población utilizando el sistema CliniMAC con un conjunto de tubos de agotamiento, tal como p. ej., el conjunto de tubos 162-01. En un caso, el sistema CliniMAC se ejecuta en una configuración de agotamiento tal como, p. ej., DEPLETION2.1.

Sin desear estar ligados por una teoría en particular, disminuir el nivel de reguladores negativos de las células inmunitarias (p. ej., disminuir el número de células inmunitarias no deseadas, p. ej., células T<sub>REG</sub>), en un sujeto antes de la aféresis o durante la fabricación de un producto celular que expresa CAR puede reducir el riesgo de recaída del

sujeto. Por ejemplo, en la técnica se conocen métodos para agotar células T<sub>REG</sub>. Métodos para disminuir las células T<sub>REG</sub> incluyen, pero no se limitan a, ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR (un anticuerpo anti-GITR descrito en esta memoria), agotamiento de CD25, inhibidor de mTOR y combinaciones de los mismos.

5 En algunos casos, los métodos de fabricación comprenden reducir (p. ej., agotar) el número de células T<sub>REG</sub> antes de la fabricación de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, métodos de fabricación comprenden poner en contacto la muestra, p. ej., la muestra de aféresis, con un anticuerpo anti-GITR y/o un anticuerpo anti-CD25 (o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25), p. ej., para agotar las células T<sub>REG</sub> antes de la fabricación del producto de células que expresan CAR (p. ej., células T, células NK).

10 En un caso, un sujeto se trata previamente con una o más terapias que reducen las células T<sub>REG</sub> antes de la recogida de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, reduciendo con ello el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR. En un caso, los métodos para disminuir las células T<sub>REG</sub> incluyen, pero no se limitan a la administración al sujeto de uno o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, agotamiento de CD25 o una combinación de los mismos. La administración de uno o más de ciclofosfamida, anticuerpo anti-GITR, agotamiento de CD25 o una combinación de los mismos, puede producirse antes, durante o después de una infusión del producto celular que expresa CAR.

15 En un caso, un sujeto se trata previamente con ciclofosfamida antes de la recogida de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, reduciendo con ello el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR. En un caso, un sujeto se trata previamente con un anticuerpo anti-GITR antes de la recogida de células para la fabricación de productos celulares que expresan CAR, reduciendo con ello el riesgo de recaída del sujeto al tratamiento con células que expresan CAR.

20 En un caso, la población de células a eliminar no son las células T reguladoras ni las células tumorales, sino las células que de otro modo afectan negativamente a la expansión y/o función de células CART, p. ej., células que expresan CD14, CD11b, CD33, CD15 u otros marcadores expresados por células potencialmente inmunosupresoras. En un caso, se prevé que este tipo de células se eliminen al mismo tiempo que las células T reguladoras y/o las células tumorales, o después de dicho agotamiento, o en otro orden.

25 En un caso, el procedimiento de fabricación de células que expresan CAR (p. ej., células T, células NK) se modifica para agotar las células T<sub>REG</sub> antes de la fabricación del producto de células que expresan CAR (p. ej., células T, células NK) (p. ej., un producto CTL019). En un caso, el agotamiento de CD25 se utiliza para agotar las células T<sub>REG</sub> antes de la fabricación del producto de células que expresan CAR (p. ej., células T, células NK) (p. ej., un producto CTL019).

30 Los métodos descritos en esta memoria pueden incluir más de una etapa de selección, p. ej., más de una etapa de agotamiento. El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr, p. ej., con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección celular mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de la superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales puede incluir anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8.

35 Los métodos descritos en esta memoria pueden incluir, además, la eliminación de células de la población que expresan un antígeno tumoral, p. ej., un antígeno tumoral que no comprende CD25, p. ej., CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 o CD11b, para proporcionar con ello una población de células T reguladoras agotadas, p. ej., agotadas en CD25+ y agotadas en antígeno tumoral que son adecuadas para la expresión de un CAR, p. ej., un CAR descrito en esta memoria. En un caso, las células que expresan un antígeno tumoral se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, p. ej., CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, y un anticuerpo antigénico antitumoral, o fragmento del mismo, se pueden fijar al mismo sustrato, p. ej., una perla, que se puede utilizar para eliminar las células o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, o el anticuerpo antigénico anti-tumoral, o fragmento del mismo, se pueden fijar a perlas separadas, una mezcla de las cuales se puede utilizar para eliminar las células. En otros casos, la eliminación de las células T reguladoras, p. ej., las células CD25+, y la eliminación de las células que expresan el antígeno tumoral es secuencial y se puede producir, p. ej., en cualquier orden.

40 También se proporcionan métodos que incluyen eliminar células de la población que expresen un inhibidor del punto de control, p. ej., un inhibidor del punto de control descrito en esta memoria, p. ej., una o más de células PD1+, células LAG3+ y células TIM3+, para proporcionar con ello una población de células T reguladoras agotadas, p. ej., agotadas en CD25+ y células agotadas en inhibidor del punto de control, p. ej., células agotadas en PD1+, LAG3+ y/o TIM3+. Inhibidores del punto de control ejemplares incluyen PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR (p. ej.,

TGFRbeta), p. ej., tal como se describe en esta memoria en un caso, células que expresan el inhibidor del punto de control se eliminan simultáneamente con las células T reguladoras, p. ej., CD25+. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, y un anticuerpo anti-inhibidor del punto de control, o fragmento del mismo, se pueden fijar a la misma perla que se puede utilizar para eliminar las células, o un anticuerpo anti-CD25, o fragmento del mismo, y el anticuerpo anti-inhibidor del punto de control, o fragmento del mismo, puede unirse a perlas separadas, una mezcla de las cuales puede utilizarse para eliminar las células. En otros casos, la eliminación de las células T reguladoras, p. ej., células CD25+, y la eliminación de las células que expresan el inhibidor del punto de control es secuencial y se puede producir, p. ej., en cualquier orden.

Métodos descritos en esta memoria pueden incluir una etapa de selección positiva. Por ejemplo, las células T pueden aislarse mediante incubación con perlas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (p. ej., 3x28), tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En un caso, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En otro caso, el período de tiempo varía de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros entremedias. En un caso adicional, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En aún otro caso, el período de tiempo es de 10 a 24 horas, p. ej., 24 horas. Pueden utilizarse tiempos de incubación más prolongados para aislar células T en cualquier situación en la que haya pocas células T en comparación con otros tipos de células tal como en el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de tejido tumoral o de individuos inmunodeprimidos. Además, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficiencia de captura de células T CD8+. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo que se permite que las células T se unan a las perlas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de perlas a células T (tal como se describe más adelante en esta memoria), se pueden seleccionar preferentemente subpoblaciones de células T a favor de o en contra del inicio del cultivo o en otros momentos durante el procedimiento. Adicionalmente, aumentando o disminuyendo la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas, u otra superficie, se pueden seleccionar preferentemente subpoblaciones de células T a favor de o en contra del inicio del cultivo o en otros puntos de tiempo deseados.

En un caso, se puede seleccionar una población de células T que exprese uno o más de IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B y perforina, u otras moléculas apropiadas, p. ej., otras citoquinas. Métodos para el rastreo de la expresión celular se pueden determinar, p. ej., mediante los métodos descritos en la publicación PCT N°: WO 2013/126712.

Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y superficie (p. ej., partículas tales como perlas). En determinados aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan entre sí las perlas y las células (p. ej., aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las perlas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de 10 billones de células/ml, 9 billones/ml, 8 billones/ml, 7 billones/ml, 6 billones/ml o 5 billones/ml. En un aspecto, se utiliza una concentración de 1 billón de células/ml. Todavía en un aspecto, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, pueden utilizarse concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml.

El uso de altas concentraciones puede resultar en un rendimiento incrementado de células, una activación de células y una expansión de células. Además, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficaz de las células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, tales como las células T CD28-negativas, o de muestras en las que hay muchas células tumorales presentes (p. ej., sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Poblaciones de células de este tipo pueden tener un valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En un aspecto relacionado, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Diluyendo significativamente la mezcla de células T y la superficie (p. ej., partículas tales como perlas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona las células que expresan grandes cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, las células T CD4+ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan de manera más eficiente que las células T CD8+ en concentraciones diluidas. En un aspecto, la concentración de células utilizada es de  $5 \times 10^6$ /ml. En otros aspectos, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente  $1 \times 10^5$ /ml a  $1 \times 10^6$ /ml, y cualquier valor entero intermedio.

En otros aspectos, las células se pueden incubar en un rotador durante períodos de tiempo variables a velocidades variables a 2-10°C o a temperatura ambiente.

Las células T para la estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. Sin desear estar ligado por la teoría, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina plasma y plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien se conocen en la técnica muchas soluciones y parámetros de congelación y serán útiles en este contexto, un método implica el

5 uso de PBS que contiene 20% de DMSO y 8% de albúmina de suero humano, o medios de cultivo que contienen 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% de albúmina de suero humano y 7,5% de DMSO o 31,25% de Plasmalyte-A, 31,25% de dextrosa al 5%, 0,45% de NaCl, 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% de albúmina de suero humano y 7,5% de DMSO u otro medio de congelación celular adecuado que contienen, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A, las células se congelan después a -80°C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Pueden utilizarse otros métodos de congelación controlada, así como la congelación incontrolada inmediatamente a -20°C o en nitrógeno líquido.

10 En determinados aspectos, las células crioconservadas se descongelan y lavan como se describe en esta memoria y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación utilizando los métodos de la presente divulgación.

15 También se contempla en el contexto de la divulgación la recogida de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior a cuando las células expandidas como se describen en esta memoria podrían ser necesarias. Como tal, la fuente de las células a expandir se puede recoger en cualquier punto de tiempo necesario, y las células deseadas, tales como células T, se pueden aislar y congelar para su uso posterior en la terapia de células efectoras inmunitarias para cualquier número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia con células efectoras inmunitarias, tales como las descritas en esta memoria. En un aspecto, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En determinados aspectos, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y congelan para su uso posterior. En determinados aspectos, las células T pueden expandirse, congelarse y utilizarse en un momento posterior. En determinados aspectos, las muestras se recogen de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular, tal como se describe en esta memoria, pero antes de cualquier tratamiento. En un aspecto adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, pero no se limitan al tratamiento con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoblavos, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación.

35 En un aspecto adicional de la presente divulgación, las células T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento que deja al sujeto con células T funcionales. En este sentido, se ha observado que tras determinados tratamientos oncológicos, en particular tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunológico, poco después del tratamiento durante el período en el que los pacientes normalmente se estarían recuperando del tratamiento, la calidad de las células T obtenidas puede ser óptima, o mejorada por su capacidad de expandirse ex vivo. Asimismo, después de la manipulación ex vivo utilizando los métodos descritos en esta memoria, estas células pueden estar en un estado preferido para un injerto y una expansión in vivo potenciados. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente divulgación recoger células de la sangre, incluidas células T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en determinados aspectos, la movilización (por ejemplo, la movilización con GM-CSF) y los regímenes de acondicionamiento se pueden utilizar para crear una condición en un sujeto en la que se favorezca la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos de células particulares, especialmente durante una ventana de tiempo definida después de la terapia. Tipos de células ilustrativos incluyen células T, células B, células dendríticas y otras células del sistema inmunológico.

45 En un caso, las células efectoras inmunitarias que expresan una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se obtienen de un sujeto que ha recibido una dosis baja, potenciadora de la inmunidad, de un inhibidor de mTOR. En un caso, la población de células efectoras inmunitarias, p. ej., células T, que se han de manipular para expresar un CAR, se recoge después de un tiempo suficiente, o después de una dosificación suficiente de la dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR, de manera que el nivel de células efectoras inmunes PD1-negativas, p. ej., células T, o la relación de células efectoras inmunitarias PD1-negativas, p. ej., células T/células efectoras inmunitarias PD1-positivas, p. ej., células T, en el sujeto o recogido del sujeto aumentó, al menos transitoriamente.

55 En otros casos, la población de células efectoras inmunitarias, p. ej., las células T, que han sido o serán manipuladas para expresar un CAR, puede tratarse ex vivo por contacto con una cantidad de un inhibidor de mTOR que aumenta el número de células efectoras inmunitarias PD1-negativas, p. ej., células T o aumenta la relación de células efectoras inmunitarias PD1-negativas, p. ej., células T/células efectoras inmunitarias PD1-positivas, p. ej., células T.

60 En un caso, la población de células T es deficiente en diacilglicerol quinasa (DGK). Las células deficientes en DGK incluyen células que no expresan ARN o proteína de DGK, o que tienen una actividad de DGK reducida o inhibida. Las células deficientes en DGK se pueden generar mediante enfoques genéticos, p. ej., administrando agentes que interfieren con el ARN, p. ej., ARNip, ARNhc, miARN, para reducir o prevenir la expresión de DGK. Alternativamente,

las células deficientes en DGK se pueden generar mediante tratamiento con los inhibidores de DGK descritos en esta memoria.

5 En un caso, una población de células T es deficiente en Icaros. Las células deficientes en Icaros incluyen células que no expresan ARN o proteínas de Icaros, o que tienen actividad reducida o inhibida de Icaros, células deficientes en Icaros pueden generarse mediante enfoques genéticos, p. ej., administrando agentes que interfieren con el ARN, p. ej., ARNip, ARNhc, miARN, para reducir o prevenir la expresión de Icaros. Alternativamente, se pueden generar células deficientes en Icaros mediante tratamiento con inhibidores de Icaros, p. ej., lenalidomida.

10 En casos, una población de células T es deficiente en DGK y deficiente en Icaros, p. ej., no expresa DGK e Icaros, o tiene actividad reducida o inhibida de DGK e Icaros. Células deficientes en DGK e Icaros de este tipo pueden generarse mediante cualquiera de los métodos descritos en esta memoria.

15 En un caso, las células NK se obtienen del sujeto. En otro caso, las células NK son una línea celular NK, p. ej., la línea celular NK-92 (Conkwest).

#### CAR Alogénico

20 En realizaciones descritas en esta memoria, la célula efectora inmunitaria puede ser una célula efectora inmunitaria alogénica, p. ej., célula T o célula NK. Por ejemplo, la célula puede ser una célula T alogénica, p. ej., una célula T alogénica que carece de expresión de un receptor de células T funcional (TCR) y/o antígeno leucocitario humano (HLA), p. ej., HLA de clase I y/o HLA de clase II.

25 Una célula T que carece de un TCR funcional puede, p. ej., manipularse de manera que no exprese TCR funcional alguno en su superficie, manipularse de manera que no exprese una o más subunidades que comprendan un TCR funcional (p. ej., manipularse de manera que no exprese (o exhiba una expresión reducida de) TCR alfa, TCR beta, TCR gamma, TCR delta, TCR épsilon y/o TCR zeta) o se manipulan de manera que produzcan muy poco TCR funcional en su superficie. Alternativamente, la célula T puede expresar un TCR sustancialmente alterado, p. ej., mediante la expresión de formas mutadas o truncadas de una o más de las subunidades del TCR. La expresión "TCR sustancialmente alterado" significa que este TCR no provocará una reacción inmune adversa en un huésped.

30

Una célula T descrita en esta memoria puede, p. ej., manipularse de modo que no exprese un HLA funcional en su superficie. Por ejemplo, una célula T descrita en esta memoria puede modificarse por ingeniería genética de manera que la expresión de HLA en la superficie celular, p. ej., HLA de clase I y/o HLA de clase II, se regule a la baja. En algunas realizaciones, la regulación a la baja de HLA se puede lograr reduciendo o eliminando la expresión de microglobulina beta-2 (B2M).

35

En algunas realizaciones, la célula T puede carecer de un TCR funcional y un HLA funcional, p. ej., HLA de clase I y/o HLA de clase II.

40

Las células T modificadas que carecen de expresión de un TCR y/o HLA funcionales pueden obtenerse por cualquier medio adecuado, que incluye la inactivación o desactivación de una o más subunidades de TCR o HLA. Por ejemplo, la célula T puede incluir una desactivación de TCR y/o HLA utilizando ARNip, ARNhc, repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), nucleasa efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) o endonucleasa con dedos de zinc (ZFN).

45

En algunas realizaciones, la célula alogénica puede ser una célula que no expresa o expresa en niveles bajos una molécula inhibidora, p. ej., mediante cualquier método descrito en esta memoria. Por ejemplo, la célula puede ser una célula que no expresa o expresa en niveles bajos una molécula inhibidora, p. ej., que puede disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de montar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR (p. ej., TGFR beta). La inhibición de una molécula inhibidora, p. ej., mediante inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar el rendimiento de una célula que expresa CAR. En realizaciones, se puede utilizar un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ARNdc, p. ej., un ARNip o ARNhc, una repetición palindrómica corta, agrupada y regularmente interespaciada (CRISPR), nucleasa efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) o una endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), p. ej., tal como se describe en esta memoria.

50

55

#### *ARNip y ARNhc para inhibir TCR o HLA*

60 En algunas realizaciones, la expresión de TCR y/o la expresión de HLA puede ser inhibida utilizando ARNip o ARNhc que fija como objetivo un ácido nucleico que codifica un TCR y/o HLA y/o una molécula inhibidora descrita en esta memoria (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3,

VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta), en una célula, p. ej., célula T. Los sistemas de expresión para ARNip y ARNhc, y ARNhc ejemplares, se describen, p. ej., en los párrafos 649 y 650 de la Solicitud internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015 **CRISPR para inhibir TCR o HLA**

"CRISPR" o "CRISPR a TCR y/o HLA" o "CRISPR para inhibir TCR y/o HLA", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un conjunto de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas, o un sistema que comprende un conjunto de repeticiones de este tipo. "Cas", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una proteína asociada a CRISPR. Un sistema "CRISPR/Cas" se refiere a un sistema derivado de CRISPR y Cas que se puede utilizar para silenciar o mutar un gen de TCR y/o HLA y/o una molécula inhibidora descrita en esta memoria (p. Ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta), en una célula, p. ej., célula T.

El sistema CRISPR/Cas y usos del mismo se describen, p. ej., en los párrafos 651-658 de la Solicitud internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

#### *ARNip y ARNhc para inhibir TCR y/o HLA*

"TALEN" o "TALEN para HLA y/o TCR" o "TALEN para inhibir HLA y/o TCR" se refiere a una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción, una nucleasa artificial que puede utilizarse para editar el gen HLA y/o TCR y/o una molécula inhibidora descrita en esta memoria (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina y TGFR beta), en una célula, p. ej., células T.

TALEN y usos de la misma se describen, p. ej., en los párrafos 659-665 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. **Nucleasa con dedos de zinc para inhibir HLA y/o TCR**

"ZFN" o "Nucleasa con Dedos de Zinc" o "ZFN para HLA y/o TCR" o "ZFN para inhibir HLA y/o TCR" se refiere a una nucleasa con dedos de zinc, una nucleasa artificial que puede utilizarse para editar el gen HLA y/o TCR y/o una molécula inhibidora descrita en esta memoria (p. ej., PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD270), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina, y TGFR beta), en una célula, p. ej., célula T.

ZFNs y usos de las mismas se describen, p. ej., en los párrafos 666-671 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

#### *Expresión de Telomerasa*

Si bien no se desea estar ligado por cualquier teoría particular en algunos casos una célula T terapéutica tiene una persistencia a corto plazo en un paciente, debido a los telómeros acortados en la célula T; por consiguiente, la transfección con un gen telomerasa puede alargar los telómeros de la célula T y mejorar la persistencia de la célula T en el paciente. Véase Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007). Por lo tanto, en un caso, una célula efectora inmunitaria, p. ej., una célula T, expresa ectópicamente una subunidad de telomerasa, p. ej., la subunidad catalítica de telomerasa, p. ej., TERT, p. ej., hTERT. En algunos aspectos, esta divulgación proporciona un método para producir una célula que expresa CAR, que comprende poner en contacto una célula con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., la subunidad catalítica de telomerasa, p. ej., TERT, p. ej., hTERT. La célula puede ponerse en contacto con el ácido nucleico antes, simultáneamente con o después de ponerse en contacto con una construcción que codifica un CAR.

En un aspecto, la divulgación presenta un método para preparar una población de células efectoras inmunitarias (p. ej., células T o células NK). En un caso, el método comprende: proporcionar una población de células efectoras inmunitarias (p. ej., células T o células NK), poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica un CAR; y poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT, en condiciones que permitan la expresión de CAR y telomerasa.

En un caso, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa es ADN. En un caso, el ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa comprende un promotor capaz de impulsar la expresión de la subunidad de telomerasa.

En un caso, hTERT tiene la secuencia de aminoácidos de GenBank Protein ID AAC51724.1 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Número 4, 22 de agosto de 1997, páginas 785-795) de la siguiente manera:

ES 2 876 974 T3

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCPWDARP  
PPAAPSFRQVSCCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDA  
LRGSGAWGLLLRRVGGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPR  
RRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGASRSRSLPKRPRRGAAPERTPTVGGQSWAHP  
GRTRGSPDRGFCVVSPPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVY  
AETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPL  
FLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPPEEEDTDPRLVQLLRQHSS  
PWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRGCAWLR  
RSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLLFFYRKS VWSKLQSI  
GIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPVNMMDYVVGARTFRREKRAER  
LTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRWRVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYD  
TIPQDRLTEVIASIIKPNQTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETS  
PLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQGSILSTLLCSLCYGD MEN  
KLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRRTLVRGVPEYGCVVNLKRTVVNFPVEDEALGG  
TAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLK  
CHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILK  
AKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCH  
QAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD (SEQ ID NO:  
118)

- 5 En un caso, la hTERT tiene una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 118. En un caso, el hTERT tiene una secuencia de SEQ ID NO: 118. En un caso, la hTERT comprende una delección (p. ej., de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el extremo N, el extremo C o ambos. En un caso, la hTERT comprende una secuencia de aminoácidos transgénica (p. ej., de no más de 5, 10, 15, 20 o 30 aminoácidos) en el extremo N, el extremo C o ambos.
- 10 En un caso, hTERT es codificada por la secuencia de ácido nucleico de GenBank N° de Acceso AF018167 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Número 4, 22 de agosto de 1997, páginas 785-795):

ES 2 876 974 T3

1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc  
61 cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct cctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc  
121 tgccgctggc cacgttcgtg cggcgctgg ggccccaggg ctggcggtg gtgcagcgcg  
181 gggacccggc ggtttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgctg cctggggacg  
241 cacggccgcc ccccgccgc cctccttc gccaggtgc ctgcctgaag gagctggtg  
301 cccgagtgt gcagaggctg tgcgagcgc gcgcaagaa cgtgctggcc ttggcttcg  
361 cgctgctgga cggggcccgc gggggcccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct  
421 acctgccaa cacggtgacc gacgactgc gggggagcgg ggcgtgggg ctgctgttc  
481 gccgcgtggg cgacgactg ctggttacc tgetggcag ctgcgcgctc tttgtctg  
541 tggctcccag ctgcgctac caggtgtgag gccgcgct gtaccagctc gccgctgcca  
601 ctacggccc gcccccga cacgctagt gaccccgaag gcgtctgga tgcgaacggg  
661 cctggaacca tagcgtcagg gagggcggg tccccctgg cctgccagcc ccgggtgca  
721 ggaggcgcgg gggcagtgc agccgaagtc tgccgtgccc caagaggccc aggcgtggcg  
781 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgtg ggcaggggtc ctgggcccac ccgggcagga  
841 cgcgtggacc gactgaccgt ggtttctg tggtgtacc tgccagacc gccgaagaag  
901 ccacctttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacctcc gtgggccgc  
961 agcaccacgc gggccccca tccacatgc gccaccacg tcctgggac acgcctgtc  
1021 ccccggtgta cgccgagacc aagcacttc tctactctc aggcgacaag gagcagctgc  
1081 ggccctctt ctactcagc tctctgagg ccagcctgac tggcgtcgg aggctcgtg  
1141 agaccatctt totgggttc aggcctgga tgccaggac tccccaggg ttccccgc  
1201 tgccccagc ctactggcaa atgggcccc tgtttctgga gctgctggg aaccacgcg

ES 2 876 974 T3

1261 agtgcccta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgct gcgagctgcg gtcaccccag  
1321 cagccgggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggcggcccc gaggaggagg  
1381 acacagacc cgtgcgctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt  
1441 acggcttctg gcgggctgc ctgcgccggc tgggcccc aggcctctgg ggctccagge  
1501 acaacgaacg ccgcttcctc aggaacacca agaagtcat ctcctgggg aagcatgcca  
1561 agctctcgt gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgt tggctgcgca  
1621 ggagcccagg ggttggtgt gttccggccg cagagcaccg tctgcgtgag gatatctgg  
1681 ccaagttct gcactggctg atgagtgt acgtcgtcga gctgctcagg tttttttt  
1741 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctctttt ctaccggaag agtgtctgga  
1801 gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt  
1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcggaag ccaggcccc cctgctgacg tccagactcc  
1921 gttcatccc caagcctgac gggtgcggc cgatttgaa catggactac gtcgtgggag  
1981 ccagaacgtt ccgagagaa aagagggccg agcgtctac ctgaggggtg aaggcactgt  
2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgggc gccccggcct cctgggccc tetgtgctgg  
2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca cctcgtgct gcgtgtcgg gccaggacc  
2161 cggcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatcccc  
2221 aggacaggct cacggaggtc atgccagca tcatcaaacc ccagaacacg tactgcgtgc  
2281 gtcggtatgc cgtggtccag aagggccccc atggcacgt ccgcaaggcc ttaagagcc  
2341 acgtctctac cttgacagac ctccagcct acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg  
2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctctccctg aatgaggcca  
2461 gcagtggcct cttcagctc ttctacgt tcatgtgcca ccacgccgtg cgcacaggg  
2521 gcaagtecta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggtc catcctctcc acgtgctct  
2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc  
2641 tgctcctgcg tttggtgat gatttctgt tggtagacc taacctacc cacgcgaaaa  
2701 cttcctcag gacctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtggtg aacttgcgga  
2761 agacagtggg gaacttcct gtagaagacg aggcctggg tggcacggct tttgtcaga  
2821 tgccggcca cggcctatc cctggtgcg gcctgctgct ggataccgg accctggagg  
2881 tgcagagcga ctactecagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc acctcaacc  
2941 gcggctcaa ggtgaggagg aacatgcgtc gcaaactct tggggtctg cggctgaagt  
3001 gtcacagcct gttctggat ttgaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct  
3061 acaagatcct cctgctcag gcgtacaggt ttcacgatg tgtgctcag ctcccattc  
3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacattt tctgcccgt catctctgac acggcctccc  
3181 tctgctactc catcctgaaa gccagaacg cagggatgtc gctgggggcc aaggcgccc  
3241 ccggcctct gcctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc

3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tctggggtc actcaggaca gccagacgc  
 3361 agctgagtcg gaagetcccc gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg  
 3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc accgcccac agccaggccg  
 3481 agagcagaca ccagcagccc tgtcacgcc ggctctacgt cccagggagg gagggggcggc  
 3541 ccacaccag gcccgaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgagcct  
 3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaaggcg  
 3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcaact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc  
 3721 agggccagct ttctctacc aggagcccgg ctccactcc ccacatagga atagtcacat  
 3781 ccagattcg ccattgtca ccctcgccc tgcctcctt tgcctccac cccaccatc  
 3841 caggtggaga cctgagaag gaccctggga gctctggga tttggagtga ccaaaggtg  
 3901 gcctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg  
 3961 ggaggtgctg tgggagtaaa ataactgaata tatgagttt tcagttttga aaaaaaaaa

4021 aaaaaa (SEQ ID NO: 119)

En un caso, la hTERT es codificada por un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 119. En un caso, la hTERT es codificada por un ácido nucleico de SEQ ID NO: 119.

5

#### Activación y Expansión de Células Efectoras Inmunitarias (p. ej., Células T)

10 Células efectoras inmunitarias tales como las células T pueden activarse y expandirse generalmente utilizando métodos como se describe, p. ej., en las Patentes de EE.UU. 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041 y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20060121005.

15 El procedimiento para la expansión *ex vivo* de células madre y progenitoras hematopoyéticas se describe en la Pat. de EE.UU. N° 5.199.942, y se puede aplicar a las células de la presente divulgación. En la técnica se conocen otros métodos adecuados, por lo tanto, la presente divulgación no se limita a método particular alguno de expansión *ex vivo* de las células. Brevemente, el cultivo *ex vivo* y la expansión de células T pueden comprender: (1) recoger células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero a partir de extracciones de sangre periférica o explantes de médula ósea; y (2) expandir este tipo de células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la Pat. de EE.UU. N° 5.199.942, se pueden utilizar otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, para el cultivo y la expansión de las células.

20

25 Generalmente, una población de células efectoras inmunitarias, p. ej., células agotadas en células T reguladoras, puede expandirse por contacto con una superficie que tiene unido a la misma un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. En particular, poblaciones de células T pueden estimularse tal como se describe en esta memoria, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína quinasa C (p. ej., briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la co-estimulación de una molécula accesoria sobre la superficie de las células T se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Para estimular la proliferación de células T CD4+ o células T CD8+, se pueden utilizar un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Se pueden utilizar ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 que incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besançon, Francia), al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

30

35

40 En determinados aspectos, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para la célula T pueden ser proporcionadas por diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada una de las señales pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando están acoplados a una superficie, los agentes se pueden acoplar a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas (es decir, en formación "trans").

Alternativamente, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En un aspecto, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie de la célula y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinados aspectos, ambos agentes pueden estar en solución. En un aspecto, los agentes pueden estar en forma soluble y luego reticulados a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véanse, p. ej., las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 20040101519 y 20060034810 para células presentadoras de antígenos artificiales (aAPCs) que se contemplan para uso en la activación y expansión de células T en la presente divulgación.

En un aspecto, los dos agentes están inmovilizados en perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o en perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes están co-inmovilizados en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un aspecto, se utiliza una proporción 1:1 de cada uno de los anticuerpos unidos a las perlas para la expansión de las células T CD4+ y el crecimiento de las células T. En determinados aspectos de la presente divulgación, se utiliza una relación de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas de manera que se observe un aumento en la expansión de las células T en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada utilizando una relación de 1:1. En un aspecto, la relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entremedias. En un aspecto, más anticuerpo anti-CD28 está unido a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación CD3:CD28 es menor que uno. En determinados aspectos, la relación de anticuerpo anti-CD28 a anticuerpo anti-CD3 unido a las perlas es mayor que 2:1. En un aspecto particular, se utiliza una relación CD3:CD28 1:100 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 1:75 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto adicional, se utiliza una relación CD3:CD28 1:50 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 1:30 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 1:10 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 1:3 de anticuerpo unido a las perlas. En un aspecto, se utiliza una relación CD3:CD28 3:1 de anticuerpo unido a las perlas.

Pueden utilizarse relaciones de partículas a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio para estimular células T u otras células diana. Como pueden apreciar fácilmente los expertos ordinarios en la técnica, la relación de partículas a células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula diana. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño solo podrían unir unas pocas células, mientras que las perlas más grandes podrían unir muchas. En determinados aspectos, la relación de células a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero intermedio y, en aspectos adicionales, la relación comprende de 1: 9 a 9: 1 y también se puede utilizar cualquier valor entero intermedio para estimular células T. La relación de partículas acopladas anti-CD3 y anti-CD28 a las células T que dan como resultado la estimulación de las células T puede variar como se indicó arriba, sin embargo, determinados valores adecuados incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, y 15:1 siendo una relación preferida de al menos 1:1 de partículas por célula T. En un aspecto, se utiliza una relación de partículas a células de 1:1 o menos. En un aspecto particular, una relación adecuada de partículas:células es 1:5. En aspectos adicionales, la relación de partículas a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, en un aspecto, la relación de partículas a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células todos los días o cada dos días a partir de entonces durante un máximo de 10 días, en las relaciones finales. de 1:1 a 1:10 (basado en el recuento de células el día de la adición). En un aspecto particular, la relación de partículas a células es 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1: 5 el tercer y el quinto día de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y de 1:5 el tercer y el quinto días de estimulación. En un aspecto, la relación de partículas a células es 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y el quinto día de estimulación. En un aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y de 1:10 el tercer y el quinto días de estimulación. Un experto en la técnica apreciará que una diversidad de otras relaciones pueden ser adecuadas para uso en la presente divulgación. En particular, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula. En un aspecto, las relaciones de uso más típicas se encuentran en el entorno de 1:1, 2:1 y 3:1 el primer día.

En aspectos adicionales, las células, tales como las células T, se combinan con perlas recubiertas con agente, las perlas y las células se separan posteriormente y luego se cultivan las células. En un aspecto alternativo, antes del cultivo, las perlas y las células recubiertas con agente no se separan sino que se cultivan juntas. En un aspecto adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, tal como una fuerza magnética, dando como resultado un aumento del ligamiento de los marcadores de la superficie celular, induciendo con ello la estimulación de las células.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (3x28 perlas) entren en contacto con las células T. En un aspecto, las células (por ejemplo,  $10^4$  a  $10^9$  células T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28

T en una relación de 1:1) se combinan en un tampón, por ejemplo, PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos ordinarios en la técnica pueden apreciar fácilmente que se puede utilizar cualquier concentración de células. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo el 0,01% de la muestra o la muestra completa (es decir, el 100%) puede comprender la célula diana de interés. Por consiguiente, cualquier número de célula está dentro del contexto de la presente divulgación. En determinados aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan entre sí partículas y células (es decir, aumenta la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las partículas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de 10 billones de células/ml, 9 billones/ml, 8 billones/ml, 7 billones/ml, 6 billones/ml, 5 billones/ml o 2 billones/ml. En un aspecto, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Todavía en un aspecto, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, pueden utilizarse concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede resultar en un rendimiento incrementado de células, una activación de células y una expansión de células. Además, el uso de altas concentraciones de células permite una captura más eficaz de las células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, tales como las células T CD28-negativas. Poblaciones de células de este tipo pueden tener un valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en determinados aspectos. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En un caso, las células transducidas con un ácido nucleico que codifica un CAR, p. ej., un CAR descrito en esta memoria, se expanden, p. ej., mediante un método descrito en esta memoria. En un caso, las células se expanden en cultivo durante un período de varias horas (p. ej., aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 horas) hasta aproximadamente 14 días (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días). En un caso, las células se expanden durante un período de 4 a 9 días. En un caso, las células se expanden durante un período de 8 días o menos, p. ej., 7, 6 o 5 días. En un caso, las células, p. ej., una célula CAR CD19 descrita en esta memoria, se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes son más potentes que las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. La potencia se puede definir, p. ej., por diversas funciones de las células T, p. ej., proliferación, exterminio de células diana, producción de citoquinas, activación, migración o combinaciones de las mismas. En un caso, las células, p. ej., una célula CAR CD19 descrita en esta memoria, expandidas durante 5 días muestran al menos un aumento de una, dos, tres o cuatro veces en la duplicación de las células tras la estimulación del antígeno en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En un caso, las células, p. ej., las células que expresan una CAR CD19 descritas en esta memoria, se expanden en cultivo durante 5 días, y las células resultantes exhiben una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, p. ej., niveles de IFN- $\gamma$  y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días en las mismas condiciones de cultivo. En un caso, las células, p. ej., una célula CAR CD19 descrita en esta memoria, expandida durante 5 días, muestran al menos un aumento de una, dos, tres, cuatro, cinco, diez veces o más en pg/ml de producción de citoquinas proinflamatorias, p. ej., niveles de IFN- $\gamma$  y/o GM-CSF, en comparación con las mismas células expandidas en cultivo durante 9 días bajo las mismas condiciones de cultivo.

También se pueden desear varios ciclos de estimulación, de modo que el tiempo de cultivo de las células T pueda ser de 60 días o más. Condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (p. ej., Medio Esencial Mínimo o Medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluido suero (p. ej., suero bovino o humano fetal), interleuquina-2 (IL-2), insulina, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  y TNF- $\alpha$  o cualesquiera otros aditivos para el crecimiento de células conocidos por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a tensioactivo, plasmanato y agentes reductores, tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea exentas de suero o complementadas con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citoquina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de células T. Antibióticos, p. ej., penicilina y estreptomocina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se han de infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura (p. ej., 37°C) y una atmósfera (p. ej., aire más 5% de CO<sub>2</sub>) apropiadas.

En un caso, las células se expanden en un medio apropiado (p. ej., medio descrito en esta memoria) que incluye una o más interleuquinas que dan como resultado un aumento de al menos 200 veces (p. ej., 200 veces, 250 veces, 300 veces, 350 veces) en las células durante un período de expansión de 14 días, p. ej., medido por un método descrito en esta memoria tal como citometría de flujo. En un caso, las células se expanden en presencia de IL-15 y/o IL-7 (p. ej., IL-15 e IL-7).

En casos, métodos descritos en esta memoria, p. ej., métodos de fabricación de células que expresan CAR, comprenden eliminar las células T reguladoras, p. ej., las células T CD25+, de una población celular, p. ej., utilizando un anticuerpo anti-CD25, o un fragmento del mismo, o un ligando de unión a CD25, IL-2. En esta memoria se describen métodos para eliminar células T reguladoras, p. ej., células T CD25+, de una población de células. En casos, los

métodos, p. ej., métodos de fabricación, comprenden, además, poner en contacto una población de células (p. ej., una población de células en la que las células T reguladoras, tales como células T CD25+, se han agotado; o una población de células que se ha puesto en contacto previamente con un anticuerpo anti-CD25, fragmento del mismo o ligando de unión a CD25) con IL-15 y/o IL-7. Por ejemplo, la población de células (p. ej., que ha contactado previamente con un anticuerpo anti-CD25, fragmento del mismo o ligando de unión a CD25) se expande en presencia de IL-15 y/o IL-7.

En algunos casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido de interleuquina-15 (IL-15), un polipéptido del receptor alfa de interleuquina-15 (IL-15Ra) o una combinación de ambos polipéptidos de IL-15. y un polipéptido de IL-15Ra, p. ej., hetIL-15, durante la fabricación de la célula que expresa CAR, p. ej., ex vivo. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, p. ej., ex vivo. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se pone en contacto con una composición que comprende una combinación tanto de un polipéptido IL-15 como de un polipéptido IL-15 Ra durante la fabricación de la célula que expresa CAR, p. ej., ex vivo. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se pone en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la fabricación de la célula que expresa CAR, p. ej., ex vivo.

En un caso, la célula que expresa CAR descrita en esta memoria se pone en contacto con una composición que comprende hetIL-15 durante la expansión ex vivo. En un caso, la célula que expresa CAR descrita en esta memoria se pone en contacto con una composición que comprende un polipéptido IL-15 durante la expansión ex vivo. En un caso, la célula que expresa CAR descrita en esta memoria se pone en contacto con una composición que comprende tanto un polipéptido de IL-15 como un polipéptido de IL-15Ra durante la expansión ex vivo. En un caso, el contacto da como resultado la supervivencia y proliferación de una subpoblación de linfocitos, p. ej., células T CD8+.

Las células T que han estado expuestas a tiempos de estimulación variados pueden presentar diferentes características. Por ejemplo, productos de células mononucleares de la sangre típica o de la sangre periférica con aféresis tienen una población de células T auxiliares (TH, CD4+) que es mayor que la población de células T citotóxicas o supresoras (TC, CD8+). La expansión ex vivo de células T mediante la estimulación de receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en células TH, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de células T comprende una población cada vez mayor. de células TC. Por consiguiente, dependiendo del propósito del tratamiento, puede ser ventajoso infundir a un sujeto una población de células T que comprenda predominantemente células TH. De manera similar, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de células TC, puede ser beneficioso expandir este subconjunto en mayor grado.

Además, en adición a los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de forma reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, una reproducibilidad de este tipo permite la capacidad de adaptar un producto de células T activadas para fines específicos.

En otros casos, el método de producción descrito en esta memoria comprende, además, poner en contacto la población de células efectoras inmunitarias con un ácido nucleico que codifica una subunidad de telomerasa, p. ej., hTERT. El ácido nucleico que codifica la subunidad de telomerasa puede ser ADN.

En algunos casos, se añade un inhibidor de BTK tal como se describe en esta memoria, p. ej., un compuesto de fórmula (I) durante el procedimiento de fabricación de células CAR. De acuerdo con la teoría no limitante en esta memoria, el inhibidor de BTK puede mejorar la calidad de la población de células producidas. Por ejemplo, las células que expresan CAR se producen a menudo a partir de la propia muestra de aféresis de plasma de un paciente de cáncer, que puede contener células cancerosas, y el inhibidor de BTK puede alterar la señalización en las células cancerosas (p. ej., un cáncer que expresa BTK, tal como CLL o MCL), p. ej., reduciendo su proliferación o aumentando los niveles de apoptosis. Como otro ejemplo, el inhibidor de BTK puede alterar la señalización en las células que expresan CAR (o células efectoras inmunitarias antes de que expresen CAR), p. ej., inhibiendo ITK en las células T. El inhibidor de BTK puede desplazar el equilibrio de las células T de células TH2 hacia células TH1.

El inhibidor de BTK, tal como un compuesto de fórmula (I), se puede añadir a la mezcla de reacción en un nivel suficiente para inhibir su diana, p. ej., BTK. En algunos casos, el inhibidor de BTK se añade a una concentración de aproximadamente 0,1-0,2, 0,2-0,5, 0,5-1, 1-2, 2-5 o 5-10  $\mu\text{M}$ . En algunos casos, el inhibidor de BTK es un inhibidor covalente y un pulso corto es suficiente para inactivar irreversiblemente la diana al tiempo que se evita la toxicidad inespecífica. En consecuencia, el inhibidor de BTK se puede añadir durante, p. ej., 10-20, 20-30, 30-40, 40-60 o 60-120 minutos. El inhibidor de BTK también se puede añadir durante períodos de tiempo más prolongados, por ejemplo, si el inhibidor de BTK tiene un modo de acción no covalente. Por lo tanto, el inhibidor de BTK se puede añadir durante, p. ej., 2-4, 4-6, 6-8, 8-12, 12-18 o 18-24 horas, o durante 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-8, 8-10 días, o durante todo el tiempo que se estén cultivando las células. El inhibidor de BTK se puede añadir en varios momentos durante el procedimiento de fabricación, p. ej., después de recolectar las células, antes de estimular con perlas, después de estimular con perlas, antes de la transducción, después de la transducción o antes de la administración de las células al paciente.

En algunos casos, el inhibidor de BTK se añade después de recoger las células o antes de estimular, p. ej., con perlas. Antes y después, en este contexto, puede referirse a, p. ej., aproximadamente 1, 5, 15, 30, 45 o 60 minutos antes o después, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas antes o después.

5 Una vez que se construye un CAR CD19, se pueden utilizar diversos ensayos para evaluar la actividad de la molécula, tal como, pero no limitados a la capacidad de expandir células T después de la estimulación del antígeno, mantener la expansión de las células T en ausencia de re-estimulación y actividades anticancerígenas en modelos *in vitro* y en animales apropiados. Los ensayos para evaluar los efectos de un CAR CD19 se describen con más detalle más adelante

10 El análisis de transferencia Western de la expresión de CAR en células T primarias puede utilizarse para detectar la presencia de monómeros y dímeros. Véase, p. ej., Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453- 1464 (2009). Muy brevemente, las células T (mezcla 1:1 de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) que expresan los CARs se expanden *in vitro* durante más de 10 días seguido de lisis y SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Los CARs que contienen el dominio citoplásmico TCR- $\zeta$  de longitud completa y la cadena TCR- $\zeta$  endógena se detectan mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo contra la cadena TCR- $\zeta$ . Los mismos subconjuntos de células T se utilizan para el análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras para permitir la evaluación de la formación de dímeros covalentes.

15 La expansión *in vitro* de las células T CAR<sup>+</sup> después de la estimulación del antígeno puede medirse mediante citometría de flujo. Por ejemplo, una mezcla de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> es estimulada con perlas CD3/ $\alpha$ CD28, seguido de la transducción con vectores lentivirales que expresan GFP bajo el control de los promotores a ser analizados. Promotores ejemplares incluyen los promotores del gen IE de CMV, EF-1 $\alpha$ , ubiquitina C o fosfogliceroquinasa (PGK). La fluorescencia de GFP se evalúa el día 6 de cultivo en los subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo. Véase, p. ej., Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453- 1464 (2009). Alternativamente, una mezcla de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> es estimulada con perlas magnéticas recubiertas de  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 el día 0 y se transduce con CAR el día 1 utilizando un vector lentiviral bicistrónico que expresa CAR junto con eGFP utilizando una secuencia de salto ribosómico 2A. Los cultivos se vuelven a estimular con células K562 CD19<sup>+</sup> (K562-CD19), células K562 de tipo salvaje (K562 de tipo salvaje) o células K562 que expresan hCD32 y 4-1BBL en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (K562-BBL-3/28) después del lavado. Se añade IL-2 exógena a los cultivos cada dos días a razón de 100 U/ml. Las células T GFP<sup>+</sup> se enumeran mediante citometría de flujo utilizando un recuento basado en perlas. Véase, p. ej., Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453- 1464 (2009).

20 También se puede medir la expansión sostenida de células T CAR<sup>+</sup> en ausencia de re-estimulación. Véase, p. ej., Milone *et al.*, *Molecular Therapy* 17(8): 1453- 1464 (2009). Brevemente, el volumen medio de células T (fl) se mide el día 8 de cultivo utilizando un contador de partículas Coulter Multisizer, un Cellometer Vision de Nexcelom o un Scepter de Millipore, después de la estimulación con perlas magnéticas recubiertas con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 el día 0, y la transducción con el CAR indicado el día 1.

25 Los modelos con animales también se pueden utilizar para medir la actividad de una célula que expresa CAR, p. ej., tal como se describe en el párrafo 698 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015. La respuesta al tratamiento con CAR dependiente de la dosis se puede evaluar, p. ej., tal como se describe en el párrafo 699 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

30 La evaluación de la proliferación celular y la producción de citoquinas se ha descrito previamente, p. ej., como se describe en el párrafo 700 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

35 La citotoxicidad se puede evaluar mediante un ensayo estándar de liberación de <sup>51</sup>Cr, p. ej., como se describe en el párrafo 701 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

40 Tecnologías de formación de imágenes se pueden utilizar para evaluar el tráfico específico y la proliferación de CARs en modelos animales portadores de tumores, p. ej., tal como se describe en el párrafo 702 de la Solicitud internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

45 También se pueden utilizar otros ensayos, incluidos los descritos en la sección de Ejemplos de esta memoria, así como los que se conocen en la técnica, para evaluar las construcciones CAR de CD19 de la divulgación.

50 Alternativamente, o en combinación con los métodos descritos en esta memoria, métodos y composiciones para uno o más de: detección y/o cuantificación de células que expresan CAR (p. ej., *in vitro* o *in vivo* (p. ej., monitorización clínica)); expansión y/o activación de células inmunes; y/o selección específica para el CAR, que implica el uso de un ligando de CAR. En un caso ejemplar, el ligando de CAR es un anticuerpo que se une a la molécula de CAR, p. ej., se une al dominio de unión al antígeno extracelular de CAR (p. ej., un anticuerpo que se une al dominio de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo anti-idiotípico; o un anticuerpo que se une a una región constante del dominio de unión extracelular). En otros casos, el ligando de CAR es una molécula de antígeno CAR (p. ej., una molécula de antígeno CAR tal como se describe en esta memoria).

En un aspecto, se describe un método para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR. Por ejemplo, el ligando de CAR puede utilizarse para detectar y/o cuantificar células que expresan CAR in vitro o in vivo (p. ej., monitorización clínica de células que expresan CAR en un paciente o dosificación a un paciente). El método incluye:

5 proporcionar el ligando de CAR (opcionalmente, un ligando de CAR marcado, p. ej., un ligando de CAR que incluye una etiqueta, una perla, un marcador radiactivo o fluorescente);  
 adquirir la célula que expresa CAR (p. ej., adquirir una muestra que contiene células que expresan CAR, tal como una muestra de fabricación o una muestra clínica);  
 10 poner en contacto la célula que expresa CAR con el ligando de CAR en condiciones en las que se produzca la unión, detectando así el nivel (p. ej., la cantidad) de células que expresan CAR presentes. La unión de la célula que expresa CAR con el ligando de CAR puede detectarse utilizando técnicas estándares tales como FACS, ELISA y similares.

En otro aspecto, se describe un método para expandir y/o activar células (p. ej., células efectoras inmunitarias). El método incluye:

15 proporcionar una célula que expresa CAR (p. ej., una primera célula que expresa CAR o una célula que expresa CAR transitoriamente);  
 poner en contacto dicha célula que expresa CAR con un ligando de CAR, p. ej., un ligando de CAR tal como se describe en esta memoria), en condiciones en las que se produce la expansión y/o proliferación de células inmunitarias, produciendo con ello la población de células activada y/o expandida.

20 En determinados casos, el ligando de CAR está presente en un sustrato (p. ej., está inmovilizado o fijado a un sustrato, p. ej., un sustrato que se produce de forma no natural). En algunos casos, el sustrato es un sustrato no celular. El sustrato no celular puede ser un soporte sólido elegido de, p. ej., una placa (p. ej., una placa de microtitulación), una membrana (p. ej., una membrana de nitrocelulosa), una matriz, un chip o una perla. En casos, el ligando de CAR está presente en el sustrato (p. ej., en la superficie del sustrato). El ligando de CAR puede inmovilizarse, unirse o asociarse de forma covalente o no covalente (p. ej., reticularse) al sustrato. En un caso, el ligando de CAR está fijado (p. ej., fijado de forma covalente) a una perla. En los casos mencionados anteriormente, la población de células inmunitarias puede expandirse in vitro o ex vivo. El método puede incluir, además, cultivar la población de células inmunitarias en presencia del ligando de la molécula de CAR, p. ej., utilizando cualesquiera de los métodos descritos en esta memoria.

25 En otros casos, el método para expandir y/o activar las células comprende, además, la adición de una segunda molécula estimulante, p. ej., CD28. Por ejemplo, el ligando de CAR y la segunda molécula estimulante pueden inmovilizarse en un sustrato, p. ej., una o más perlas, proporcionando con ello una mayor expansión y/o activación celular.

35 En aún otro aspecto, se proporciona un método para seleccionar o enriquecer una célula que expresa CAR. El método incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando de CAR tal como se describe en esta memoria; y seleccionar la célula basándose en la unión del ligando de CAR.

40 En aún otros casos, se proporciona un método para agotar, reducir y/o matar una célula que expresa CAR. El método incluye poner en contacto la célula que expresa CAR con un ligando de CAR tal como se describe en esta memoria; y fijar como objetivo la célula sobre la base de la unión del ligando de CAR, reduciendo con ello el número y/o exterminando la célula que expresa CAR. En un caso, el ligando de CAR se acopla a un agente tóxico (p. ej., una toxina o un fármaco ablativo celular). En otro caso, el anticuerpo anti-idiotípico puede provocar actividad de células efectoras, p. ej., actividades ADCC o ADC.

45 Anticuerpos anti-CAR ejemplares que se pueden utilizar en los métodos descritos en esta memoria se describen, p. ej., en el documento WO 2014/190273 y por Jena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS marzo 2013 8:3 e57838.

50 En algunos aspectos e instancias, las composiciones y los métodos de esta memoria están optimizados para un subconjunto específico de células T, p. ej., tal como se describe en la solicitud de EE.UU. N° de serie PCT/US2015/043219 presentado el 31 de julio de 2015. En algunos casos, los subconjuntos optimizados de células T exhiben una persistencia potenciada en comparación con una célula T de control, p. ej., una célula T de un tipo diferente (p. ej., CD8+ o CD4+) que expresa la misma construcción.

55 En algunos casos, una célula T CD4+ comprende un CAR descrito en esta memoria, CAR que comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (p. ej., optimizado para, p. ej., que conduce a una persistencia potenciada en) una célula T CD4+, p. ej., un dominio ICOS. En algunos casos, una célula T CD8+ comprende un CAR descrito en esta memoria, CAR que comprende un dominio de señalización intracelular adecuado para (p. ej., optimizado para, p. ej., que conduce a una persistencia potenciada de) una célula T CD8+, p. ej., un dominio 4-1BB, un dominio CD28 u otro dominio coestimulador distinto de un dominio ICOS. En algunos casos, el CAR descrito en esta memoria comprende un dominio de unión a antígeno descrito en esta memoria, p. ej., un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno.

En un aspecto, en esta memoria se describe un método para tratar a un sujeto, p. ej., un sujeto que tiene cáncer. El método incluye administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de:

1) una célula T CD4+ que comprende un CAR (el CAR CD4+), que comprende:

5 un dominio de unión a antígeno, p. ej., un dominio de unión a antígeno descrito en esta memoria;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, p. ej., un primer dominio coestimulador, p. ej., un dominio ICOS; y

2) una célula T CD8+ que comprende un CAR (el CAR CD8+), que comprende:

10 un dominio de unión a antígeno, p. ej., un dominio de unión a antígeno descrito en esta memoria;

un dominio transmembrana; y

un dominio de señalización intracelular, p. ej., un segundo dominio coestimulador, p. ej., un dominio 4-1BB, un dominio CD28 u otro dominio coestimulador distinto de un dominio ICOS;

en donde el CAR CD4+ y el CAR CD8+ difieren entre sí.

15 Opcionalmente, el método incluye, además, administrar:

3) una segunda célula T CD8+ que comprende un CAR (el segundo CAR CD8+) que comprende:

un dominio de unión a antígeno, p. ej., un dominio de unión a antígeno descrito en esta memoria;

un dominio transmembrana; y

20 un dominio de señalización intracelular, en donde el segundo CAR CD8+ comprende un dominio de señalización intracelular, p. ej., un dominio de señalización coestimulador, no presente en el CAR CD8+ y, opcionalmente, no comprende un dominio de señalización ICOS.

Cualquiera de los métodos descritos en esta memoria puede incluir, además, la administración de un inhibidor de BTK tal como se describe en esta memoria.

25

#### Métodos de suministro de biopolímeros

En algunos casos, una o más células que expresan CAR tal como se describen en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), pueden administrarse o suministrarse al sujeto a través de un armazón de biopolímero, p. ej., un implante de biopolímero. Los armazones de biopolímero pueden soportar o potenciar el suministro, la expansión y/o la dispersión de las células que expresan CAR descritas en esta memoria. Un armazón de biopolímero comprende un polímero biocompatible (p. ej., no induce sustancialmente una respuesta inflamatoria o inmune) y/o un polímero biodegradable que se puede producir de forma natural o sintética. Se describen biopolímeros ejemplares, p. ej., en los párrafos 1004-1006 de la Solicitud Internacional WO2015/142675, presentada el 13 de marzo de 2015.

35

#### Métodos de Fabricación/Producción

En algunos casos, los métodos descritos en esta memoria incluyen, además, la administración de un agente que agota las células T después del tratamiento con la célula (p. ej., una célula efectora inmunitaria tal como se describe en esta memoria, p. ej., una célula efectora inmunitaria que expresa CAR descrita en esta memoria), reduciendo así (p. ej., agotando) las células que expresan CAR (p. ej., las células que expresan CD19CAR). Agentes de agotamiento de células T de este tipo pueden utilizarse eficazmente para agotar células que expresan CAR (p. ej., células que expresan CD19CAR) para mitigar la toxicidad. En algunos casos, las células que expresan CAR se fabricaron de acuerdo con un método de esta memoria, p. ej., ensayadas (p. ej., antes o después de la transfección o transducción) de acuerdo con un método de esta memoria.

45

En algunos casos, el agente de agotamiento de células T se administra una, dos, tres, cuatro o cinco semanas después de la administración de la célula, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias descritas en esta memoria.

50

En un caso, el agente de agotamiento de células T es un agente que agota las células que expresan CAR, p. ej., induciendo citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o muerte celular inducida por complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en esta memoria también pueden expresar un antígeno (p. ej., un antígeno diana) que es reconocido por moléculas capaces de inducir la muerte celular, p. ej., ADCC o muerte celular inducida por el complemento. Por ejemplo, las células que expresan CAR descritas en esta memoria también pueden expresar una proteína diana (p. ej., un receptor) capaz de ser fijada como objetivo por un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Ejemplos de proteínas diana de este tipo incluyen, pero no se limitan a, EpCAM, VEGFR, integrinas (p. ej., integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha4$ ,  $\alpha13 / 4\beta3$ ,  $\alpha4\beta7$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\nu$ ), miembros de la superfamilia de receptores de TNF (p. ej., TRAIL- R1, TRAIL-R2), receptor de PDGF, receptor de interferón, receptor de folato, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, IL-6 receptor, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/IgE receptor, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigina, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7, y EGFR, y versiones truncadas de los mismos (p. ej., versiones que conservan uno o más epítopos extracelulares, pero que carecen de una o más regiones dentro del dominio citoplasmático).

60

5 En algunos casos, la célula que expresa CAR co-expresa el CAR y la proteína diana, p. ej., expresa de forma natural la proteína diana o está diseñada para expresar la proteína diana. Por ejemplo, la célula, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias, puede incluir un ácido nucleico (p. ej., vector) que comprende el ácido nucleico CAR (p. ej., un ácido nucleico CAR tal como se describe en esta memoria) y un ácido nucleico que codifica la proteína diana.

En un caso, el agente de agotamiento de células T es un inhibidor de CD52, p. ej., una molécula de anticuerpo anti-CD52, p.ej., alemtuzumab.

10 En otros casos, la célula, p. ej., la población de células efectoras inmunitarias, expresa una molécula de CAR tal como se describe en esta memoria (p. ej., CD19CAR) y la proteína diana reconocida por el agente de agotamiento de células T. En un caso, la proteína diana es CD20. En casos, la proteína diana es CD20 y el agente de agotamiento de células T es un anticuerpo anti-CD20, p. ej., rituximab.

15 En casos adicionales de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, los métodos incluyen, además, trasplantar una célula, p. ej., una célula madre hematopoyética, o una médula ósea, en el mamífero. En otro aspecto, la divulgación presenta un método de acondicionamiento de un mamífero antes del trasplante de células. El método incluye administrar al mamífero una cantidad eficaz de la célula que comprende un ácido nucleico o polipéptido CAR, p. ej., un ácido nucleico o polipéptido CAR CD19. En algunos casos, el trasplante de células es un trasplante de células madre, p. ej., un trasplante de células madre hematopoyéticas o un trasplante de médula ósea. En otros casos, acondicionar a un sujeto antes del trasplante de células incluye reducir el número de células que expresan la diana en un sujeto, p. ej., células normales que expresan CD19 o células cancerosas que expresan CD19.

#### **Inhibidor de BTK**

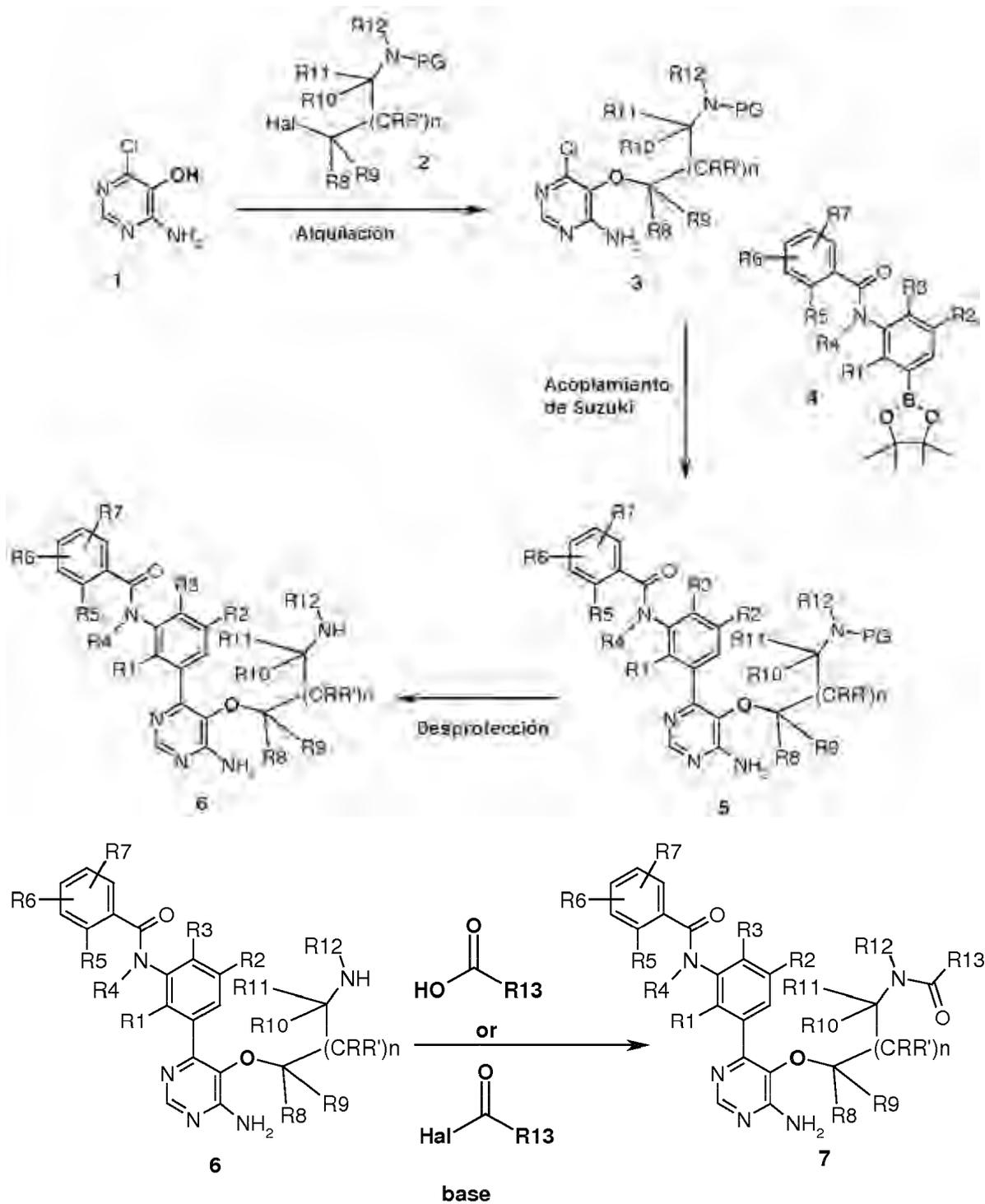
25 En algunas realizaciones, el inhibidor de BTK es un compuesto de fórmula (I) tal como se describe en esta memoria, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Aunque a muchos de los compuestos de esta memoria, p. ej., compuestos de fórmula (I), se les alude a menudo como inhibidores de BTK, se entiende que, en algunos contextos, un compuesto de fórmula (I) puede tener una o más actividades distintas de la inhibición de BTK. Por ejemplo, en algunos casos la actividad relevante es la inhibición de una quinasa con homología con BTK, tal como ITK. Esta actividad no inhibidora de BTK puede ser adicional a o en lugar de una actividad de inhibición de BTK.

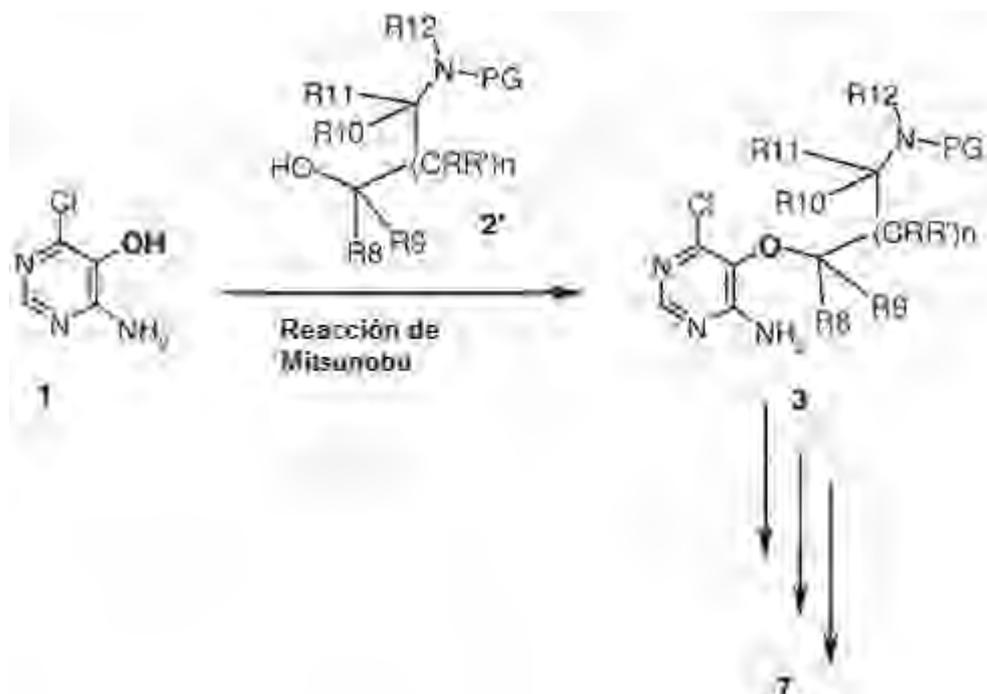
35 Métodos de sintetizar Aminopirimidinas

Agentes de la divulgación, es decir, compuestos de acuerdo con la definición de fórmula (I), pueden prepararse mediante una secuencia de reacción que implica una alquilación de 4-amino-6-cloro-pirimidin-5-ol 1 con un haluro de alquilo (2) utilizando una base apropiada, acoplamiento de Suzuki con un éster borónico (4) utilizando un catalizador de paladio apropiado, tal como dicloruro de bis(trifenilfosfina)-paladio(II), desprotección utilizando un ácido apropiado, tal como TFA o HCl para formar el compuesto intermedio (6), seguido de la formación de amida de la sal de amonio o la amina libre con un ácido utilizando un reactivo de acoplamiento apropiado, tal como T3P, y una base apropiada, tal como DIPEA, o con un cloruro de ácido utilizando una base apropiada, tal como DIPEA, para proporcionar el compuesto (7) como se muestra en el **Esquema 1** que figura a continuación:

Esquema 1:



- 5 Compuestos de la divulgación también se pueden preparar mediante una secuencia de reacción alternativa (mostrada más adelante) que comprende las etapas de hacer reaccionar la amino hidroxipirimidina 1 con el derivado de hidroxilo amino-alkilo 2' en una reacción de Mitsunobu para proporcionar el compuesto intermedio 3, compuesto intermedio 3 que luego se hace reaccionar mediante un acoplamiento de Suzuki para producir el compuesto intermedio 5, que luego se desprotege para producir el compuesto intermedio 6, que luego se amida con un ácido o cloruro de ácido para producir el producto final 7 como ya se describió en el esquema 1.
- 10



Abreviaturas:

BISPIN:	Bis(pinacolato)diboro
Boc:	t-butiloxycarbonilo
DCE:	Dicloroetano
DCM:	Diclorometano
DIAD:	Azodicarboxilato de diisopropilo
DIPEA:	<i>N</i> -diisopropiletilamina
DME:	1,2-dimetoxietano
DMF:	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EtOAc:	Acetato de etilo
EtOH:	Etanol
h:	Hora
M:	Molar
MeOH:	Metanol
min:	Minuto
NaHMDS:	Bis(trimetilsilil)amida de sodio
tr:	Tiempo de retención
TA:	Temperatura ambiente
SFC:	Cromatografía de fluido supercrítico
Smopex-301:	Trifenilfosfina soportada con polímero
SPE:	Extracción en fase sólida
TBAF:	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDPS:	<i>terc.</i> -butildifilsililo
TBHP:	Hidroperóxido de <i>terc.</i> -butilo
TBME:	<i>terc.</i> -butil metil éter
TEA:	Trietilamina
TFA:	Ácido trifluoroacético
THF:	Tetrahidrofurano
T3P:	Anhídrido propilfosfónico
XPhos:	2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-trisisopropilbifenilo

5 Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN se registraron en un espectrómetro de RMN Bruker de 400 Mhz. Los picos significativos se tabulan en el orden: multiplicidad (s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuartete; m, multiplete; br, ancho; v, muy) y número de protones. Los espectros de masas de ionización por electropulverización (ESI) se registraron en un espectrómetro de masas Waters Acquity SQD. Los resultados de la espectrometría de masas se reseñan como la relación entre la masa y la carga.

10 Método UPLC-MS.

Instrumento Waters Acquity UPLC equipado con detector PDA, espectrómetro de masas Waters Acquity SQD y columna Waters Acquity HSS T3 1,8  $\mu\text{m}$  2,1 x 50 mm. La detección de picos se reseña en un barrido completo de 210-450 nM. Los resultados de la espectrometría de masas se reseñan como la relación entre la masa y la carga.

5 Eluyente A: Agua + ácido fórmico al 0,05% + acetato de amonio 3,75 mM.

Eluyente B: Acetonitrilo + ácido fórmico al 0,04%.

Caudal: 1 mL/min

10 El gradiente puede ser, por ejemplo: En un tiempo de 0,00 minutos, porcentaje de eluyente A = 95% y porcentaje de eluyente B = 5%; en el tiempo de 1,40 minutos, porcentaje de Eluyente A = 2% y porcentaje de Eluyente B = 98%; en el tiempo de 1,80 minutos, porcentaje de Eluyente A = 2% y porcentaje de Eluyente B = 98%; en el tiempo de 1,90 minutos, porcentaje de eluyente A = 95% y porcentaje de eluyente B = 5%; y en el tiempo de 2,00 minutos, porcentaje de eluyente A = 95% y porcentaje de eluyente B = 5%.

### 15 *Formas marcadas isotópicamente*

Cualquier fórmula dada en esta memoria también pretende representar formas no marcadas, así como formas marcadas isotópicamente de los compuestos. Compuestos isotópicamente marcados tienen estructuras representadas por las fórmulas dadas en esta memoria, excepto que uno o más átomos están reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número másico seleccionado. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la divulgación incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{125}\text{I}$ , respectivamente. La divulgación incluye diversos compuestos marcados isotópicamente tal como se definen en esta memoria, p. ej., aquellos en los que están presentes isótopos radiactivos, tales como  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , o aquellos en los que están presentes isótopos no radiactivos, tales como  $^2\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Compuestos marcados isotópicamente de este tipo son útiles en estudios metabólicos (con  $^{14}\text{C}$ ), estudios cinéticos de reacción (con, por ejemplo,  $^2\text{H}$  o  $^3\text{H}$ ), técnicas de detección o de formación de imágenes, tales como la tomografía por emisión de positrones (PET) o la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), incluyendo ensayos de distribución de tejido de sustrato o fármaco, o en el tratamiento radiactivo de pacientes. En particular, un compuesto marcado con  $^{18}\text{F}$  puede ser particularmente deseable para estudios de PET o SPECT.

30 Compuestos de fórmula (I) marcados con isótopos se pueden preparar, generalmente, mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o por procedimientos análogos a los descritos en los Ejemplos y Preparaciones que se acompañan, utilizando un reactivo apropiado marcado isotópicamente en lugar del reactivo no marcado previamente empleado.

35 Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir,  $^2\text{H}$  o D) puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, p. ej., una semivida in vivo incrementada o requisitos de dosificación reducidos o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera un sustituyente de un compuesto de fórmula (I). La concentración de un isótopo más pesado, específicamente deuterio, puede definirse por el factor de enriquecimiento isotópico. La expresión "factor de enriquecimiento isotópico", tal como se utiliza en esta memoria, significa la relación entre la abundancia isotópica y la abundancia natural de un isótopo especificado. Si un sustituyente en un compuesto de esta divulgación se designa deuterio, un compuesto de este tipo tiene un factor de enriquecimiento isotópico para cada uno de los átomos de deuterio designados de al menos 3500 (52,5% de incorporación de deuterio en cada uno de los átomos de deuterio designados), al menos 4000 (60% de incorporación de deuterio), al menos 4500 (67,5% de incorporación de deuterio), al menos 5000 (75% de incorporación de deuterio), al menos 5500 (82,5% de incorporación de deuterio), al menos 6000 (90% de incorporación de deuterio), al menos 6333,3 (95% de incorporación de deuterio), al menos 6466,7 (97% de incorporación de deuterio), al menos 6600 (99% de incorporación de deuterio) o al menos 6633,3 (99,5% de incorporación de deuterio).

50 Solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquellos en los que el disolvente de cristalización puede estar isotópicamente sustituido, p. ej.  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{d}_6$ -acetona,  $\text{d}_6$ -DMSO.

### *Solvatos, Hidratos, Polimorfos, Cristalización*

55 Los compuestos de la presente divulgación, incluyendo sus sales, también se pueden obtener en forma de sus hidratos, o pueden incluir otros disolventes utilizados para su cristalización. Los compuestos de la presente divulgación pueden inherentemente o por diseño formar solvatos con disolventes farmacéuticamente aceptables (incluyendo agua); por lo tanto, se pretende que la divulgación abarque formas tanto solvatadas como no solvatadas. El término "solvato" se refiere a un complejo molecular de un compuesto de la presente divulgación (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables del mismo) con una o más moléculas de disolvente. Moléculas de disolvente de este tipo son las que se utilizan comúnmente en la técnica farmacéutica, que se sabe que son inocuas para el receptor, p. ej., agua, etanol y similares. El término "hidrato" se refiere al complejo en el que la molécula de disolvente es agua.

Los compuestos de la presente divulgación, incluyendo sales, hidratos y solvatos de los mismos, pueden inherentemente o por diseño formar polimorfos.

5 Compuestos de la divulgación, es decir, compuestos de fórmula (I) que contienen grupos capaces de actuar como donantes y/o aceptores de enlaces hidrógeno, pueden ser capaces de formar co-cristales con formadores de co-cristales adecuados. Estos co-cristales se pueden preparar a partir de compuestos de fórmula (I) mediante procesos conocidos de formación de co-cristales. Procesos de este tipo incluyen triturar, calentar, co-sublimar, co-fundir o poner en contacto en solución compuestos de fórmula (I) con el formador de co-cristales en condiciones de cristalización y aislar co-cristales así formados. Formadores de co-cristales adecuados incluyen los descritos en el documento WO  
10 2004/078163. Por lo tanto, la divulgación proporciona, además, co-cristales que comprenden un compuesto de fórmula (I).

#### Quiralidad

15 Cualquier átomo asimétrico (p. ej., carbono o similar) del o de los compuestos de la presente divulgación puede estar presente en forma racémica o enriquecida en los enantiómeros, p. ej. la configuración (R), (S) o (R,S). En determinadas realizaciones, cada uno de los átomos asimétricos tiene al menos 50% de exceso enantiomérico, al menos 60% de exceso enantiomérico, al menos 70% de exceso enantiomérico, al menos 80% de exceso enantiomérico, al menos 90% de exceso enantiomérico, al menos 95% de exceso enantiomérico, o al menos 99% de exceso enantiomérico en la configuración (R) o (S). Los sustituyentes de átomos con dobles enlaces insaturados pueden, si es posible, estar presentes en forma *cis*-(Z) o *trans*-(E).

20 Por consiguiente, tal se utiliza en esta memoria, un compuesto de la presente divulgación puede estar en forma de uno de los posibles isómeros, rotámeros, atropisómeros, tautómeros o mezclas de los mismos, p. ej., como isómeros geométricos (*cis* o *trans*) sustancialmente puros, diastereómeros, isómeros ópticos. (antípodos), racematos o mezclas de los mismos

25 Cualquier mezcla resultante de isómeros puede separarse sobre la base de las diferencias fisico-químicas de los constituyentes, en isómeros, diastereómeros, racematos geométricos u ópticos puros o sustancialmente puros, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada.

30 Cualquier racemato resultante de productos finales o intermedios puede resolverse en los antípodos ópticos por métodos conocidos, p. ej., por separación de sus sales diastereoméricas, obtenidas con un ácido o base ópticamente activo, y liberando el compuesto ácido o básico ópticamente activo. En particular, se puede emplear un resto básico para resolver los compuestos de la presente divulgación en sus antípodos ópticas, p. ej., mediante cristalización fraccionada de una sal formada con un ácido ópticamente activo, p. ej., ácido tartárico, ácido dibenzoil tartárico, ácido diacetil tartárico, ácido di-O,*O'*-*p*-toluolil tartárico, ácido mandélico, ácido málico o ácido alcanfor-10-sulfónico. Los productos racémicos también pueden resolverse mediante cromatografía quiral, p. ej., cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un adsorbente quiral.

35 40

#### Sales

45 Sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables se pueden formar con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, p. ej., acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/hidrobromuro, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, canforsulfonato, cloruro/hidrocloreuro, cloroteofilonato, citrato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno-fosfato/dihidrógeno-fosfato, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

50 Los ácidos inorgánicos de los que se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares.

55 Ácidos orgánicos de los que se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido, metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido sulfosalicílico y similares. Se pueden formar sales por adición de bases farmacéuticamente aceptables con bases orgánicas e inorgánicas.

60 Bases inorgánicas de las que se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, sales de amonio y metales de las columnas I a XII de la Tabla Periódica. En determinadas realizaciones, las sales se derivan de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc y cobre; sales particularmente adecuadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

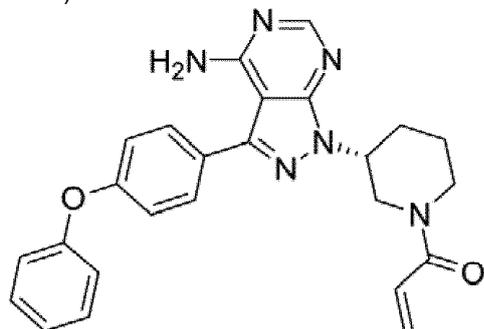
Bases orgánicas de las que se pueden derivar sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas que se producen de forma natural, aminas cíclicas, resinas de intercambio iónico de carácter básico y similares. Determinadas aminas orgánicas incluyen isopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación se pueden sintetizar a partir de un resto de carácter básico o de carácter ácido, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, sales de este tipo se pueden preparar haciendo reaccionar formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg o K, o similares), o haciendo reaccionar formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Reacciones de este tipo se llevan a cabo típicamente en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, es deseable el uso de medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo, cuando sea posible. Se pueden encontrar listas de sales adecuadas adicionales, p. ej., en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

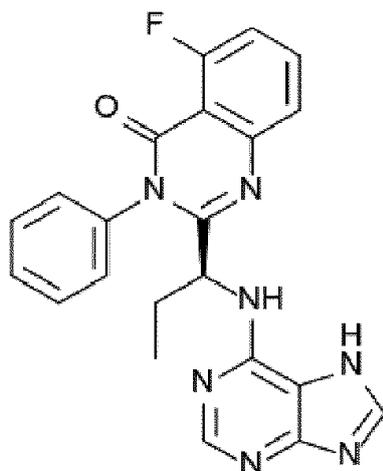
En una realización, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de BTK seleccionado de ibrutinib (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13. En una realización, el inhibidor de BTK no reduce ni inhibe la actividad quinasa de la quinasa inducible por interleuquina-2 (ITK), y se selecciona de GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; y LFM-A13.

En una realización, el inhibidor de BTK es ibrutinib (PCI-32765) y el ibrutinib se administra a una dosis de aproximadamente 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 420 mg, 440 mg, 460 mg, 480 mg, 500 mg, 520 mg, 540 mg, 560 mg, 580 mg, 600 mg (p. ej., 250 mg, 420 mg o 560 mg) al día durante un período de tiempo, p. ej., diariamente durante el ciclo de 21 días o diariamente durante el ciclo de 28 días. En una realización, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de ibrutinib.

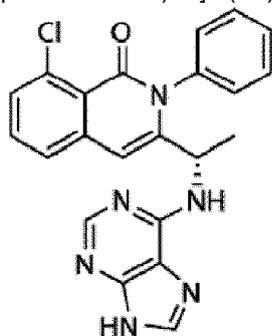
La estructura de ibrutinib (1-[(3*R*)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-*il*]piperidin-1-*il*]prop-2-en-1-ona) se muestra a continuación.



En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) (p. ej., un inhibidor de PI3K descrito en esta memoria, p. ej., idelalisib o duvelisib) y/o rituximab. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con idelalisib y rituximab. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con duvelisib y rituximab. Idelalisib (también denominado GS-1101 o CAL-101; Gilead) es una molécula pequeña que bloquea la isoforma delta de PI3K. La estructura de idelalisib (5-fluoro-3-fenil-2-[(1*S*)-1-(7*H*-purin-6-*il*amino)propil]-4(3*H*)-quinazolinona) se muestra a continuación.



Duvelisib es una molécula pequeña que bloquea PI3K- $\delta$ ,  $\gamma$ . La estructura de duvelisib (8-cloro-2-fenil-3-[(1S)-1-(9H-purin-6-ilamino)etil]-1(2H)-isoquinolinona) se muestra a continuación.



5

En realizaciones, el sujeto tiene CLL. En realizaciones, el sujeto tiene CLL en recaída, p. ej., al sujeto se le ha administrado previamente una terapia contra el cáncer (p. ej., se le ha administrado previamente un anticuerpo anti-CD20 o se le ha administrado previamente ibrutinib). Por ejemplo, el sujeto tiene una delección en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). En realizaciones, el sujeto comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En otras realizaciones, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En realizaciones, el sujeto tiene una delección en el brazo largo del cromosoma 11 (del(11q). En otras realizaciones, el sujeto no tiene un del(11q). En realizaciones, idelalisib se administra en una dosis de aproximadamente 100-400 mg (p. ej., 100-125, 125-150, 150-175, 175-200, 200-225, 225-250, 250-275, 275-300, 325-350, 350-375, o 375-400 mg), p. ej., BID. En realizaciones, duvelisib se administra en una dosificación de aproximadamente 15-100 mg (p. ej., aproximadamente 15-25, 25-50, 50-75 o 75-100 mg), p. ej., dos veces al día. En realizaciones, rituximab se administra en una dosis de aproximadamente 350-550 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475, o 475-500 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa.

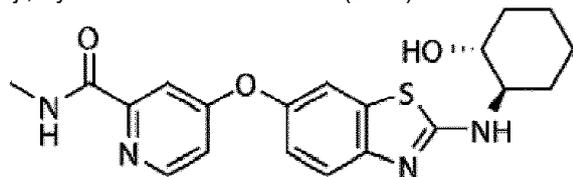
En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK). Inhibidores de la quinasa ALK ejemplares incluyen, pero no se limitan a crizotinib (Pfizer), ceritinib (Novartis), alectinib (Chugai), brigatinib (también denominado AP26113; Ariad), entrectinib (Ignyta), PF-06463922 (Pfizer), TSR-011 (Tesar) (véase, p. ej., Identificador del Ensayo Clínico N° NCT02048488), CEP-37440 (Teva) y X-396 (Xcovery). En algunos casos, el sujeto tiene un cáncer sólido, p. ej., un cáncer sólido descrito en esta memoria, p. ej., cáncer de pulmón.

El nombre químico del crizotinib es 3-[(1R)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]-5-(1-piperidin-4-ilpirazol-4-il)piridin-2-amina. El nombre químico de ceritinib es 5-cloro-N<sup>2</sup>-[2-isopropoxi-5-metil-4-(4-piperidinil)fenil]-N<sup>4</sup>-[2-(isopropilsulfonil)fenil]-2,4-pirimidinadiamina. El nombre químico de alectinib es 9-etil-6,6-dimetil-8-(4-morfolinopiperidin-1-il)-11-oxo-6,11-dihidro-5H-benzo[b]carbazol-3-carbonitrilo. El nombre químico de brigatinib es 5-cloro-N<sup>2</sup>-{4-[4-(dimetilamino)-1-piperidinil]-2-metoxifenil}-N<sup>4</sup>-[2-(dimetilfosforil)fenil]-2,4-pirimidinadiamina. El nombre químico de entrectinib es N-(5-(3,5-difluorobencil)-1H-indazol-3-il)-4-(4-metilpiperazin-1-il)-2-((tetrahidro-2H-piran-4-il)amino)benzamida. El nombre químico de PF-06463922 es (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimetil-15-oxo-10,15,16,17-tetrahidro-2H-8,4-(meteno)pirazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazaciotetradecina-3-carbonitrilo. La

estructura química de CEP-37440 es (S)-2-((5-cloro-2-((6-(4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il)-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anulen-2-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-N-metilbenzamida. El nombre químico de X-396 es (R)-6-amino-5-(1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi)-N-(4-(4-metilpiperazina-1-carbonil)fenil)piridazina-3-carboxamida.

5 En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). IDO es una enzima que cataliza la degradación del aminoácido L-triptófano a quinurenina. Muchos cánceres sobre-expresan IDO, p. ej., cáncer de próstata, colorrectal, pancreático, cervical, gástrico, ovárico, de cabeza y de pulmón. Los pDCs, macrófagos y células dendríticas (DC) pueden expresar IDO. Sin estar ligados por la teoría, se cree que una disminución de L-triptófano (p. ej., catalizada por IDO) resulta en un medio inmunosupresor mediante la inducción de anergia de células T y la apoptosis. Por lo tanto, sin estar ligados por la teoría, se cree que un inhibidor de IDO puede potenciar la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, p. ej., disminuyendo la supresión o muerte de una célula inmunitaria que expresa CAR. En casos, el sujeto tiene un tumor sólido, p. ej., un tumor sólido descrito en esta memoria, p. ej., cáncer de próstata, colorrectal, pancreático, cervical, gástrico, ovárico, de cabeza o de pulmón. Inhibidores de IDO ejemplares incluyen, pero no se limitan a 1-metil-triptófano, indoximod (NewLink Genetics) (véanse, p. ej., los Identificadores de Ensayo Clínico N°s NCT01191216; NCT01792050) e INCB024360 (Incyte Corp.) (véanse, p. ej., los Identificadores de Ensayo Clínico N°s NCT01604889; NCT01685255).

10 En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un modulador de células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs). Las MDSCs se acumulan en la periferia y en el sitio del tumor de muchos tumores sólidos. Estas células suprimen las respuestas de las células T, impidiendo con ello la eficacia de la terapia con células que expresan CAR. Sin estar ligados por la teoría, se cree que la administración de un modulador de MDSC potencia la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria. En un caso, el sujeto tiene un tumor sólido, p. ej., un tumor sólido descrito en esta memoria, p. ej., glioblastoma. Moduladores ejemplares de MDSCs incluyen, pero no se limitan a MCS110 y BLZ945. MCS110 es un anticuerpo monoclonal (mAb) contra el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Véase, p. ej., el Identificador de Ensayo Clínico N° NCT00757757. BLZ945 es un inhibidor de moléculas pequeñas del receptor del factor estimulador de colonias 1 (CSF1R). Véase, p. ej., Pyontek et al. Nat. Med. 19(2013):1264-72. La estructura de BLZ945 se muestra a continuación.



30 En algunos casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un polipéptido de interleuquina-15 (IL-15), un polipéptido de interleuquina-15 del receptor alfa (IL-15Ra), o una combinación tanto de un polipéptido de IL-15 como de un polipéptido de IL-15Ra, p. ej., hetIL-15 (Admune Therapeutics, LLC). hetIL-15 es un complejo heterodimérico no covalente de IL-15 e IL-15Ra. hetIL-15 se describe, p. ej., en los documentos U.S. 8,124,084, U.S. 2012/0177598, U.S. 2009/0082299, U.S. 2012/0141413 y U.S. 2011/0081311. En casos, het-IL-15 se administra por vía subcutánea. En casos, el sujeto tiene un cáncer, p. ej., un cáncer sólido, p. ej., melanoma o cáncer de colon. En casos, el sujeto tiene un cáncer metastásico.

#### 40 Aplicación Terapéutica *Enfermedades y/o Trastornos asociados a CD19*

En realizaciones, el inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto que tiene CLL, linfoma de células del manto (MCL) o linfoma linfocítico pequeño (SLL). Por ejemplo, el sujeto al que se le administra el inhibidor de BTK tiene una delección en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto al que se administra el inhibidor de BTK no tiene una del(17p). En las realizaciones, el sujeto al que se administra el inhibidor de BTK tiene CLL o SLL recidivante, p. ej., al sujeto se le ha administrado previamente una terapia contra el cáncer (p. ej., se le ha administrado previamente una, dos, tres o cuatro terapias anteriores contra el cáncer). En realizaciones, el sujeto al que se administra el inhibidor de BTK tiene CLL o SLL refractaria. En otras realizaciones, el sujeto al que se administra el inhibidor de BTK tiene linfoma folicular, p. ej., recidiva o linfoma folicular refractario.

En un aspecto, la invención se refiere al tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de CD19. En un aspecto, la invención se refiere al tratamiento de una enfermedad en donde parte del tumor es negativo para CD19 y parte del tumor es positivo para CD19. Por ejemplo, el CAR de la divulgación es útil para tratar sujetos que han sido sometidos a tratamiento por una enfermedad asociada con una expresión elevada de CD19, en donde el sujeto que ha sido sometido a tratamiento por niveles elevados de CD19 exhibe una enfermedad asociada con niveles elevados de CD19.

Las terapias descritas en esta memoria se pueden utilizar para tratar, p. ej., sujetos que responden a un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I) (p. ej., respuesta parcial o respuesta completa) o sujetos que no responden (p. ej., no respondedores o recaídas). Sin desear estar ligados por la teoría, un cierto número de pacientes sometidos a tratamiento con inhibidores de BTK, tal como ibrutinib, pueden mostrar una respuesta reducida al tratamiento (p. ej., son parciales o no responden al tratamiento, o recaen durante el tratamiento). Por consiguiente, la administración de las terapias con CAR descritas en esta memoria, en combinación con inhibidores de BTK, tales como compuestos de fórmula (I), puede dar como resultado efectos beneficiosos.

A continuación se describen regímenes terapéuticos ejemplares para estos sujetos.

En algunos casos, cuando el sujeto no responde o recae a un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I), se retira el inhibidor de BTK y se administra una terapia con CAR. En otros casos, cuando el sujeto no responde a un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I), se continúa la terapia con inhibidor de BTK y se añade la terapia con CAR al régimen. Este uso está respaldado, p. ej., por experimentos en el Ejemplo 42 de esta memoria que indican que la terapia con CAR es eficaz como una monoterapia en células resistentes a ibrutinib. Sin desear estar ligados por la teoría, continuar la terapia con inhibidor de BTK puede mejorar la eficacia de la terapia con CAR, p. ej., aumentando el número de células que expresan CAR en el torrente sanguíneo (véase el Ejemplo 42 en esta memoria).

Sin estar ligados por la teoría, un sujeto que no responde o que recae a un inhibidor de BTK (p. ej., ibrutinib o un compuesto de fórmula (I)) puede no responder por al menos dos razones: los sujetos pueden tener una mutación en la diana del fármaco (p. ej., BTK, p. ej., una mutación C481S) que previene la inhibición de la diana, o puede tener alteraciones en otras vías que pueden impulsar la proliferación incluso cuando la diana se inhibe adecuadamente (p. ej., una mutación en PLC $\gamma$ , tal como una mutación activadora en PLC $\gamma$  que da como resultado una señalización celular constitutiva independiente de BTK). El tratamiento puede modificarse dependiendo del motivo de la falta de respuesta. Por ejemplo, en la primera situación (en algunos casos), si los sujetos tienen (o se identifica que tienen) una mutación que previene que el inhibidor de BTK inhiba su diana, un segundo inhibidor de BTK se puede sustituir (o administrar en combinación con) el primer inhibidor de BTK. Más específicamente, en algunos casos en los que el paciente tiene (o se identifica que tiene) una mutación que previene el primer inhibidor de BTK (p. ej., ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774 o LFM-A13) de inhibir BTK, un segundo inhibidor de BTK, p. ej., un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, tal como un compuesto de fórmula (I), puede sustituirse por el primer inhibidor de BTK. Sin desear estar ligado por la teoría, el segundo inhibidor de quinasa puede actuar, p. ej., unirse a, una región de BTK que no está alterada por la mutación y, por lo tanto, el sujeto es sensible al segundo inhibidor de BTK. En otros casos, se mantiene el inhibidor de BTK original, tal como ibrutinib. De acuerdo con la teoría no limitante aquí, el inhibidor de quinasa original puede tener una actividad útil en las células que expresan CAR, p. ej., fomentando un fenotipo TH1, fomentando la proliferación o aumentando de otro modo los niveles o la actividad de las células.

Como se ha señalado anteriormente, en algunos casos, un sujeto no responde, porque el sujeto tiene una alteración (p. ej., una mutación) en otra vía que puede impulsar la proliferación, incluso cuando la diana es inhibida de manera adecuada. Por consiguiente, si el sujeto tiene (o se identifica que tiene) una alteración en una vía que hace que sea ineficaz la primera actividad del inhibidor de BTK, se puede mantener la terapia con el inhibidor de BTK. Sin desear estar ligado por la teoría, el inhibidor de BTK, tal como ibrutinib o un compuesto de fórmula (I) puede fomentar cambios biológicos útiles en las células cancerosas, incluso si el inhibidor de BTK solo no es suficiente para ralentizar la proliferación. Por ejemplo, el inhibidor de quinasa puede ser suficiente para movilizar las células cancerosas fuera de los ganglios linfáticos, haciéndolas más vulnerables a la terapia con CAR.

Pasando a los sujetos que responden a un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I), ahora se describen diversos regímenes terapéuticos. En algunos casos, cuando un sujeto es (o se identifica como) un respondedor completo al inhibidor de BTK, al sujeto no se le administra una terapia CAR durante el período de respuesta completa. En otros casos, cuando un sujeto es (o se identifica como) un respondedor completo al inhibidor de BTK, al sujeto se le administra una terapia con CAR durante el período de respuesta completa. En un caso, después de la terapia con CAR, el sujeto experimenta una respuesta prolongada o una recaída retardada (p. ej., en comparación con el curso esperado de la enfermedad cuando se trata sin terapia con CAR). Por ejemplo, el MCL tratado con ibrutinib en monoterapia tiene una duración media de respuesta de aproximadamente 17,5 meses.

En algunos casos, cuando un sujeto es (o se identifica que es) un respondedor completo al inhibidor de BTK, tal como un compuesto de fórmula (I) al sujeto no se le administra una terapia con CAR durante el período de respuesta parcial. En otros casos, cuando un sujeto es (o se identifica como) un respondedor parcial al inhibidor de BTK, al sujeto se le administra una terapia con CAR durante el período de respuesta parcial. En un caso, después de la terapia CAR, el sujeto experimenta una respuesta completa y/o una respuesta prolongada o una recaída retardada (p. ej., en comparación con el curso esperado de la enfermedad cuando se trata sin terapia con CAR).

En algunos casos, cuando un sujeto tiene (o se identifica que tiene) una enfermedad estable después del tratamiento con el inhibidor de BTK, tal como un compuesto de fórmula (I), al sujeto no se le administra una terapia con CAR

durante el período de enfermedad estable. En otros casos, cuando un sujeto tiene (o se identifica que tiene) una enfermedad estable después del comienzo del tratamiento con el inhibidor de BTK, al sujeto se le administra una terapia con CAR durante el período de enfermedad estable. En un caso, después de la terapia con CAR, el sujeto experimenta una respuesta parcial, una respuesta completa y/o una respuesta prolongada o una recaída retardada (p. ej., en comparación con el curso esperado de la enfermedad cuando se trata sin terapia con CAR).

En algunos casos, cuando un sujeto tiene (o se identifica que tiene) una enfermedad progresiva después del tratamiento con el inhibidor de BTK, tal como un compuesto de fórmula (I), al sujeto se le administra una terapia con CAR durante el período de enfermedad progresiva. En un caso, después de la terapia con CAR, el sujeto experimenta una enfermedad estable, una respuesta parcial, una respuesta completa y/o una respuesta prolongada o una recaída retardada (p. ej., en comparación con el curso esperado de la enfermedad cuando se trata sin terapia con CAR).

Por lo tanto, se pueden realizar una o más etapas de evaluación de la enfermedad antes o durante el tratamiento, para determinar qué curso de tratamiento es el adecuado para un paciente dado. Por ejemplo, a un sujeto se le puede administrar un inhibidor de BTK, tal como un compuesto de fórmula (I), como terapia de primera línea. Luego, después de un período de tiempo (p. ej., 1 o 2 meses pero también 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 1,5 meses, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses o 18 meses) se puede evaluar la respuesta del paciente. Si la evaluación demuestra que el sujeto es un respondedor completo, en algunos casos no se administra una terapia con CAR, p. ej., como se describió arriba. Si la evaluación demuestra que el sujeto es un respondedor parcial o tiene una enfermedad estable, en algunos casos la terapia con CAR se administra en combinación con el inhibidor de quinasas, p. ej., como se describió arriba. Si la evaluación demuestra que el sujeto es un no respondedor o que recae, en algunos casos se administra una terapia con CAR en combinación con el inhibidor de BTK o un segundo inhibidor de BTK, p. ej., como se describió arriba. En algunos casos, el inhibidor de BTK controla la enfermedad al tiempo que una célula CAR que expresan está siendo fabricada, p. ej., mientras las células T propias del paciente están siendo manipuladas para expresar un CAR y/u otros factores.

Normas clínicas para clasificar el estado de respuesta de un paciente o el estado de recaída son conocidos en la técnica. Como ejemplo, para el linfoma maligno, los criterios de respuesta estandarizados se describen en Cheson et al, J Clin Oncol 17: 1244 (1999) y Cheson et al., "Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma", J Clin Oncol 25: 579-586. (2007). Por consiguiente, en algunos casos, un sujeto se considera un respondedor completo, respondedor parcial, que tiene una enfermedad estable, un no respondedor o un recidivante de acuerdo con los criterios de Cheson o los criterios de Cheson modificados. Los criterios para clasificar otras neoplasias hematológicas se conocen en la técnica.

De acuerdo con los criterios de la Tabla 2 de Cheson 2007, un respondedor completo tiene la desaparición de toda evidencia de enfermedad; un respondedor parcial tiene regresión de la enfermedad mensurable y no hay sitios nuevos; un paciente con enfermedad estable no logra alcanzar RC/PR o PD; y un paciente con enfermedad en recaída o enfermedad progresiva tiene una nueva lesión o un aumento mayor que o igual al 50% de los sitios previamente afectados desde el nadir. La evaluación puede implicar una determinación de si la enfermedad es ávida de FDG, PET positiva o negativa, si hay nódulos presentes, p. ej., palpables en el hígado o el bazo, y si la médula ósea está depurada o muestra compromiso.

La terapia con CAR y el inhibidor de BTK, tal como un compuesto de fórmula (I), se pueden administrar, p. ej., de forma simultánea o secuencial. En algunas realizaciones, la terapia con CAR comienza sustancialmente al mismo tiempo que comienza la terapia con inhibidor de BTK. En algunas realizaciones, la terapia con CAR comienza antes de que comience la terapia con inhibidor de BTK. En algunas realizaciones, la terapia con CAR comienza después de que comience la terapia con inhibidor de BTK. Por ejemplo, la terapia con CAR puede comenzar, p. ej., al menos 1, 2, 3 o 4 semanas, o 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 15, 18 o 24 meses después de que comience la terapia con inhibidor de BTK. En algunas realizaciones, la terapia con CAR comienza mientras un paciente tiene niveles fisiológicamente relevantes del inhibidor de BTK en su cuerpo.

Cuando se administran en combinación, la terapia con CAR y el inhibidor de BTK, tal como un compuesto de fórmula (I), o ambos, se pueden administrar en una cantidad o dosis mayor, menor o igual que la cantidad o dosis de cada uno de los agentes utilizados individualmente, p. ej., como una monoterapia. En determinadas realizaciones, la cantidad o dosis administrada de la terapia con CAR, el inhibidor de BTK, o ambos, es menor (p. ej., al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%) que la cantidad o dosis de cada uno de los agentes utilizados individualmente, p. ej., como una monoterapia. En otras realizaciones, la cantidad o dosis de la terapia con CAR, el inhibidor de BTK, o ambos, que da como resultado un efecto deseado (p. ej., tratamiento del cáncer) es menor (p. ej., al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, o al menos 50%) que la cantidad o dosis de cada uno de los agentes utilizados individualmente, p. ej., como una monoterapia, requerida para lograr el mismo efecto terapéutico.

Cuando se administran en combinación, la terapia con CAR y el inhibidor de BTK, tal como un compuesto de fórmula (I), o ambos, se pueden administrar con una duración que es mayor, más corta o igual que la duración de cada uno de los agentes utilizados individualmente, p. ej., como una monoterapia. En determinadas realizaciones, la duración

de la administración de la terapia con CAR, el inhibidor de BTK, o ambos, es menor (p. ej., al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%) que la duración de cada uno de los agentes utilizados individualmente, p. ej., como una monoterapia. En otras realizaciones, la duración de la administración de la terapia con CAR, el inhibidor de BTK, o ambos, que da como resultado un efecto deseado (p. ej., tratamiento del cáncer) es menor (p. ej., al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, o al menos 50%) que la duración de cada uno de los agentes utilizados individualmente, p. ej., como una monoterapia, requerida para lograr el mismo efecto terapéutico. En alguna realización, al paciente se le administra un ciclo abreviado del inhibidor de BTK. Por ejemplo, el ciclo abreviado del inhibidor de BTK puede durar aproximadamente 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-12, 12-15, 15-18, 18-21, o 21-24 meses en total o puede durar aproximadamente 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-12, 12-15, 15-18, 18-21 o 21-24 meses después de la administración de la terapia con CAR. En realizaciones, el ciclo abreviado del inhibidor de BTK termina antes de la recaída. En realizaciones, el inhibidor de BTK se administra a niveles normales (p. ej., monoterapia) durante el ciclo abreviado.

En realizaciones, una dosis única de células que expresan CAR comprende aproximadamente  $5 \times 10^8$  células CART CD19. Una dosis de células que expresan CAR también puede comprender aproximadamente  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ , o  $5 \times 10^9$  células, p. ej., células CAR CD19, p. ej., células de CART CD19.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un vector que comprende CAR CD19 enlazadas operativamente a promotor para la expresión en células de mamífero, p. ej., células T. En un aspecto, la invención proporciona una célula recombinante, p. ej., una célula T, que expresa el CAR CD19 para su uso en el tratamiento de tumores que expresan CD19, en donde la célula T recombinante que expresa el CAR CD19 se denomina una CART CD19. En un aspecto, la CART CD19 descrita en esta memoria es capaz de poner en contacto una célula tumoral con al menos un CAR CD19 expresado en su superficie, de manera que el CART fija como objetivo la célula tumoral y se inhibe el crecimiento del tumor.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa CD19, que comprende poner en contacto la célula tumoral con una célula que expresa CAR CD19, p. ej., una célula CART CD19, descrita en esta memoria, de manera que la CART se active en respuesta al antígeno y fije como objetivo a la célula cancerosa, en donde se inhibe el crecimiento del tumor. La célula que expresa CAR CD19, p. ej., la célula T, se administra en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I).

Administrado "en combinación", tal como se utiliza en esta memoria, significa que se administran dos (o más) tratamientos diferentes al sujeto durante el curso de la afección del sujeto con el trastorno, p. ej., los dos o más tratamientos se suministran después de que el sujeto ha sido diagnosticado con el trastorno y antes de que el trastorno se haya curado o eliminado o el tratamiento haya cesado por otras razones. En algunas realizaciones, el suministro de un tratamiento todavía se está produciendo cuando comienza el suministro del segundo, de modo que hay solapamiento en términos de administración. A esto a veces se hace referencia en esta memoria como "suministro simultáneo" o "concurrente". En otras realizaciones, el suministro de un tratamiento termina antes de que comience el suministro del otro tratamiento. En algunas realizaciones de cualquier caso, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más efectivo, p. ej., se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida que lo que se vería si el segundo tratamiento se administrara en ausencia del primer tratamiento, o la situación análoga se ve con el primer tratamiento. En algunas realizaciones, el suministro es tal que la reducción de un síntoma u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor de lo que se observaría con un tratamiento suministrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo o mayor que aditivo. El suministro puede ser tal que un efecto del primer tratamiento suministrado todavía sea detectable cuando se suministra el segundo. En una realización, la célula que expresa CAR se administra a una dosis y/o programa de dosificación descrito en esta memoria, y el inhibidor de BTK o agente que mejora la actividad de la célula que expresa CAR se administra a una dosis y/o programa de dosificación descrito en esta memoria.

La invención incluye un tipo de terapia celular en la que las células T se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula CAR T se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede matar las células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T modificadas con CAR pueden replicarse in vivo, lo que da como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control tumoral sostenido. En diversos aspectos, las células T administradas al paciente, o su progenie, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años o cinco años después de la administración de la célula T al paciente.

La invención también incluye un tipo de terapia celular en la que las células T se modifican, p. ej., mediante ARN transcrito *in vitro*, para expresar transitoriamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula CAR T se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida puede matar las células tumorales en el receptor. Por lo tanto, en

diversos aspectos, las células T administradas al paciente están presentes durante menos de un mes, p. ej., tres semanas, dos semanas, una semana, después de la administración de las células T al paciente.

5 Sin desear estar ligado a teoría particular alguna, la respuesta inmunitaria anti-tumoral provocada por las células T modificadas con CAR puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva o, alternativamente, puede deberse a una respuesta inmunitaria directa frente a una respuesta inmunitaria indirecta. En un aspecto, las células T transducidas con CAR exhiben secreción de citoquinas proinflamatorias específicas y una potente actividad citolítica en respuesta a células cancerosas humanas que expresan CD19, resisten la inhibición de CD19 soluble, median en la muerte del testigo y median en la regresión de un tumor humano establecido. Por ejemplo, las células de antígeno menos 10 tumorales dentro de un campo heterogéneo de tumor que expresan CD19 pueden ser susceptibles a la destrucción indirecta por células T redirigidas a CD19 que han reaccionado previamente frente a las células cancerosas positivas al antígeno adyacentes.

15 En un aspecto, las células T completamente humanas modificadas con CAR de la divulgación pueden ser un tipo de vacuna para inmunización *ex vivo* y/o terapia *in vivo* en un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

Con respecto a la inmunización *ex vivo*, al menos uno de los siguientes ocurre *in vitro* antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en las células o iii) crioconservación de las células.

20 Procesos *ex vivo* son bien conocidos en la técnica y se comentan con más detalle más adelante. Brevemente, las células se aíslan de un mamífero (p. ej., un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un CAR descrito en esta memoria. La célula modificada con CAR se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor de mamífero puede 25 ser un ser humano y la célula modificada con CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Alternativamente, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor. Además de utilizar una vacuna basada en células en términos de inmunización *ex vivo*, también se incluyen en los métodos descritos en esta memoria composiciones y métodos para la inmunización *in vivo* para provocar una respuesta inmune dirigida contra un antígeno en un paciente.

30 Generalmente, las células activadas y expandidas como se describe en esta memoria se pueden utilizar en el tratamiento y la prevención de enfermedades que surgen en individuos inmunodeprimidos. En particular, las células que expresan CAR descritas en esta memoria se utilizan en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de CD19. En determinados aspectos, las células se utilizan en el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de CD19. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de enfermedades, trastornos y afecciones asociados con la expresión de CD19, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células que expresan CAR descritas en esta memoria, en combinación con un inhibidor de quinasa, p. ej., un inhibidor de quinasa descrito en esta memoria.

35 La presente divulgación también proporciona métodos para inhibir la proliferación o reducir una población de células que expresan CD19, comprendiendo los métodos poner en contacto una población de células que comprenden una célula que expresa CD19 con una célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa CD19 y poner en contacto la población de células que expresan CD19 con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I). En un aspecto específico, la presente divulgación proporciona métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD19, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD19 con una célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa CD19 y poner en contacto la célula que expresa CD19 con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I). En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para inhibir la proliferación o la reducción de la población de células cancerosas que expresan CD19, comprendiendo los métodos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD19 con una célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa CD19 y poner en contacto la célula que expresa CD19 con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I). En determinados aspectos, la combinación de la célula que expresa CAR anti-CD19 descrita en esta memoria y el inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de 45 fórmula (I), reduce la cantidad, el número, la cantidad o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 65%, al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 95% o al menos un 99% en un sujeto con o modelo animal para un cáncer hematológico u otro cáncer asociado con células que expresan CD19 en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

60 La presente divulgación también proporciona métodos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con células que expresan CD19 (p. ej., un cáncer hematológico o cáncer atípico que expresa CD19), comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que necesita una célula que expresa un CAR anti-CD19 que se une a la célula que expresa CD19 y administrar un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I). En un aspecto, el sujeto es

un ser humano. Ejemplos no limitantes de trastornos asociados con células que expresan CD19 incluyen trastornos autoinmunitarios (tales como el lupus), trastornos inflamatorios (tales como alergias y asma) y cánceres (tales como cánceres hematológicos o cánceres atípicos que expresan CD19).

5 La presente divulgación también proporciona métodos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con células que expresan CD19, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesite una célula CART anti-CD19 de la divulgación que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

10 La presente divulgación proporciona métodos para prevenir la recaída del cáncer asociado con células que expresan CD19, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesite una célula que expresa anti-CD19 (tal como una célula CART anti-CD19) de la divulgación que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una célula que expresa anti-CD19 (tal como una célula CART anti-CD19) descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa CD19 en combinación con una cantidad eficaz de otra terapia.

15 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una célula (p. ej., una célula efectora inmunitaria) que expresa un CAR que fija como objetivo células B, p. ej., Una célula T o una célula NK, descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), de manera que se trate el cáncer en el sujeto. Un ejemplo de un cáncer que se puede tratar mediante los métodos descritos en esta memoria es un cáncer asociado con la expresión del antígeno de células B, p. ej., CD19. En un caso, la enfermedad es un tumor sólido o líquido. En un caso, la enfermedad es un cáncer hematológico. En un caso, el cáncer hematológico es leucemia. En un caso, el cáncer hematológico es una neoplasia de células B maduras, p. ej., de acuerdo con la clasificación de la OMS. En un caso, el cáncer hematológico es una neoplasia maligna derivada de linfocitos B CD19+. En un caso, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en una o más leucemias agudas que incluyen pero no se limitan a leucemia linfocítica aguda de células B (BALL), leucemia linfocítica aguda de células T (TALL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), leucemia linfocítica aguda (ALL); una o más leucemias crónicas que incluyen, pero no se limitan a leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos o afecciones hematológicas adicionales que incluyen, pero no se limitan a linfoma de células del manto (MCL), leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) (p. ej., linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos, DLBCL primario del SNC, DLBCL cutáneo primario tipo pierna o EBV+ DLBCL de los ancianos), DLBCL asociado con inflamación crónica, linfoma folicular, linfoma folicular pediátrico, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma de MALT (linfoma extraganglionar de la zona marginal de tejido linfocítico asociado a las mucosas), linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma plasmoblástico, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma/leucemia esplénico (p. ej., no clasificable), linfoma de células B pequeñas de pulpa roja esplénico difuso, variante de leucemia de células pilosas, linfoma linfoplasmacítico, una enfermedad de cadena pesada (p. ej., enfermedad de cadena pesada alfa, enfermedad de cadena pesada gamma o enfermedad de cadena pesada mu), mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma óseo solitario, plasmocitoma extraóseo, linfoma ganglionar de la zona marginal, linfoma ganglionar de la zona marginal pediátrico, linfoma cutáneo primario del centro del folículo, granulomatosis linfomatoide, linfoma mediastínico primario (ténmico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de células B grandes ALK+, linfoma de células B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de derrame primario, linfoma de células B, no clasificable (p. Ej., con características intermedias entre DLBCL y linfoma de Burkitt o intermedias entre DLBCL y linfoma de Hodgkin clásico) y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células de la sangre mieloides, y a enfermedades asociadas con la expresión de antígeno de células B (p. ej., CD19) incluyen, pero no se limitan a cánceres atípicos y/o no clásicos, tumores malignos, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan antígeno de células B (p. ej., CD19); y cualquier combinación de los mismos.

En algunos casos, el cáncer es linfoma de Hodgkin y el paciente es tratado con células que expresan CAR, p. ej., como una monoterapia o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En casos, el linfoma de Hodgkin es estadio I, II, III o IV. El agente terapéutico adicional puede comprender, p. ej., un inhibidor de quinasa, tal como un inhibidor de BTK tal como ibrutinib. El tratamiento terapéutico adicional puede comprender un tratamiento para el linfoma de Hodgkin. El tratamiento adicional puede comprender, p. ej., radioterapia, MOPP (Mustargen, Oncovin, Prednisona y Procarbazona), ABVD (Adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), Stanford V (un régimen con quimioterapia y tratamiento con radiación) o BEACOPP (Bleomicina, Etopósido, Adriamicina, Ciclofosfamida, Oncovin, Procarbazona, Prednisona). En algunos casos, el sujeto ha sido tratado previamente con, o es resistente a, o es refractario a una o más de las terapias de radiación, MOPP, Stanford V o BEACOPP.

Indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión del antígeno de células B, p. ej., uno o más de CD19, CD20, CD22 o ROR1, incluyen, pero no se limitan a, p. ej., enfermedad autoinmune (p. ej., lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplante.

En algunos casos, un cáncer que puede tratarse con la combinación descrita en esta memoria es mieloma múltiple. El mieloma múltiple es un cáncer de la sangre que se caracteriza por la acumulación de un clon de células plasmáticas en la médula ósea. Las terapias actuales para el mieloma múltiple incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con lenalidomida, que es un análogo de la talidomida. La lenalidomida tiene actividades que incluyen actividad anti-tumoral, inhibición de la angiogénesis e inmunomodulación. En algunos casos, un CAR CD19, p. ej., tal como se describe en esta memoria, puede utilizarse para fijar como objetivo células de mieloma. En algunos casos, la combinación descrita en esta memoria se puede utilizar con una o más terapias adicionales, p. ej., tratamiento con lenalidomida.

Las células que expresan CAR descritas en esta memoria pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes, tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones celulares.

En casos, se administra al sujeto una quimioterapia que agota los linfoides antes, al mismo tiempo o después de la administración (p. ej., Infusión) de células CAR, p. ej., células que expresan CAR descritas en esta memoria. En un ejemplo, la quimioterapia de agotamiento de linfoides se administra al sujeto antes de la administración de células CAR. Por ejemplo, la quimioterapia de agotamiento de linfoides finaliza 1-4 días (p. ej., 1, 2, 3 o 4 días) antes de la infusión de células CAR. En casos, se administran múltiples dosis de células CAR, p. ej., tal como se describe en esta memoria. Por ejemplo, una dosis única comprende aproximadamente  $5 \times 10^8$  células CAR. En casos, se administra al sujeto una quimioterapia que agota los linfoides antes, al mismo tiempo o después de la administración (p. ej., Infusión) de una célula que expresan CAR descritas en esta memoria.

#### *Cáncer hematológico*

Afecciones de cáncer hematológico son los tipos de cáncer tales como leucemia, linfoma y afecciones linfoproliferativas malignas que afectan a la sangre, la médula ósea y el sistema linfático.

La leucemia se puede clasificar como leucemia aguda y leucemia crónica. La leucemia aguda se puede clasificar, además, como leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia linfoide aguda (ALL). La leucemia crónica incluye la leucemia mielógena crónica (CML) y la leucemia linfoide crónica (CLL). Otras afecciones relacionadas incluyen los síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como "preleucemia") que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células de la sangre mieloides y el riesgo de transformación a AML.

El linfoma es un grupo de tumores de células de la sangre que se desarrolla a partir de linfocitos. Linfomas ejemplares incluyen linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.

La presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos para tratar el cáncer. En un aspecto, el cáncer es un cáncer hematológico que incluye, pero no se limita a, cáncer hematológico es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, las células CART de la divulgación pueden utilizarse para tratar cánceres y tumores malignos, tales como, pero no limitados a, p. ej., leucemias agudas que incluyen, pero no se limitan a leucemia linfoide aguda de células B ("BALL"), leucemia linfoide aguda de células T ("TALL"), leucemia linfoide aguda (ALL); una o más leucemias crónicas que incluyen, pero no se limitan a, p. ej., leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos o afecciones hematológicas adicionales que incluyen, pero no se limitan a leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma de MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y el síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasia plasmocitoide de células dendríticas, macroglobulinemia de Waldenstrom, y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células de la sangre mieloides y similares. Además, una enfermedad asociada con un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en esta memoria incluye, pero no se limita a, p. ej., cánceres atípicos y/o no clásicos, tumores malignos, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan un antígeno asociado al cáncer tal como se describe en esta memoria.

La presente divulgación también proporciona métodos para inhibir la proliferación o reducir una población de células que expresan antígenos tumorales, comprendiendo los métodos poner en contacto una población de células que comprenden un antígeno tumoral con una célula que expresa CAR o una célula NK de la divulgación que se une al antígeno tumoral. En un aspecto específico, la presente divulgación proporciona métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan un antígeno tumoral tal como se describe en esta memoria, comprendiendo los métodos poner en contacto una población de células cancerosas que expresan antígenos tumorales con una célula T que expresan CAR o célula NK de la divulgación que se une al antígeno tumoral. En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para inhibir la proliferación o reducir la población de células

5 cancerosas que expresan un antígeno tumoral, p. ej., los métodos descritos en esta memoria, que comprenden poner en contacto una población de células cancerosas que expresan antígenos tumorales con una célula T que expresa CAR o célula NK de la divulgación que se une a un antígeno tumoral. En determinados aspectos, una célula T que expresa CAR o célula NK de la divulgación reduce la cantidad, el número, la cantidad o el porcentaje de células y/o células cancerosas en al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 65%, al menos un 75%, al menos un 85%, al menos un 95% o al menos un 99% en un sujeto con o modelo animal para un cáncer hematológico u otro cáncer asociado con células que expresan CD19 en relación con un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

10 La presente divulgación también proporciona métodos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con células que expresan un antígeno tumoral (p. ej., un cáncer hematológico o un cáncer atípico que expresa un antígeno tumoral, p. ej., descrito en esta memoria), comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que necesita una célula CAR T o una célula NK de la divulgación que se une a una célula que expresa un antígeno tumoral. En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Ejemplos no limitantes de trastornos asociados con células que expresan un antígeno tumoral incluyen trastornos autoinmunitarios (tales como el lupus), trastornos inflamatorios (tales como alergias y asma) y cánceres (tales como cánceres hematológicos o cánceres atípicos que expresan un antígeno tumoral tal como se describe en esta memoria).

20 La presente divulgación también proporciona métodos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con células que expresan un antígeno tumoral, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesite una célula CAR T o una célula NK de la divulgación que se une a una célula que expresa un antígeno tumoral. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

25 La presente divulgación proporciona métodos para prevenir la recaída del cáncer asociado con células que expresan un antígeno tumoral, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesite una célula CAR T o una célula NK de la divulgación que se une a una célula que expresa un antígeno tumoral. En un aspecto, los métodos comprenden administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una célula T que expresa CAR- o célula NK descrita en esta memoria que se une a la célula que expresa un antígeno tumoral en combinación con una cantidad eficaz de otra terapia.

### 30 Terapias de Combinación

La combinación de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria (p. ej., y un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I)) puede utilizarse en combinación con otros agentes y terapias conocidos.

35 Una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, el inhibidor de BTK y/o el al menos un agente terapéutico adicional se pueden administrar simultáneamente, en la misma o en composiciones separadas, o secuencialmente. Para la administración secuencial, la célula que expresa CAR descrita en esta memoria se puede administrar en primer lugar y el agente adicional se puede administrar en segundo lugar, o se puede invertir el orden de administración.

40 La terapia con CAR y/u otros agentes, procedimientos o modalidades terapéuticos se pueden administrar durante períodos de trastorno activo, o durante un período de remisión o enfermedad menos activa. La terapia con CAR se puede administrar antes de otro tratamiento, al mismo tiempo que el tratamiento, después del tratamiento o durante la remisión del trastorno.

45 Cuando se administran en combinación, la terapia con CAR y uno o más agentes adicionales (p. ej., Inhibidor de BTK y/o un tercer agente), o todos, pueden administrarse en una cantidad o dosis que es mayor, menor o igual que la cantidad o dosis de cada uno de los agentes utilizados individualmente, p. ej., como una monoterapia. En determinadas realizaciones, la cantidad o dosis administrada de la terapia con CAR, el agente adicional (p. ej., inhibidor de BTK y/o tercer agente), o todos, es menor (p. ej., al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50%) que la cantidad o dosis de cada uno de los agentes utilizados individualmente, p. ej., como una monoterapia. En otras realizaciones, la cantidad o dosis de la terapia con CAR, el agente adicional (p. ej., inhibidor de BTK y/o tercer agente) o todos, que da como resultado un efecto deseado (p. ej., tratamiento del cáncer) es menor (p. ej., al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50%) que la cantidad o dosis de cada uno de los agentes utilizados individualmente, p. ej., como una monoterapia, requerida para lograr el mismo efecto terapéutico.

55 En aspectos adicionales, la combinación de la célula que expresa CAR descrita en esta memoria (p. ej., el inhibidor de BTK) se puede utilizar en un régimen de tratamiento en combinación con cirugía, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunosupresores, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas e irradiación. vacuna peptídica, tal como la descrita en Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

60

En un caso, la combinación de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria (p. ej., un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I) se puede utilizar en combinación con otro agente quimioterapéutico. Agentes quimioterapéuticos ejemplares incluyen una antraciclina (p. ej., doxorubicina (p. ej., doxorubicina liposomal)); un alcaloide de la vinca (p. ej., vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina); un agente alquilante (p. ej., ciclofosfamida, 5 descabazina, melfalán, ifosfamida, temozolomida); un anticuerpo de células inmunitarias (p. ej., alemtuzamab, gemtuzumab, rituximab, ofatumumab, tositumomab, brentuximab); un antimetabolito (que incluye, p. ej., antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa (p. ej., fludarabina)); un agonista de la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides TNFR (GITR); un inhibidor del proteasoma (p. ej., aclacinomicina A, gliotoxina o bortezomib); un inmunomodulador tal como talidomida 10 o un derivado de talidomida (p. ej., lenalidomida).

Agentes Quimioterapéuticos Generales: agentes considerados para uso en terapias de combinación incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfán (Myleran®), inyección 15 de busulfano (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucil (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytoxan® o Neosar®), citarabina, citosina arabinósido (Cytosar-U®), inyección de liposoma citarabina (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (Actinomycin D, Cosmegen), hidrocloreuro de daunorrubicina (Cerubidine®), inyección de liposoma citrato de daunorrubicina (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), hidrocloreuro de doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Acrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitibina, gemcitabina (difluorodesoxicidina), hidroxiaurea (Hydrea®), Idarrubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecan (Campotosar®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina cálcica, melfalan (Alkeran®), 6-mercaptapurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), milotarg, paclitaxel (Taxol®), phoenix (Yttrium90/MX-DTPA), pentostatina, implante de 20 polifeprosan 20 con carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifen (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), hidrocloreuro de topotecan para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y vinorelbina (Navelbine®).

Agentes alquilantes ejemplares incluyen, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, 30 alquilsulfonatos, nitrosoureas y triazenos): mostaza uracilo (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethylodopan®, Desmethylodopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), clorometina (Mustargen®), ciclofosfamida (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ifosfamida (Mitoxana®), melfalan (Alkeran®), clorambucilo (Leukeran®), pipobroman (Amedel®, Vercyte®), trietilenmelamina (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), trietileno fosforamina, Temozolomida (Temodar®), tiotepa (Thioplex®), busulfan (Busilvex®, Myleran®), carmustina (BiCNU®), lomustina (CeeNU®), estreptozocina (Zanosar®) y Dacarbazina (DTIC-Dome®). Agentes alquilantes 35 ejemplares adicionales incluyen, sin limitación, Oxaliplatino (Eloxatin®); Temozolomida (Temodar® y Temodal®); Dactinomicina (también conocida como actinomicina-D, Cosmegen®); Melfalan (también conocido como L-PAM, L-sarcolisina y mostaza fenilalanina, Alkeran®); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Carmustina (BiCNU®); Bendamustina (Treanda®); Busulfan (Busulfex® y Myleran®); Carboplatino (Paraplatin®); Lomustina (también conocida como CCNU, CeeNU®); cisplatino (también conocido como CDDP, Platinol® y Platinol®-AQ); clorambucil (Leukeran®); ciclofosfamida (Cytoxan® y Neosar®); Dacarbazina (también conocida como DTIC, DIC e imidazol carboxamida, DTIC-Dome®); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Ifosfamida (Ifex®); Prednumustina; Procarbazina (Matulane®); Mecloretamina (también conocida como mostaza nitrogenada, mustina e hidrocloreuro de mecloretamina, Mustargen®); 45 estreptozocina (Zanosar®); tiotepa (también conocido como tiofosfoamida, TESP A y TSPA, Thioplex®); ciclofosfamida (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); y bendamustina HCl (Treanda®).

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de 50 quinasa, p. ej., un inhibidor de BTK tal como ibrutinib, se administra a un sujeto en combinación con fludarabina, ciclofosfamida y/o rituximab. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR). En casos, el sujeto tiene CLL. Por ejemplo, el sujeto tiene una delección en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). En casos, el sujeto comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En otros casos, el sujeto no 55 comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En casos, la fludarabina se administra en una dosis de aproximadamente 10-50 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, o 45-50 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa. En casos, la ciclofosfamida se administra en una dosificación de aproximadamente 200-300 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., aproximadamente 200-225, 225-250, 250-275 o 275-300 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa. En casos, el rituximab se administra en una 60 dosificación de aproximadamente 400-600 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa.

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con bendamustina y rituximab. En

- casos, el sujeto tiene CLL. Por ejemplo, el sujeto tiene una delección en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). En casos, el sujeto comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En otros casos, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En casos, la bendamustina se administra en una dosificación de aproximadamente 70-110 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 70-80, 80-90, 90-100 o 100-110 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa. En casos, el rituximab se administra en una dosificación de aproximadamente 400-600 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa.
- En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y/o un corticosteroide (p. ej., prednisona). En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP). En casos, el sujeto tiene linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). En casos, el sujeto tiene DLBCL en estadio limitado no voluminoso (p. ej., comprende un tumor que tiene un tamaño/diámetro de menos de 7 cm). En casos, el sujeto es tratado con radiación en combinación con R-CHOP. Por ejemplo, al sujeto se le administra R-CHOP (p. ej., 1-6 ciclos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de R-CHOP), seguido de radiación. En algunos casos, al sujeto se le administra R-CHOP (p. ej., 1-6 ciclos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de R-CHOP) después de la radiación.
- En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y/o rituximab. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y rituximab (EPOCH-R). En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con dosis ajustada de EPOCH-R (DA-EPOCH-R). En casos, el sujeto tiene un linfoma de células B, p. ej., un linfoma agresivo de células B con reordenamiento de Myc.
- En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con rituximab y/o lenalidomida. Lenalidomida ((*RS*)-3-(4-amino-1-oxo 1,3-dihidro-2*H*-isoindol- 2-il)piperidina-2,6-diona) es un inmunomodulador. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con rituximab y lenalidomida. En casos, el sujeto tiene linfoma linfoma folicular (FL) o linfoma de células del manto (MCL). En casos, el sujeto tiene FL y no ha sido tratado previamente con una terapia contra el cáncer. En casos, lenalidomida se administra en una dosificación de aproximadamente 10-20 mg (p. ej., 10-15 o 15-20 mg), p. ej., diariamente. En casos, rituximab se administra en una dosificación de aproximadamente 350-550 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa.
- El tratamiento con una combinación de un agente quimioterapéutico y una célula que expresa una molécula de CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), puede utilizarse para tratar un cáncer hematológico descrito en esta memoria, p. ej., AML. En casos, la combinación de un agente quimioterapéutico y una célula que expresa CAR es útil para fijar como objetivo, p. ej., matar, células madre cancerosas, p. ej., células madre leucémicas, p. ej., en sujetos con AML. En casos, la combinación de un agente quimioterapéutico y una célula que expresa CAR es útil para tratar la enfermedad residual mínima (MRD). MRD se refiere al pequeño número de células cancerosas que permanecen en un sujeto durante el tratamiento, p. ej., quimioterapia, o después del tratamiento. La MRD es, a menudo una causa principal de recaída. La presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer, p. ej., MRD, que comprende administrar un agente quimioterapéutico en combinación con una célula que expresa CAR, p. ej., tal como se describe en esta memoria.
- En un caso, el agente quimioterapéutico se administra antes de la administración de la célula que expresa una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria. En regímenes quimioterapéuticos en los que se desea más de una administración del agente quimioterapéutico, el régimen quimioterapéutico se inicia o completa antes de la administración de una célula que expresa una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria. En casos, el agente quimioterapéutico se administra al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 20 días, 25 días o 30 días antes de la administración de la célula que expresa la molécula de CAR. En casos, el agente quimioterapéutico se administra al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 20 días, 25 días o 30 días antes de la administración de la célula que expresa la molécula de CAR. En casos, el agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico que aumenta la expresión de CD19, CD20 o CD22 en las células cancerosas, p. ej., las células tumorales, p. ej., en comparación con la expresión en células normales o no cancerosas. La expresión se puede determinar, por ejemplo, mediante tinción inmunohistoquímica o análisis de citometría de flujo. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico es citarabina (Ara-C).

Agentes anticancerosos de particular interés para combinaciones con los compuestos de la presente divulgación incluyen: antimetabolitos; fármacos que inhiben la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio o la quinasa p70S6 (FK506) o inhiben la quinasa p70S6; agentes alquilantes; inhibidores de mTOR; inmunomoduladores; antraciclina; alcaloides de la vinca; inhibidores del proteosoma; agonistas de G1TR; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; un inhibidor de la quinasa CDK4; un inhibidor de la quinasa BTK; un inhibidor de la quinasa MKN; un inhibidor de la quinasa DGK; o un virus oncolítico.

Antimetabolitos ejemplares incluyen, sin limitación, antagonistas del ácido fólico (a los que también se alude en esta memoria como antifolatos), análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de la adenosina desaminasa): metotrexato (Rheumatrex®, Trexall®), 5-fluorouracilo (Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®), floxuridina (FUDF®), citarabina (Cytosar-U®, Tarabine PFS), 6-mercaptopurina (Puri-Nethol®), 6-tioguanina (Tioguanina Tabloid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), pentostatina (Nipent®), pemetrexed (Alimta®), raltitrexed (Tomudex®), cladribina (Leustatin®), clofarabina (Clofarex®, Clolar®), mercaptopurina (Puri-Nethol®), capecitabina (Xeloda®), nelarabina (Arranon®), azacitidina (Vidaza®) y gemcitabina (Gemzar®). Antimetabolitos preferidos incluyen, p. ej., 5-fluorouracilo (Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®), floxuridina (FUDF®), capecitabina (Xeloda®), pemetrexed (Alimta®), raltitrexed (Tomudex®) y gemcitabina (Gemzar®).

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con fludarabina, ciclofosfamida y/o rituximab. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR). En casos, el sujeto tiene CLL. Por ejemplo, el sujeto tiene una deleción en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). En casos, el sujeto comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En otros casos, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En casos, la fludarabina se administra en una dosis de aproximadamente 10-50 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, o 45-50 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa. En casos, la ciclofosfamida se administra en una dosificación de aproximadamente 200-300 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., aproximadamente 200-225, 225-250, 250-275 o 275-300 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa. En casos, el rituximab se administra en una dosificación de aproximadamente 400-600 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa.

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con bendamustina y rituximab. En casos, el sujeto tiene CLL. Por ejemplo, el sujeto tiene una deleción en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). En casos, el sujeto comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En otros casos, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En casos, la bendamustina se administra en una dosificación de aproximadamente 70-110 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 70-80, 80-90, 90-100 o 100-110 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa. En casos, el rituximab se administra en una dosificación de aproximadamente 400-600 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 400-450, 450-500, 500-550 o 550-600 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa.

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y/o un corticosteroide (p. ej., prednisona). En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP). En realizaciones, el sujeto tiene linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). En casos, el sujeto tiene DLBCL en estadio limitado no voluminoso (p. ej., comprende un tumor que tiene un tamaño/diámetro de menos de 7 cm). En casos, el sujeto es tratado con radiación en combinación con R-CHOP. Por ejemplo, al sujeto se le administra R-CHOP (p. ej., 1-6 ciclos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de R-CHOP), seguido de radiación. En algunos casos, al sujeto se le administra R-CHOP (p. ej., 1-6 ciclos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o 6 ciclos de R-CHOP) después de la radiación.

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y/o rituximab. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con etopósido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y rituximab (EPOCH-R). En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con dosis ajustada de EPOCH-R (DA-EPOCH-R). En casos, el sujeto tiene un linfoma de células B, p. ej., un linfoma agresivo de células B con reordenamiento de Myc.

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con rituximab y/o lenalidomida. Lenalidomida ((*RS*)-3-(4-amino-1-oxo 1,3-dihidro-2*H*-isoindol- 2-il)piperidina-2,6-diona) es un inmunomodulador. En

casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con rituximab y lenalidomida. En casos, el sujeto tiene linfoma linfoma folicular (FL) o linfoma de células del manto (MCL). En casos, el sujeto tiene FL y no ha sido tratado previamente con una terapia contra el cáncer. En casos, lenalidomida se administra en una dosificación de aproximadamente 10-20 mg (p. ej., 10-15 o 15-20 mg), p. ej., diariamente. En casos, rituximab se administra en una dosificación de aproximadamente 350-550 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa.

Inhibidores de mTOR ejemplares incluyen, p. ej., temsirolimus; ridaforolimus (anteriormente conocido como deferolimus, dimetilfosfato de (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2 [(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*,23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23, 29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0<sup>4,9</sup>] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la Publicación PCT N° WO 03/064383); everolimus (Afinitor® o RAD001); rapamicina (AY22989, Sirolimus®); simapimod (CAS 164301-51-3); emsirolimus, (5-{2,4-bis[(3*S*)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-il]-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[*trans*-4-(2-hidroxi-2-oxo-1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4*H*-1-benzopiran-2-il)]morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L- $\alpha$ -aspartil-L-serina-, sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1) (SEQ ID NO:

134), y XL765.

Inmunomoduladores ejemplares incluyen, p. ej., afutuzumab (disponible de Roche®); pegfilgrastim (Neulasta®); lenalidomida (CC-5013, Revlimid®); talidomida (Thalomid®), pomelidomida, actimid (CC4047); e IRX-2 (mezcla de citoquinas humanas que incluyen interleuquina 1, interleuquina 2 e interferón  $\gamma$ , CAS 951209-71-5, disponible de IRX Therapeutics).

Antraciclinas ejemplares incluyen, p. ej., doxorubicina (Adriamycin® y Rubex®); bleomicina (lenoxane®); daunorubicina (hidrocloruro de dauorubicina, daunomicina e hidrocloruro de rubidomicina, Cerubidine®); daunorubicina liposomal (liposoma de citrato de daunorubicina, DaunoXome®); mitoxantrona (DHAD, Novantrone®); epirubicina (Ellence™); idarrubicina (Idamycin®, Idamycin PFS®); mitomicina C (Mutamycin®); geldanamicina; herbimicina; ravidomicina; y desacetilravidomicina.

Alcaloides de la vinca ejemplares incluyen, p. ej., tartrato de vinorelbina (Navelbine®), vincristina (Oncovin®) y vindesina (Eldisine®); vinblastina (también conocida como sulfato de vinblastina, vincaléukoblastina y VLB, Alkaban-AQ® y Velban®); y vinorelbina (Navelbine®).

Inhibidores de proteosoma ejemplares incluyen bortezomib (Velcade®); carfilzomib (PX-171-007, (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)-pentanamida); marizomib (NPI-0052); citrato de ixazomib (MLN-9708); delanzomib (CEP-18770); y O-metil-N-[(2-metil-5-tiazolil)carbonil]-L-seril-O-metil-N-[(1*S*)-2-[(2*R*)-2-metil-2-oxiranil]-2-oxo-1-(fenilmetil)etil]-L-serinamida (ONX-0912).

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con brentuximab. Brentuximab es un conjugado anticuerpo-fármaco de anticuerpo anti-CD30 y monometil auristatina E. En casos, el sujeto tiene linfoma de Hodgkin (HL), p. ej., HL recidivante o refractario. En casos, el sujeto comprende CD30+ HL. En casos, el sujeto ha sido sometido a un trasplante autólogo de células madre (ASCT). En casos, el sujeto no ha sido sometido a un ASCT. En casos brentuximab se administra en una dosificación de aproximadamente 1-3 mg/kg (p. ej., aproximadamente 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5 o 2,5-3 mg/kg, p. ej., por vía intravenosa, p. ej., cada 3 semanas.

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con brentuximab y dacarbazina o en combinación con brentuximab y bendamustina. Dacarbazina es un agente alquilante con un nombre químico de 5-(3,3-dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida. Bendamustina es un agente alquilante con un nombre químico de ácido 4-[5-[bis(2-cloroetil)amino]-1-metilbencimidazol-2-il]butanoico. En casos, el sujeto tiene linfoma de Hodgkin (HL). En casos, el sujeto no ha sido tratado previamente con una terapia contra el cáncer. En casos, el sujeto tiene al menos 60 años de edad, p. ej., 60, 65, 70, 75, 80, 85 o más. En casos, dacarbazina se administra en una dosificación de aproximadamente 300-450 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 300-325, 325-350, 350-375, 375-400, 400-425 o 425-450 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa. En casos, bendamustina se administra en una dosificación de aproximadamente 75-125 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 75-100 o 100-125 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., aproximadamente 90 mg/m<sup>2</sup>, p. ej., por vía intravenosa. En casos brentuximab se administra en una dosificación de aproximadamente 1-3 mg/kg (p. ej., aproximadamente 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5 o 2,5-3 mg/kg, p. ej., por vía intravenosa, p. ej., cada 3 semanas.

En algunos casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de

CD20, p. ej., un anticuerpo anti-CD20 (p. ej., un anticuerpo anti-CD20 mono- o bi-específico) o un fragmento del mismo. Anticuerpos anti-CD20 ejemplares incluyen, pero no se limitan a rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, veltuzumab, obinutuzumab, TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), ocaratuzumab y Pro131921 (Genentech). Véase, p. ej., Lim et al. *Haematologica*. 95.1(2010):135-43.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende rituximab. Rituximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa quimérico de ratón/ser humano que se une a CD20 y provoca la citólisis de una célula que expresa CD20, p. ej., tal como se describe en [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf). En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con rituximab. En casos, el sujeto tiene CLL o SLL.

En algunos casos, rituximab se administra por vía intravenosa, p. ej., como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada una de las infusiones proporciona aproximadamente 500-2000 mg (p. ej., aproximadamente 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900, o 1900-2000 mg) de rituximab. En algunos casos, rituximab se administra a una dosis de 150 mg/m<sup>2</sup> a 750 mg/m<sup>2</sup>, p. ej., aproximadamente 150-175 mg/m<sup>2</sup>, 175-200 mg/m<sup>2</sup>, 200-225 mg/m<sup>2</sup>, 225-250 mg/m<sup>2</sup>, 250-300 mg/m<sup>2</sup>, 300-325 mg/m<sup>2</sup>, 325-350 mg/m<sup>2</sup>, 350-375 mg/m<sup>2</sup>, 375-400 mg/m<sup>2</sup>, 400-425 mg/m<sup>2</sup>, 425-450 mg/m<sup>2</sup>, 450-475 mg/m<sup>2</sup>, 475-500 mg/m<sup>2</sup>, 500-525 mg/m<sup>2</sup>, 525-550 mg/m<sup>2</sup>, 550-575 mg/m<sup>2</sup>, 575-600 mg/m<sup>2</sup>, 600-625 mg/m<sup>2</sup>, 625-650 mg/m<sup>2</sup>, 650-675 mg/m<sup>2</sup> o 675-700 mg/m<sup>2</sup>, en que m<sup>2</sup> indica el área de superficie corporal del sujeto. En algunos casos, rituximab se administra en un intervalo de dosificaciones de al menos 4 días, p. ej., 4, 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, rituximab se administra en un intervalo de dosificaciones de al menos 0,5 semanas, p. ej., 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas o más. En algunos casos, rituximab se administra a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en esta memoria durante un período de tiempo, p. ej., al menos 2 semanas, p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 semanas o más. Por ejemplo, rituximab se administra a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en esta memoria durante un total de al menos 4 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende ofatumumab. Ofatumumab es un anticuerpo monoclonal humano anti-CD20 IgG1k con un peso molecular de aproximadamente 149 kDa. Por ejemplo, ofatumumab se genera utilizando tecnología de ratón transgénico e hibridoma y se expresa y purifica a partir de una línea celular murina recombinante (NS0). Véase, p. ej., [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/125326lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125326lbl.pdf), y las Identificaciones de Ensayo Clínico números NCT01363128, NCT01515176, NCT01626352 y NCT01397591. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con ofatumumab. En casos, el sujeto tiene CLL o SLL.

En algunos casos, ofatumumab se administra como una infusión intravenosa. Por ejemplo, cada una de las infusiones proporciona aproximadamente 150-3000 mg (p. ej., aproximadamente 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1200, 1200-1400, 1400-1600, 1600-1800, 1800-2000, 2000-2200, 2200-2400, 2400-2600, 2600-2800, o 2800-3000 mg) de ofatumumab. En casos, ofatumumab se administra a una dosificación de partida de aproximadamente 300 mg, seguida de 2000 mg, p. ej., durante aproximadamente 11 dosis, p. ej., durante 24 semanas. En algunos casos, ofatumumab se administra en un intervalo de dosificaciones de al menos 4 días, p. ej., 4, 7, 14, 21, 28, 35 días o más. Por ejemplo, ofatumumab se administra en un intervalo de dosificaciones de al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 semanas o más. En algunos casos, ofatumumab se administra a una dosis y un intervalo de dosificación descritos en esta memoria durante un período de tiempo, p. ej., al menos 1 semana, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o 1, 2, 3, 4, 5 años o más. Por ejemplo, ofatumumab se administra a una dosis y un intervalo de dosificaciones descritos en esta memoria durante un total de al menos 2 dosis por ciclo de tratamiento (p. ej., al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, o más dosis por ciclo de tratamiento).

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende ocrelizumab. Ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado, p. ej., como se describe en los Identificadores de Ensayo Clínico N°s NCT00077870, NCT01412333, NCT00779220, NCT00673920, NCT01194570, y Kappos et al. *Lancet*. 19.378(2011):1779-87.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende veltuzumab. Veltuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra CD20. Véanse, p. ej., los Identificadores de Ensayo Clínico N°s NCT00547066, NCT00546793, NCT01101581, y Goldenberg et al. *Leuk Lymphoma*. 51(5)(2010):747-55.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende GA101. GA101 (también denominado obinutuzumab o RO5072759) es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado y glico-manipulado. Véase, p. ej., Robak. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 10.6(2009):588-96; Identificadores de Ensayo Clínico Números: NCT01995669, NCT01889797, NCT02229422 y NCT01414205; y [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2013/125486s000lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s000lbl.pdf).

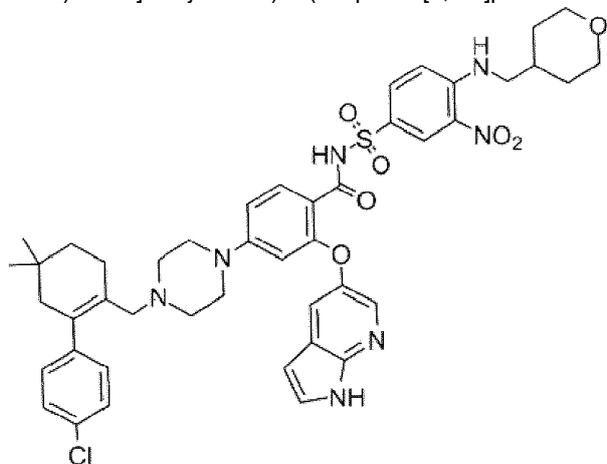
En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende AME-133v. AME-133v (también denominado LY2469298 u ocaratuzumab) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado contra CD20 con afinidad incrementada por el receptor FcγRIIIa y una actividad de citotoxicidad celular potenciada dependiente de anticuerpos (ADCC) en comparación con rituximab. Véase, p. ej., Robak et al. *BioDrugs* 25.1(2011):13-25; y Forero-Torres et al. *Clin. Cancer Res.* 18,5(2012):1395-403.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende PRO131921. PRO131921 es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado manipulado para tener una mejor unión a FcγRIIIa y ADCC potenciada en comparación con rituximab. Véase, p. ej., Robak et al. *BioDrugs* 25.1(2011):13-25; y Casulo et al. *Clin Immunol.* 154.1(2014):37-46; e Identificador de Ensayo Clínico N° NCT00452127.

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD20 comprende TRU-015. TRU-015 es una proteína de fusión anti-CD20 derivada de dominios de un anticuerpo contra CD20. TRU-015 es más pequeño que los anticuerpos monoclonales, pero conserva las funciones efectoras mediadas por Fc. Véase, p. ej., Robak et al. *BioDrugs* 25.1(2011): 13-25. TRU-015 contiene un fragmento variable de cadena sencilla anti-CD20 (scFv) enlazado a los dominios de bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana, pero carece de los dominios CH1 y CL.

En algunos casos, un anticuerpo anti-CD20 descrito en esta memoria se conjuga o se une de otro modo a un agente terapéutico, p. ej., un agente quimioterapéutico (p. ej., citoxano, fludarabina, inhibidor de histona desacetilasa, agente desmetilante, vacuna peptídica, antibiótico antitumoral, inhibidor de tirosina quinasa, agente alquilante, antimicrotúbulos o agente anti-mitótico), agente anti-alérgico, agente anti-náuseas (o anti-emético), analgésico o agente citoprotector descrito en esta memoria.

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de linfoma 2 de células B (BCL-2) (p. ej., venetoclax, también denominado ABT-199 o GDC-0199) y/o rituximab. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con venetoclax y rituximab. Venetoclax es una pequeña molécula que inhibe la proteína anti-apoptótica, BCL-2. La estructura de venetoclax (4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetilciclohex-1-en-1-il]metil)piperazin-1-il)-N-({3-nitro-4-[(tetrahidro-2H-piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1H-pirrol[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida) se muestra a continuación.



En casos, el sujeto tiene CLL. En casos, el sujeto tiene CLL recidivante, p. ej., al sujeto se le ha administrado previamente una terapia contra el cáncer. En casos, venetoclax se administra en una dosificación de aproximadamente 15-600 mg (p. ej., 15-20, 20-50, 50-75, 75-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500 o 500-600 mg), p. ej., diariamente. En casos, rituximab se administra a una dosis de aproximadamente 350-550 mg / m<sup>2</sup> (p. ej., 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg / m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa, p. ej., mensualmente.

En algunos casos, una o más células que expresan CAR descritas en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra en combinación con un virus oncolítico. En casos, los virus oncolíticos son capaces de replicarse selectivamente y desencadenar la muerte o ralentizar el crecimiento de una célula cancerosa. En algunos casos, los virus oncolíticos no tienen ningún efecto o tienen un efecto mínimo sobre las células no cancerosas. Un virus oncolítico incluye, pero no se limita a un adenovirus oncolítico, virus del herpes simple oncolítico, retrovirus oncolítico, parvovirus oncolítico, virus vaccinia oncolítico, virus Sinbis oncolítico, virus de la influenza oncolítico o virus del ARN oncolítico (p. ej., reovirus oncolítico del virus oncolítico de la enfermedad, de Newcastle (NDV), virus oncolítico del sarampión o virus oncolítico de la estomatitis vesicular (VSV)).

En algunos casos, el virus oncolítico es un virus, p. ej., un virus oncolítico recombinante, descrito en el documento US2010/0178684 A1. En algunos casos, un virus oncolítico recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico (p. ej., secuencia de ácido nucleico heteróloga) que codifica un inhibidor de una respuesta inmune o inflamatoria, p. ej., como se describe en el documento US2010/0178684 A1. En casos, el virus oncolítico recombinante, p. ej., NDV oncolítico, comprende una proteína pro-apoptótica (p. ej., apoptina), una citoquina (p. ej., GM-CSF, interferón-gamma, interleuquina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral alfa), una inmunoglobulina (p. ej., un anticuerpo contra la fibronectina de ED-B), un antígeno asociado al tumor, una proteína adaptadora biespecífica (p. ej., un anticuerpo biespecífico o un fragmento de anticuerpo dirigido contra la proteína NDV HN y un receptor coestimulador de células T, tal como CD3 o CD28; o proteína de fusión entre IL-2 humana y anticuerpo de cadena sencilla dirigido contra la proteína NDV HN). Véase, p. ej., Zamarin et al. *Future Microbiol.* 7.3(2012):347-67. En algunos casos, el virus oncolítico es un NDV oncolítico quimérico descrito en los documentos US 8591881 B2, US 2012/0122185 A1 o US 2014/0271677 A1.

En algunos casos, el virus oncolítico comprende un adenovirus replicativo condicional (CRAAd), que está diseñado para replicarse exclusivamente en células cancerosas. Véase, p. ej., Alemany et al. *Nature Biotechnol.* 18(2000):723-27. En algunos casos, un adenovirus oncolítico comprende uno descrito en la Tabla 1 en la página 725 de Alemany et al.

Virus oncolíticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a los siguientes:

Adenovirus oncolítico del grupo B (ColoAd1) (PsiOxus Therapeutics Ltd.) (véase, p. ej., el Identificador del Ensayo Clínico: NCT02053220);

ONCOS-102 (previamente denominado CGTG-102), que es un adenovirus que comprende factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Oncos Therapeutics) (véase, p. ej., el Identificador del Ensayo Clínico: NCT01598129);

VCN-01, que es un adenovirus humano oncolítico modificado genéticamente que codifica la hialuronidasa PH20 humana (VCN Biosciences, S.L.) (véase, p. ej., los Identificadores de Ensayo Clínico: NCT02045602 y NCT02045589);

Adenovirus condicionalmente replicativo ICOVIR-5, que es un virus derivado del adenovirus humano de tipo salvaje serotipo 5 (Had5) que ha sido modificado para replicarse selectivamente en células cancerosas con una vía desregulada de retinoblastoma/E2F (Institut Català d'Oncologia) (véase, p. ej., Identificador del Ensayo Clínico: NCT01864759);

Celyvir, que comprende células madre mesenquimales autólogas (CMM) derivadas de la médula ósea infectadas con ICOVIR5, un adenovirus oncolítico (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, España/Ramon Alemany) (véase, p. ej., Identificador del Ensayo Clínico: NCT01844661);

CG0070, que es un adenovirus oncolítico del serotipo 5 (Ad5) que se replica condicionalmente, en el que el promotor E2F-1 humano impulsa la expresión de los genes virales esenciales E1a, restringiendo con ello la replicación viral y la citotoxicidad a las células tumorales defectuosas en la vía Rb (Cold Genesys, Inc.) (véase, p. ej., Identificador del Ensayo Clínico: NCT02143804); o

DNX-2401 (anteriormente denominado Delta-24-RGD), que es un adenovirus que ha sido manipulado para replicarse selectivamente en células deficientes en la vía del retinoblastoma (Rb) y para infectar células que expresan determinadas integrinas que se unen a RGD de manera más eficiente (Clínica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNATRIX, Inc.) (véase, p. ej., Identificador del Ensayo Clínico: NCT01956734).

En algunos casos, un virus oncolítico descrito en esta memoria se administra mediante inyección, p. ej., inyección subcutánea, intraarterial, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. En casos, un virus oncolítico descrito en esta memoria se administra por vía intratumoral, transdérmica, transmucosal, oral, intranasal o vía administración pulmonar.

En un caso, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con una molécula que disminuye la población de células Treg. Métodos que disminuyen el número de (p. ej., agotan) células Treg son conocidos en la técnica e incluyen, p. ej., agotamiento de CD25, administración de ciclofosfamida, modulación de la función de GITR. Sin desear estar ligados por la teoría, se cree que la reducción del número de células Treg en un sujeto antes de la aféresis o antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria reduce el número de células inmunitarias no deseadas (p. ej., Tregs) en el microentorno del tumor y reduce el riesgo de recaída para el sujeto. En un caso, las células que expresan un CAR descrito en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administran a un sujeto en combinación con una molécula que fija como objetivo GITR y/o modula las funciones de GITR, tales como un agonista de GITR y/o un anticuerpo de GITR que agota las células T reguladoras (Tregs). En casos, las células que expresan un CAR descrito en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administran a un sujeto en combinación con ciclofosfamida. En un caso, las moléculas de unión a GITR y/o moléculas que modulan las funciones de GITR (p. ej., agonista de GITR y/o anticuerpos de GITR que agotan Treg) se administran antes de la administración de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un caso, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En casos, la ciclofosfamida se administra al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o re-infusión) de la célula CAR que expresan o antes de la aféresis de las células. En casos, la ciclofosfamida y un anticuerpo anti-GITR se administran al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o re-infusión) de la célula que expresa CAR o antes de

la aféresis de las células. En un caso, el sujeto tiene cáncer (p. ej., un cáncer sólido o un cáncer hematológico tal como ALL o CLL). En un caso, el sujeto tiene CLL. En casos, el sujeto tiene ALL. En casos, el sujeto tiene un cáncer sólido, p. ej., un cáncer sólido descrito en esta memoria.

5 Agonistas de G1TR ejemplares incluyen, p. ej., proteínas de fusión G1TR y anticuerpos anti-G1TR (p. ej., anticuerpos anti-G1TR bivalentes), tales como, p. ej., una proteína de fusión G1TR descrita en la Patente de EE.UU. Nº: 6.111.090, Patente Europea Nº: 090505B1, Patente de EE.UU. Nº: 8.586.023, Publicaciones PCT Nºs: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-G1TR descrito, p. ej., en la Patente de EE.UU. Nº: 7.025.962, Patente Europea Nº: 1947183B1, Patente de EE.UU. Nº: 7.812.135, Patente de EE.UU. Nº: 8.388.967, Patente de EE.UU. Nº: 8.591.886, 10 Patente Europea Nº: EP 1866339, Publicación PCT Nº: WO 2011/028683, Publicación PCT Nº: WO 2013/039954, Publicación PCT Nº: WO2005/007190, Publicación PCT Nº: WO 2007/133822, Publicación PCT Nº: WO2005/055808, Publicación PCT Nº: WO 99/40196, Publicación PCT Nº: WO 2001/03720, Publicación PCT Nº: WO99/20758, Publicación PCT Nº: WO2006/083289, Publicación PCT Nº: WO 2005/115451, Patente de EE.UU. Nº: 7.618.632, y Publicación PCT Nº: WO 2011/051726.

15 En un caso, la combinación de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria y un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un agonista de G1TR, p. ej., un agonista de G1TR descrito en esta memoria. En un caso, el agonista de G1TR se administra antes que la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un caso, el agonista de G1TR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En un caso, el 20 sujeto tiene CLL.

En un caso, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de proteína 25 tirosina fosfatasa, p. ej., un inhibidor de proteína tirosina fosfatasa descrito en esta memoria. En un caso, el inhibidor de proteína tirosina fosfatasa es un inhibidor de SHP-1, p. ej., un inhibidor de SHP-1 descrito en esta memoria, tal como, p. ej., estibogluconato de sodio. En un caso, el inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa es un inhibidor de SHP-2, p. ej., un inhibidor de SHP-2 descrito en esta memoria.

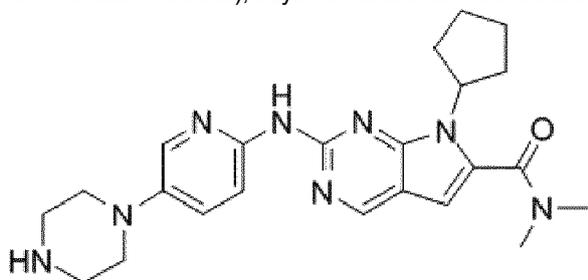
30 En un caso, una célula que expresa CAR CD19 descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se puede utilizar en combinación con otro inhibidor de quinasa. En un caso el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4, p. ej., un inhibidor de CDK4 descrito en esta memoria, p. ej., un inhibidor de CD4/6, tal como, p. ej., 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino) -8H-pirido [2,3-*d*]pirimidin-7-ona, hidrocloreuro (al que también se alude como palbociclib o PD0332991). En un caso, el inhibidor 35 de quinasa es un inhibidor de BTK, p. ej., un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, tal como, p. ej., ibrutinib. En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR descrito en esta memoria, tal como, p. ej., rapamicina, un análogo de rapamicina, OSI-027. El inhibidor de mTOR puede ser, p. ej., un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2, p. ej., un inhibidor de mTORC1 y/o un inhibidor de mTORC2 descrito en esta memoria. En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de MNK, p. ej., un inhibidor de MNK descrito en esta memoria, tal como, p. ej., 4-amino-5-(4-fluoroanilino)-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina. El inhibidor de MNK puede ser, p. ej., 40 un inhibidor de MNK1a, MNK1b, MNK2a y/o MNK2b.

En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4 seleccionado de aloisina A; flavopiridol o HMR-1275, 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(3S,4R)-3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil]-4-cromenona; crizotinib (PF-02341066; 2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-[(2R,3S)-2-(hidroximetil)-1-metil-3-pirrolidinil]- 4H-1-benzopiran-4-ona, hidrocloreuro (P276- 45 00); 1-metil-5-[[2-[5-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il]-4-piridinil]oxi]-N-[4-(trifluorometil)fenil]-1H-bencimidazol-2-amina (RAF265); indisulam (E7070); roscovitina (CYC202); palbociclib (PD0332991); dinaciclib (SCH727965); N-[5-[[[5-*tert*-butiloxazol-2-il]metil]hio]tiazol-2-il]piperidina-4-carboxamida (BMS 387032); ácido 4-[[9-cloro-7-(2,6-difluorofenil)-5H-pirimidol[5,4-*d*]2]benzazepin-2-il]amino]-benzoico (MLN8054); 5-[3-(4,6-difluoro-1H-bencimidazol-2-il)-1H-indazol-5-il]-N-etil-4-metil-3-piridinametanamina (AG-024322); N-(piperidin-4-il)amida del ácido 4-(2,6-diclorobenzoilamino)-1H-pirazol-3-carboxílico, (AT7519); 4-[2-metil-1-(1-metiletil)-1H-imidazol-5-il]-N-[4-(metilsulfonil)fenil]-2-pirimidinamina (AZD5438); y XL281 (BMS908662).

55 En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de CDK4, p. ej., palbociclib (PD0332991), y el palbociclib se administra en una dosis de aproximadamente 50 mg, 60 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 105 mg, 110 mg, 115 mg, 120 mg, 125 mg, 130 mg, 135 mg (p. ej., 75 mg, 100 mg o 125 mg) al día durante un período de tiempo, p. ej., diariamente durante 14- 21 días de un ciclo de 28 días, o diariamente durante 7-12 días de un ciclo de 21 días. En un caso, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de palbociclib.

60 En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) 4 o 6, p. ej., un inhibidor de CDK4 o un inhibidor de CDK6 descritos en esta memoria. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de CDK4/6 (p. ej., un inhibidor que fija como objetivo tanto a CDK4 como a CDK6), p. ej., un inhibidor de CDK4/6 descrito en esta memoria. En un caso, el sujeto tiene MCL. El MCL es un cáncer agresivo que responde poco a las terapias actualmente disponibles, es decir, es esencialmente incurable. En muchos casos de MCL, la ciclina D1

(un regulador de CDK4/6) se expresa (p. ej., debido a la translocación cromosómica que implica genes de inmunoglobulina y ciclina D1) en células MCL. Por lo tanto, sin estar ligados por la teoría, se cree que las células MCL son muy sensibles a la inhibición de CDK4/6 con alta especificidad (es decir, efecto mínimo sobre las células inmunitarias normales). Inhibidores de CDK4/6 solos han tenido cierta eficacia en el tratamiento del MCL, pero solo han logrado una remisión parcial con una alta tasa de recaída. Un inhibidor de CDK4/6 ejemplar es LEE011 (también denominado ribociclib), cuya estructura se muestra a continuación.



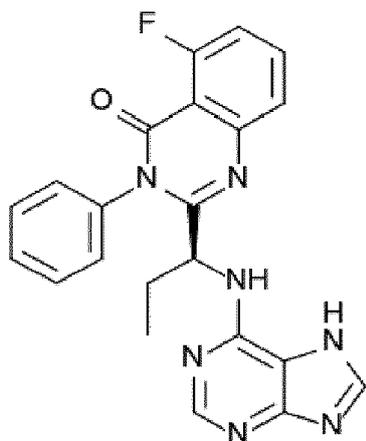
Sin estar ligados por la teoría, se cree que la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), con un inhibidor de CDK4/6 (p. ej., LEE011 u otro Inhibidor de CDK4/6 descrito en esta memoria) puede lograr una mayor capacidad de respuesta, p. ej., con tasas de remisión más altas y/o tasas de recaída más bajas, p. ej., en comparación con un inhibidor de CDK4/6 solo.

En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR seleccionado de temsirolimus; ridaforolimus dimetilfosfinato de (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2 [(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*, 23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23, 29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669; everolimus (RAD001); rapamicina (AY22989); simapimod; (5-{2,4-bis[(3*S*)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-il]-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[*trans*-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metilpirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-ona (PF04691502); y *N*<sup>2</sup>-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4*H*-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L- $\alpha$ -aspartil-L-serina-, sal interna (SF1126) (SEQ ID NO: 134); y XL765.

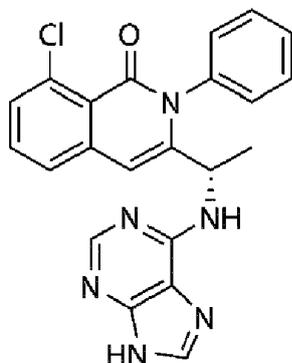
En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, p. ej., rapamicina y la rapamicina se administra a una dosis de aproximadamente 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg (p. ej., 6 mg) diariamente durante un período de tiempo, p. ej., diariamente durante un ciclo de 21 días o diariamente durante un ciclo de 28 días. En un caso, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de rapamicina. En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de mTOR, p. ej., everolimus, y el everolimus se administra en una dosis de aproximadamente 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg (p. ej., 10 mg) diariamente durante un período de tiempo, p. ej., diariamente durante un ciclo de 28 días. En un caso, se administran 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más ciclos de everolimus.

En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de MNK seleccionado de CGP052088; 4-amino-3-(*p*-fluorofenilamino)-pirazolo [3,4-*d*]pirimidina (CGP57380); cercosporamida; ETC-1780445-2; y 4-amino-5-(4-fluoroanilino)-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina.

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) (p. ej., un inhibidor de PI3K descrito en esta memoria, p. ej., idelalisib o duvelisib) y/o rituximab. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con idelalisib y rituximab. En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con duvelisib y rituximab. Idelalisib (también denominado GS-1101 o CAL-101; Gilead) es una molécula pequeña que bloquea la isoforma delta de PI3K. La estructura de idelalisib (5-fluoro-3-fenil-2-[(1*S*)-1-(7*H*-purin-6-ilamino)propil]-4(3*H*)-quinazolinona) se muestra a continuación



5 Duvelisib (también denominado IPI-145; Infinity Pharmaceuticals y Abbvie) es una molécula pequeña que bloquea PI3K- $\delta$ , $\gamma$ . La estructura de duvelisib (8-cloro-2-fenil-3-[(1S)-1-(9H-purin-6-ilamino)etil]-1(2H)-isoquinolinona) se muestra a continuación.



10 En casos, el sujeto tiene CLL. En casos, el sujeto tiene CLL en recaída, p. ej., al sujeto se le ha administrado previamente una terapia contra el cáncer (p. ej., se le ha administrado previamente un anticuerpo anti-CD20 o se le ha administrado previamente ibrutinib). Por ejemplo, el sujeto tiene una delección en el brazo corto del cromosoma 17 (del(17p), p. ej., en una célula leucémica). En otros ejemplos, el sujeto no tiene un del(17p). En casos, el sujeto comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En otros casos, el sujeto no comprende una célula leucémica que comprende una mutación en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IgV<sub>H</sub>*). En casos, el sujeto tiene una delección en el brazo largo del cromosoma 11 (del(11q). En otros casos, el sujeto no tiene un del(11q). En casos, idelalisib se administra en una dosificación de aproximadamente 100-400 mg (p. ej., 100-125, 125-150, 150-175, 175-200, 200-225, 225-250, 250-275, 275-300, 325-350, 350-375 o 375-400 mg), p. ej., BID. En casos, duvelisib se administra en una dosificación de aproximadamente 15-100 mg (p. ej., aproximadamente 15-25, 25-50, 50-75 o 75-100 mg), p. ej., dos veces al día. En casos, rituximab se administra en una dosificación de aproximadamente 350-550 mg/m<sup>2</sup> (p. ej., 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 o 475-500 mg/m<sup>2</sup>), p. ej., por vía intravenosa.

20 En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor dual de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y mTOR seleccionado de 2-amino-8-[*trans*-4-(2-hidroxi-etoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7(8*H*)-ona (PF-04691502); *N*-[4-[[4-(dimetilamino)-1-piperidinil]carbonil]fenil]-*N'*-[4-(4,6-di-4-morfolinil-1,3,5-triazin-2-il)fenil]urea (PF-05212384, PKI-587); 2-metil-2-{4-[3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidro-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-1-il]fenil}propanonitrilo (BEZ-235); apitolisib (GDC-0980, RG7422); 2,4-difluoro-*N*-{2-(metiloxi)-5-[4-(4-piridazinil)-6-quinolinil]-3-piridinil}bencenosulfonamida (GSK2126458); 8-(6-metoxipiridin-3-il)-3-metil-1-(4-(piperazin-1-il)-3-(trifluorometil)fenil)-1*H*-imidazo[4,5-*c*]quinolin-2(3*H*)-ona ácido maleico (NVP-BGT226); 3-[4-(4-morfolinil)pirido[3',2':4,5]fluoro[3,2-*d*]pirimidin-2-il]fenol (PI-103); 5-(9-isopropil-8-metil-2-morfolino-9*H*-purin-6-il)pirimidin-2-amina (VS-5584, SB2343); y *N*-[2-[(3,5-dimetoxifenil)amino]quinoxalin-3-il]-4-[(4-metil-3-metoxifenil)carbonil]aminofenilsulfonamida (XL765).

35 En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK). Quinasas ALK ejemplares incluyen, pero no se limitan a crizotinib (Pfizer), ceritinib (Novartis), alectinib (Chugai), brigatinib (también denominado AP26113; Ariad), entrectinib (Ignyta), PF-06463922 (Pfizer), TSR-011 (Tesar) (véase, p. ej., Identificador del Ensayo Clínico N° NCT02048488), CEP-37440 (Teva) y X-

396 (Xcovery). En algunos casos, el sujeto tiene un cáncer sólido, p. ej., un cáncer sólido descrito en esta memoria, p. ej., cáncer de pulmón.

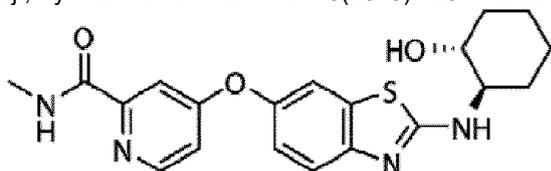
El nombre químico del crizotinib es 3-[(1*R*)-1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi]-5-(1-piperidin-4-ilpirazol-4-il)piridin-2-amina. El nombre químico de ceritinib es 5-cloro-*N*<sup>2</sup>-[2-isopropoxi-5-metil-4-(4-piperidinil)fenil]-*N*<sup>4</sup>-[2-(isopropilsulfonil)fenil]-2,4-pirimidinadiamina. El nombre químico de alectinib es 9-etil-6,6-dimetil-8-(4-morfolinopiperidin-1-il)-11-oxo-6,11-dihidro-5*H*-benzo[*b*]carbazol-3-carbonitrilo. El nombre químico de brigatinib es 5-cloro-*N*<sup>2</sup>-{4-[4-(dimetilamino)-1-piperidinil]-2-metoxifenil}-*N*<sup>4</sup>-[2-(dimetilfosforil)fenil]-2,4-pirimidinadiamina. El nombre químico de entrectinib es *N*-(5-(3,5-difluorobencil)-1*H*-indazol-3-il)-4-(4-metilpiperazin-1-il)-2-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)amino)benzamida. El nombre químico de PF-06463922 es (10*R*)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimetil-15-oxo-10,15,16,17-tetrahidro-2*H*-8,4-(meteno)pirazolo[4,3-*h*][2,5,11]-benzoxadiazacictetradecina-3-carbonitrilo. La estructura química de CEP-37440 es (S)-2-((5-cloro-2-((6-(4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il)-1-metoxi-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-benzo[7]anulen-2-il)amino)pirimidin-4-il)amino)-*N*-metilbenzamida. El nombre químico de X-396 es (R)-6-amino-5-(1-(2,6-dicloro-3-fluorofenil)etoxi)-*N*-(4-(4-metilpiperazina-1-carbonil)fenil)piridazina-3-carboxamida.

En un caso, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de ITK seleccionado de ibrutinib; *N*-(5-(5-(4-acetilpiperazina-1-carbonil)-4-metoxi-2-metilfeniltio)tiazol-2-il)-4-((3,3-dimetilbutan-2-ilamino)metil)benzamida (BMS-509744); 7-bencil-1-(3-(piperidin-1-il)propil)-2-(4-(piridin-4-il)fenil)-1*H*-imidazo[4,5-*g*]quinoxalin-6(5*H*)-ona (CTA056); *R*-3-(1-(1-acriloilpiperidin-3-il)-4-amino-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-3-il)-*N*-(3-metil-4-(1-metiletil))benzamida (PF-06465469).

También se pueden utilizar fármacos que inhiben la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). En un aspecto adicional, las composiciones de células de la presente divulgación pueden administrarse a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) del trasplante de médula ósea, terapia ablativa de células T utilizando agentes de quimioterapia tales como fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida y/o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En un aspecto, las composiciones de células de la presente divulgación se administran después de una terapia ablativa de células B, tales como agentes que reaccionan con CD20, p. ej., Rituxan. Por ejemplo, en un caso, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con alta dosis de quimioterapia, seguido de trasplante de células madre de la sangre periférica. En determinados casos, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las inmunitarias expandidas de la presente divulgación. En un caso adicional, células expandidas son administradas antes o después de la cirugía.

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). IDO es una enzima que cataliza la degradación del aminoácido L-triptófano a quinurenina. Muchos cánceres sobre-expresan IDO, p. ej., cáncer de próstata, colorrectal, pancreático, cervical, gástrico, ovárico, de cabeza y de pulmón. Los pDCs, macrófagos y células dendríticas (DC) pueden expresar IDO. Sin estar ligados por la teoría, se cree que una disminución de L-triptófano (p. ej., catalizada por IDO) resulta en un medio inmunosupresor mediante la inducción de anergia de células T y la apoptosis. Por lo tanto, sin estar ligados por la teoría, se cree que un inhibidor de IDO puede potenciar la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, p. ej., disminuyendo la supresión o muerte de una célula inmunitaria que expresa CAR. En casos, el sujeto tiene un tumor sólido, p. ej., un tumor sólido descrito en esta memoria, p. ej., cáncer de próstata, colorrectal, pancreático, cervical, gástrico, ovárico, de cabeza o de pulmón. Inhibidores de IDO ejemplares incluyen, pero no se limitan a 1-metil-triptófano, indoximod (NewLink Genetics) (véanse, p. ej., los Identificadores de Ensayo Clínico N°s NCT01191216; NCT01792050) e INCB024360 (Incyte Corp.) (véanse, p. ej., los Identificadores de Ensayo Clínico N°s NCT01604889; NCT01685255).

En casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un modulador de células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs). Las MDSCs se acumulan en la periferia y en el sitio del tumor de muchos tumores sólidos. Estas células suprimen las respuestas de las células T, impidiendo con ello la eficacia de la terapia con células que expresan CAR. Sin estar ligados por la teoría, se cree que la administración de un modulador de MDSC potencia la eficacia de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria. En un caso, el sujeto tiene un tumor sólido, p. ej., un tumor sólido descrito en esta memoria, p. ej., glioblastoma. Moduladores ejemplares de MDSCs incluyen, pero no se limitan a MCS110 y BLZ945. MCS110 es un anticuerpo monoclonal (mAb) contra el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Véase, p. ej., el Identificador de Ensayo Clínico N° NCT00757757. BLZ945 es un inhibidor de moléculas pequeñas del receptor del factor estimulador de colonias 1 (CSF1R). Véase, p. ej., Pyontek *et al.* Nat. Med. 19(2013):1264-72. La estructura de BLZ945 se muestra a continuación.



En algunos casos, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK tal como un compuesto de fórmula (I), se administra a un sujeto en combinación con un polipéptido de interleuquina-15 (IL-15), un polipéptido de interleuquina-15 del receptor alfa (IL-15Ra), o una combinación tanto de un polipéptido de IL-15 como de un polipéptido de IL-15Ra, p. ej., hetIL-15 (Admune Therapeutics, LLC). hetIL-15 es un complejo heterodimérico no covalente de IL-15 e IL-15Ra. hetIL-15 se describe, p. ej., en los documentos U.S. 8,124,084, U.S. 2012/0177598, U.S. 2009/0082299, U.S. 2012/0141413 y U.S. 2011/0081311. En casos, het-IL-15 se administra por vía subcutánea. En casos, el sujeto tiene un cáncer, p. ej., un cáncer sólido, p. ej., melanoma o cáncer de colon. En casos, el sujeto tiene un cáncer metastásico.

En casos, a un sujeto que tiene una enfermedad descrita en esta memoria, p. ej., un trastorno hematológico, p. ej., AML o MDS, se le administra una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), en combinación con un agente, p. ej., un agente citotóxico o de quimioterapia, una terapia biológica (p. ej., un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo monoclonal o una terapia celular) o un inhibidor (p. ej., un inhibidor de quinasa). En casos, al sujeto se le administra una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), en combinación con un agente citotóxico, p. ej., CPX-351 (Celator Pharmaceuticals), citarabina, daunorrubicina, vosaroxina (Sunesis Pharmaceuticals), sapacitabina (Cyclacel Pharmaceuticals), idarubicina o mitoxantrona. CPX-351 es una formulación liposomal que comprende citarabina y daunorrubicina en una relación molar de 5:1. En casos, al sujeto se le administra una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), en combinación con un agente hipometilante, p. ej., un inhibidor de ADN metiltransferasa, p. ej., azacitidina o decitabina. En casos, al sujeto se le administra una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), en combinación con una terapia biológica, p. ej., un anticuerpo o terapia celular, p. ej., 225Ac-lintuzumab (Actimab-A; Actinium Pharmaceuticals), IPH2102 (Innate Pharma / Bristol Myers Squibb), SGN-CD33A (Seattle Genetics) o gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg; Pfizer). SGN-CD33A es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende un dímero de pirrolobenzodiazepina que está unido a un anticuerpo anti-CD33. Actimab-A es un anticuerpo anti-CD33 (lintuzumab) marcado con actinio. IPH2102 es un anticuerpo monoclonal que fija como objetivo receptores tipo inmunoglobulinas asesinas (KIRs). En casos, al sujeto se le administra una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), en combinación con un inhibidor de FLT3, p. ej., sorafenib (Bayer), midostaurina (Novartis), quizartinib (Daiichi Sankyo), crenolanib (Arog Pharmaceuticals), PLX3397 (Daiichi Sankyo), AKN-028 (Akinion Pharmaceuticals) o ASP2215 (Astellas). En casos, al sujeto se le administra una célula que expresa CAR descrita en esta memoria en combinación con un inhibidor de isocitrato deshidrogenasa (IDH), p. ej., AG-221 (Celgene/Agios) o AG-120 (Agios/Celgene). En casos, al sujeto se le administra una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), en combinación con un regulador del ciclo celular, p. ej., inhibidor de quinasa tipo polo 1. (Plk1), p. ej., volasertib (Boehringer Ingelheim); o un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 9 (Cdk9), p. ej., alvocidib (Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis). En casos, al sujeto se le administra una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), en combinación con un inhibidor de la aminopeptidasa M1, p. ej., tosedostat (CTI BioPharma/Vernalis); un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC), p. ej., pracinostat (MEI Pharma); un inhibidor de múltiples quinasas, p. ej., rigosertib (Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio); o un agonista inverso peptídico de CXCR4, p. ej., BL-8040 (BioLineRx).

En otro caso, los sujetos reciben una infusión de la célula que expresa CAR, p. ej., la célula que expresa CAR CD19, composiciones de la presente divulgación, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), antes del trasplante, p. ej., trasplante alogénico de células madre, de células. En un caso preferido, las células que expresan CAR expresan transitoriamente el CAR, p. ej., mediante electroporación de un ARNm de CAR, por lo que la expresión del antígeno fijado como objetivo por el CAR, p. ej., CD19, se termina antes de la infusión de células madre del donante para evitar el fallo del injerto.

En un caso, al sujeto se le puede administrar un agente que reduce o mejora un efecto secundario asociado con la administración de una célula que expresa CAR. Efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa CAR incluyen, pero no se limitan a CRS y linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), también denominado síndrome de activación de macrófagos (MAS). Los síntomas de CRS incluyen fiebre alta, náuseas, hipotensión transitoria, hipoxia y similares. Por consiguiente, los métodos descritos en esta memoria pueden comprender administrar una célula que expresa CAR descrita en esta memoria a un sujeto y administrar, además, un agente para gestionar niveles elevados de un factor soluble resultante del tratamiento con una célula que expresa CAR. En un caso, el factor soluble elevado en el sujeto es uno o más de los receptores de IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-6. Por lo tanto, un agente administrado para tratar este efecto secundario puede ser un agente que neutralice uno o más de estos

factores solubles. Ejemplos de agentes de este tipo incluyen, pero no se limitan a un esteroide (p. ej., corticosteroide), un inhibidor de TNF $\alpha$  y un inhibidor de IL-6. Un ejemplo de un inhibidor de TNF $\alpha$  es una molécula de anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , tal como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol y golimumab. Otro ejemplo de un inhibidor de TNF $\alpha$  es una proteína de fusión tal como entanercept. Los inhibidores de moléculas pequeñas de TNF $\alpha$  incluyen, pero no se limitan a derivados de xantina (p. ej., pentoxifilina) y bupropión. Un ejemplo de un inhibidor de IL-6 es una molécula de anticuerpo anti-IL-6 o molécula de anticuerpo anti-receptor de IL-6, tal como tocilizumab (toc), sarilumab, elsilimomab, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301 y FM101. En un caso, la molécula de anticuerpo anti-receptor de IL-6 es tocilizumab. Un ejemplo de un inhibidor basado en IL-1R es anakinra.

En casos, el agotamiento de linfoides se realiza en un sujeto, p. ej., antes de administrar una o más células que expresan un CAR descritas en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I). En casos, el agotamiento de linfoides comprende la administración de uno o más de melfalan, citoxano, ciclofosfamida y fludarabina.

En casos, se administra al sujeto una quimioterapia de agotamiento de linfoides antes, al mismo tiempo o después de la administración (p. ej., infusión) de células CAR, p. ej., las células descritas en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I). En un ejemplo, la quimioterapia de agotamiento de linfoides se administra al sujeto antes de la administración de células CAR, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I). Por ejemplo, la quimioterapia de agotamiento de linfoides finaliza 1-4 días (p. ej., 1, 2, 3 o 4 días) antes de la infusión de células CAR, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I). En casos, se administran múltiples dosis de células CAR, p. ej., tal como se describe en esta memoria. Por ejemplo, una dosis única comprende aproximadamente  $5 \times 10^8$  células CAR. En casos, se administra al sujeto una quimioterapia de agotamiento de linfoides antes, al mismo tiempo o después de la administración (p. ej., infusión) de células que expresan CAR tal como se describe en esta memoria, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I).

#### Inhibidores de Moléculas Inhibidoras/Inhibidores de Puntos de Control

En una realización, al sujeto se le puede administrar un agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Moléculas inhibidoras, p. ej., Muerte Programada 1 (PD1), pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de montar una respuesta efectora inmunitaria. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR (p. ej., TGFR beta). En casos, la célula que expresa CAR descrita en esta memoria comprende un receptor coestimulador de conmutación p. ej., como se describe en el documento WO 2013/019615.

Los métodos descritos en esta memoria pueden incluir la administración de una célula que expresa CAR, opcionalmente en combinación con un inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), en combinación con un inhibidor del punto de control. En un caso, el sujeto es un respondedor completo. En otro caso, el sujeto es un respondedor parcial o no respondedor y, p. ej., en algún caso, el inhibidor del punto de control se administra antes de la célula que expresa CAR, p. ej., dos semanas, 12 días, 10 días, 8 días, una semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día antes de la administración de la célula que expresa CAR. En algunos casos, el inhibidor del punto de control se administra al mismo tiempo que la célula que expresa CAR.

La inhibición de una molécula inhibidora, p. ej., mediante inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar el rendimiento de una célula que expresa CAR. En una realización, un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ácido nucleico inhibidor, p. ej., un ARNdc, p. ej., ARNip o ARNhc, repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR), una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) o una endonucleasa con dedos de zinc (ZFN), puede utilizarse para inhibir la expresión de una molécula inhibidora en la célula que expresa CAR. En una realización, el inhibidor es un ARNhc. En una realización, la molécula inhibidora es inhibida dentro de una célula que expresa CAR. En estas realizaciones, una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula inhibidora se enlaza al ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes del CAR

En una realización, una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., Inhibe, la función de las células T está operativamente enlazada a un promotor, p. ej., un promotor derivado de H1 o U6, de manera que la molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T se expresa, p. ej., se expresa dentro de una célula que expresa CAR. Véase, p. ej., Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA" Capítulo 3, en Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann y Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU., 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) Science 296: 550-553; Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T está

presente en el mismo vector, p. ej., un vector lentiviral, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes del CAR. En una realización de este tipo, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T se encuentra en el vector, p. ej., el vector lentiviral, 5'- o 3'- al ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes del CAR. La molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T se puede transcribir en la misma o diferente dirección que el ácido nucleico que codifica un componente, p. ej. tofos los componentes, del CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T está presente en un vector que es distinto del vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un componente, p. ej., todos los componentes del CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T que expresó transitoriamente dentro de una célula que expresa CAR. En una realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de ARNdc que inhibe la expresión de la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de la célula T se integra de forma estable en el genoma de una célula que expresa CAR. En una realización, la molécula que modula o regula, p. ej., inhibe, la función de las células T es PD-1.

En una realización, el inhibidor de una señal inhibidora puede ser, p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a una molécula inhibidora. Por ejemplo, el agente puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a PD1, PD-L1, PD-L2 o CTLA4 (p. ej., Ipilimumab (al que también se alude como MDX-010 y MDX-101, y comercializado como Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; Tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible de Pfizer, anteriormente conocido como ticilimumab, CP-675,206)). En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a TIM3. En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a LAG3. En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CEACAM (p. ej., CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5). En casos, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR, p. ej., un inhibidor de una molécula inhibidora, se administra en combinación con un CAR alogénico, p. ej., un CAR alogénico descrito en esta memoria (p. ej., descrito en la sección CAR Alogénico en esta memoria).

PD1 es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28 que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD1 se expresa en células B activadas, células T y células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 han demostrado regular a la baja la activación de células T tras la unión a PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). La inmunosupresión se puede revertir inhibiendo la interacción local de PD1 con PD-L1.

Se conocen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de PD1, PD-L1 y PD-L2 y pueden utilizarse en combinación con un CAR CD19 descrito en esta memoria. Por ejemplo, nivolumab (al que también se alude como BMS-936558 o MDX1106; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano que bloquea específicamente la PD1. Nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD1 se describen en los documentos US 8.008.449 y WO2006/121168. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal IgG1k humanizado que se une a PD1. Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD1 humanizados se describen en el documento WO2009/101611. Pembrolizumab (anteriormente conocido como lambrolizumab y al que también se alude como Keytruda, MK03475; Merck) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD1. Pembrolizumab y otros anticuerpos anti-PD1 humanizados se describen en los documentos US 8.354.509 y WO2009/114335. MEDI4736 (Medimmune) es un anticuerpo monoclonal humano que se une a PDL1 e inhibe la interacción del ligando con PD1. MDPL3280A (Genentech / Roche) es un anticuerpo monoclonal IgG1 optimizado para Fc humano que se une a PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 se describen en la Patente de EE.UU. N°: 7.943.743 y Publicación U.S. N°: 20120039906. Otros agentes de unión anti-PD-L1 incluyen YW243.55.S70 (las regiones variables de cadena pesada y ligera se muestran en SEQ ID NO 20 y 21 en el documento WO2010/077634) y MDX-1105 (al que también se alude como BMS-936559, y, p. ej., agentes de unión anti-PD-L1 descritos en el documento WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; p. ej., descrito en los documentos WO2010/027827 y WO2011/066342), es un receptor soluble de fusión PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD1 y B7-H1. Otros anticuerpos anti-PD1 incluyen AMP 514 (Amplimmune), entre otros, p. ej., anticuerpos anti-PD1 descritos en los documentos US 8.609.089, US 2010028330 y/o US 20120114649.

En algunas realizaciones, un inhibidor de PD1 descrito en esta memoria (p. ej., un anticuerpo PD1, p. ej., un anticuerpo PD1 descrito en esta memoria) se utiliza en combinación con un CAR CD19 descrito en esta memoria para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD19. En algunas realizaciones, un inhibidor de PD-L1 descrito en esta memoria (p. ej., un anticuerpo PD-L1, p. ej., un anticuerpo PD-L1 descrito en esta memoria) se utiliza en combinación con un CAR CD19 descrito en esta memoria para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD19. La enfermedad puede ser, p. ej., un linfoma tal como DLBCL que incluye DLBCL primario o DLBCL secundario. En algunas realizaciones, el sujeto tiene, o se identifica que tiene, al menos 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%,

50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de células cancerosas, p. ej., células DLBCL, que son CD3+/PD1+. En algunas realizaciones, el sujeto tiene, o se identifica que tiene poblaciones sustancialmente no solapanmtes de células CD19+ y células PD-L1+ en un cáncer, p. ej., el microentorno del cáncer. Por ejemplo, en algunas realizaciones, menos de 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% de células en el cáncer, p. ej., microentorno del cáncer, son doble positivos para CD19 y PD-L1.

En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con una combinación de un CAR CD19, un inhibidor de PD1 y un inhibidor de PD-L1. En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con una combinación de un CAR CD19, un inhibidor de PD1 y un inhibidor de CD3. En algunas realizaciones, el sujeto es tratado con una combinación de un CAR CD19, un inhibidor de PD1, un inhibidor de PD-L1 y un inhibidor de CD3.

En algunos casos, los métodos de esta memoria incluyen una etapa de ensayar células en una muestra biológica, p. ej., una muestra que comprende células DLBCL, para CD3 y/o PD-1 (p. ej., expresión de CD3 y/o PD-1). En algunos casos, los métodos incluyen una etapa de ensayar células en una muestra biológica, p. ej., una muestra que comprende células DLBCL, para CD19 y/o PD-L1 (p. ej., expresión de CD19 y/o PD-L1). En algunos casos, los métodos incluyen, p. ej., proporcionar una muestra que comprende células cancerosas y realizar una etapa de detección, p. ej., mediante inmunohistoquímica, para uno o más de CD3, PD-1, CD19 o PD-L1. Los métodos pueden comprender una etapa adicional de recomendar o administrar un tratamiento, p. ej., un tratamiento que comprende un CAR CD19.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo es una molécula de anticuerpo anti-PD-1 tal como se describe en el documento US 2015/0210769, titulado "Antibody Molecules to PD-1 and Uses Thereof.". En una realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs (o colectivamente todas las CDRs) de una región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido de cualquiera de BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clon-A, BAP049-Clon-B, BAP049-Clon-C, BAP049-Clon-D o BAP049-Clon-E; o como se describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0210769, o codificado por la secuencia de nucleótidos en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o superior idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente; o CDRs estrechamente relacionadas, p. ej., CDRs que son idénticas o que tienen al menos una alteración de aminoácidos, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (p. ej., sustituciones, deleciones o inserciones, p. ej., sustituciones conservadoras).

En aún otra realización, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en esta memoria, p. ej., un anticuerpo elegido de cualquiera de BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clon-A, BAP049-Clon-B, BAP049-Clon-C, BAP049-Clon-D, o BAP049-Clon-E; o como se describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0210769, o codificado por la secuencia de nucleótidos en la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o superior idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

TIM3 (célula T inmunoglobulina-3) también regula negativamente la función de las células T, en particular en células T CD4+ auxiliares 1 y células T CD8+ citotóxicas 1 secretoras de IFN-g, y juega un papel crítico en el agotamiento de células T. La inhibición de la interacción entre TIM3 y sus ligandos, p. ej., galectina-9 (Gal9), fosfatidilserina (PS) y HMGB1, puede aumentar la respuesta inmunitaria. Anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de TIM3 y sus ligandos están disponibles en la técnica y pueden utilizarse en combinación con un CAR CD19 descrito en esta memoria. Por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas pequeñas o inhibidores peptídicos que fijan como objetivo TIM3 se unen al dominio IgV de TIM3 para inhibir la interacción con sus ligandos. Anticuerpos y péptidos que inhiben TIM3 se describen en los documentos WO2013/006490 y US20100247521. Otros anticuerpos anti-TIM3 incluyen versiones humanizadas de RMT3-23 (descrito en Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71: 3540-3551) y el clon 8B.2C12 (descrito en Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541). Los anticuerpos biespecíficos que inhiben TIM3 y PD-1 se describen en el documento US20130156774.

En una realización, el anticuerpo anti-TIM3 o fragmento del mismo es una molécula de anticuerpo anti-TIM3 tal como se describe en el documento US 2015/0218274, titulado "Antibody Molecules to TIM3 and Uses Thereof.". En una realización, la molécula de anticuerpo anti-TIM3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs (o colectivamente todas las CDRs) de una región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido de cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 del documento US 2015/0218274; o codificado por la secuencia de nucleótidos en las Tablas 1-4; o una secuencia

sustancialmente idéntica (p. ej., al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o superior idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente, o CDRs estrechamente relacionadas, p. ej., CDRs que son idénticas o que tienen al menos una alteración de aminoácidos, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (p. ej., sustituciones, deleciones o inserciones, p. ej., sustituciones conservadoras).

En aún otra realización, la molécula de anticuerpo anti-TIM3 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en esta memoria, p. ej., un anticuerpo elegido de cualquiera de ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; o como se describe en las Tablas 1-4 del documento US 2015/0218274, o codificado por la secuencia de nucleótidos en las Tablas 1-4; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o superior idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En otras realizaciones, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR es un inhibidor de CEACAM (p. ej., un inhibidor de CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5). En una realización, el inhibidor de CEACAM es una molécula de anticuerpo anti-CEACAM. Se describen anticuerpos anti-CEACAM-1 ejemplares en los documentos WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251 y WO 2014/022332, p. ej., un anticuerpo monoclonal 34B1, 26H7 y 5F4; o una forma recombinante del mismo, tal como se describe, p. ej., en los documentos US 2004/0047858, US 7.132.255 y WO 99/052552. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CEACAM se une a CEACAM-5 tal como se describe, p. ej., en Zheng et al. *PLoS One*. 2 de septiembre de 2010;5(9). pii: e12529 (DOI:10.1371/journal.pone.0021146), o reacciona de forma cruzada con CEACAM-1 y CEACAM-5, tal como se describe en, p. ej., los documentos WO 2013/054331 y US 2014/0271618.

Sin desear estar ligados por la teoría, se cree que las moléculas de adhesión celular antígeno carcinoembrionario (CEACAM), tales como CEACAM-1 y CEACAM-5, median, al menos en parte, en la inhibición de una respuesta inmunitaria anti-tumoral (véase p. ej., Markel et al. *J Immunol*. 15 de marzo de 2002;168(6):2803-10; Markel et al. *J Immunol*. 1 de noviembre de 2006;177(9):6062-71; Markel et al. *Immunology*. 12 de febrero de 2009;126(2):186-200; Markel et al. *Cancer Immunol Immunother*. 10 de febrero de 2010;59(2):215-30; Ortenberg et al. *Mol Cancer Ther*. junio de 2012;11(6):1300-10; Stern et al. *J Immunol*. 1 de junio de 2005;174(11):6692-701; Zheng et al. *PLoS One*. 2 de septiembre de 2010;5(9). pii: e12529) Por ejemplo, CEACAM-1 se ha descrito como un ligando heterofílico para TIM-3 y como que desempeña un papel en la tolerancia y el agotamiento de las células T mediados por TIM-3 (véase, p. ej., el documento WO 2014/022332; Huang, et al. (2014) *Nature* doi:10.1038/nature13848) En realizaciones, se ha demostrado que el bloqueo conjunto de CEACAM-1 y TIM-3 potencia una respuesta inmunitaria antitumoral en modelos de cáncer colorrectal de xenoinjerto (véase, p. ej., el documento WO 2014/022332; Huang, et al. (2014), *supra*). En otras realizaciones, el bloqueo conjunto de CEACAM-1 y PD-1 reduce la tolerancia de las células T como se describe, p. ej., en el documento WO 2014/059251. Por lo tanto, los inhibidores de CEACAM se pueden utilizar con los otros inmunomoduladores descritos en esta memoria (p. ej., inhibidores anti-PD-1 y/o anti-TIM-3) para potenciar una respuesta inmunitaria contra un cáncer, p. ej., un melanoma, un cáncer de pulmón. (p. ej., NSCLC), un cáncer de vejiga, un cáncer de colon y un cáncer de ovario y otros cánceres tal como se describen en esta memoria.

LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos o CD223) es una molécula de la superficie celular expresada en células T activadas y células B que han demostrado jugar un papel en el agotamiento de las células T CD8+. Anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros inhibidores de LAG3 y sus ligandos están disponibles en la técnica y pueden utilizarse en combinación con un CAR CD19 descrito en esta memoria. Por ejemplo, BMS-986016 (Bristol-Myers Squib) es un anticuerpo monoclonal que fija como objetivo LAG3. IMP701 (Immutep) es un anticuerpo LAG3 antagonista e IMP731 (Immutep y GlaxoSmithKline) es un anticuerpo LAG3 de agotamiento. Otros inhibidores de LAG3 incluyen IMP321 (Immutep), que es una proteína de fusión recombinante de una porción soluble de LAG3 e Ig que se une a moléculas del MHC de clase II y activa las células presentadoras de antígenos (APC). Otros anticuerpos se describen, p. ej., en el documento WO2010/019570.

En una realización, el anticuerpo anti-LAG3 o fragmento del mismo es una molécula de anticuerpo anti-LAG3 tal como se describe en el documento US 2015/0259420, titulado "Antibody Molecules to LAG3 and Uses Thereof.". En una realización, la molécula de anticuerpo anti-LAG3 incluye al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs (o colectivamente todas las CDRs) de una región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo elegido de cualquiera de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050(Ser) (p. ej., BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser, o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050-Clon-H, BAP050-Clon-I, o BAP050-Clon-J; o como se describe en la Tabla 1 del documento US

2015/0259420; o codificado por la secuencia de nucleótidos en la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o superior idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente, o CDRs estrechamente relacionadas, p. ej., CDRs que son idénticas o que tienen al menos una alteración de aminoácidos, pero no más de dos, tres o cuatro alteraciones (p. ej., sustituciones, deleciones o inserciones, p. ej., sustituciones conservadoras).

En aún otra realización, la molécula de anticuerpo anti-LAG3 comprende al menos una, dos, tres o cuatro regiones variables de un anticuerpo descrito en esta memoria, p. ej., un anticuerpo elegido de cualquiera de BAP050-hum01, BAP050-hum02, BAP050-hum03, BAP050-hum04, BAP050-hum05, BAP050-hum06, BAP050-hum07, BAP050-hum08, BAP050-hum09, BAP050-hum10, BAP050-hum11, BAP050-hum12, BAP050-hum13, BAP050-hum14, BAP050-hum15, BAP050-hum16, BAP050-hum17, BAP050-hum18, BAP050-hum19, BAP050-hum20, huBAP050(Ser) (p. ej., BAP050-hum01-Ser, BAP050-hum02-Ser, BAP050-hum03-Ser, BAP050-hum04-Ser, BAP050-hum05-Ser, BAP050-hum06-Ser, BAP050-hum07-Ser, BAP050-hum08-Ser, BAP050-hum09-Ser, BAP050-hum10-Ser, BAP050-hum11-Ser, BAP050-hum12-Ser, BAP050-hum13-Ser, BAP050-hum14-Ser, BAP050-hum15-Ser, BAP050-hum18-Ser, BAP050-hum19-Ser, o BAP050-hum20-Ser), BAP050-Clon-F, BAP050-Clon-G, BAP050-Clon-H, BAP050-Clon-I, o BAP050-Clon-J; o como se describe en la Tabla 1 del documento US 2015/0259420, o codificado por la secuencia de nucleótidos en la Tabla 1; o una secuencia sustancialmente idéntica (p. ej., al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o superior idéntica) a cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente.

En algunas realizaciones, la terapia con CAR y el inhibidor de BTK se administran en combinación con un agonista del receptor de tipo toll (TLR). El agonista de TLR puede ser un agonista de TLR9. En algunas realizaciones, el agonista de TLR es un oligodesoxinucleótido, p. ej., un oligodesoxinucleótido enriquecido con CG, p. ej., un oligodesoxinucleótido enriquecido con CG no metilado. Véase, p. ej., Sagiv-Barfi et al., "Ibrutinib enhances the antitumor immune response induced by intratumoral injection of a TLR9 ligand in syngeneic mouse lymphoma model." Blood. 6 de febrero de 2015. pii: blood-2014-08-593137. En algunas realizaciones, el agonista de TLR se administra en combinación con una célula NK que expresa CAR. Sin estar ligados por la teoría, el agonista de TLR puede fomentar la activación de células NK tales como células NK que expresan CAR. En algunas realizaciones, el agonista de TLR se administra mediante inyección, p. ej., inyección intratumoral.

En algunas realizaciones, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR puede ser, p. ej., una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en donde el primer dominio es una molécula inhibidora, o fragmento de la misma, y el segundo dominio es un polipéptido que está asociado con una señal positiva, p. ej., un polipéptido que comprende un dominio de señalización intracelular tal como se describe en esta memoria. En algunas realizaciones, el polipéptido que está asociado con una señal positiva puede incluir un dominio coestimulador de CD28, CD27, ICOS, p. ej., un dominio de señalización intracelular de CD28, CD27 y/o ICOS, y/o un dominio de señalización primario, p. ej., de CD3 zeta, p. ej., descrito en esta memoria. En una realización, la proteína de fusión es expresada por la misma célula que expresó el CAR. En otra realización, la proteína de fusión es expresada por una célula, p. ej., una célula T que no expresa un CAR anti- CD19.

En una realización, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria es miR-17-92.

En una realización, el agente que potencia la actividad de un CAR descrito en esta memoria es una citoquina. Las citoquinas tienen importantes funciones relacionadas con la expansión, la diferenciación, la supervivencia y la homeostasis de las células T. Citoquinas que se pueden administrar al sujeto que recibe una célula que expresa CAR descritas en esta memoria incluyen: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-18 e IL-21, o una combinación de las mismas. En realizaciones preferidas, la citoquina administrada es IL-7, IL-15 o IL-21, o una combinación de las mismas. La citoquina se puede administrar una vez al día o más de una vez al día, p. ej., dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día. La citoquina se puede administrar durante más de un día, p. ej., la citoquina se administra durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. Por ejemplo, la citoquina se administra una vez al día durante 7 días.

En realizaciones, la citoquina se administra en combinación con una célula que expresa CAR. La citoquina se puede administrar de forma simultánea o concurrente con las células que expresan CAR, p. ej., administrada el mismo día. La citoquina se puede preparar en la misma composición farmacéutica que las células que expresan CAR, o se puede preparar en una composición farmacéutica separada. Alternativamente, la citoquina se puede administrar poco después de la administración de las células T que expresan CAR, p. ej., 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración de las células que expresan CAR. En realizaciones en las que la citoquina se administra en un régimen de dosificación que ocurre a lo largo de más de un día, el primer día del régimen de dosificación de la citoquina puede ser el mismo día de la administración con las células que expresan CAR, o el primer día de la dosificación de la citoquina, el régimen puede ser 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días después de la administración de las células T que expresan CAR. En una realización, el primer día, las células que expresan CAR se administran al sujeto, y el segundo día se administra una citoquina una vez al día durante los siguientes 7

días. En una realización preferida, la citoquina a administrar en combinación con las células que expresan CAR es IL-7, IL-15 y/o IL-21.

En otras realizaciones, la citoquina se administra un período de tiempo suficiente después de la administración de las células que expresan CAR, p. ej., al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 1 año o más después de la administración de células que expresan CAR. En una realización, la citoquina se administra después de la evaluación de la respuesta del sujeto a las células que expresan CAR. Por ejemplo, al sujeto se le administran células que expresan CAR de acuerdo con la dosificación y los regímenes descritos en esta memoria. La respuesta del sujeto a la terapia CART se evalúa a las 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 12 semanas, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o 1 año o más después de la administración de células que expresan CAR, utilizando cualquiera de los métodos descritos en esta memoria, incluyendo la inhibición del crecimiento del tumor, la reducción de las células tumorales circulantes o la regresión del tumor. A los sujetos que no muestran una respuesta suficiente a la terapia con CART se les puede administrar una citoquina. La administración de la citoquina al sujeto que tiene una respuesta sub-óptima a la terapia con CART mejora la eficacia de CART y/o la actividad antitumoral. En una realización preferida, la citoquina administrada después de la administración de células que expresan CAR es IL-7.

Terapias de combinación adicionales pueden incluir agentes antialérgicos, antieméticos, analgésicos, terapias adjuntas.

Algunos pacientes pueden experimentar reacciones alérgicas a los agentes terapéuticos descritos en esta memoria y/u otros agentes anticancerosos durante o después de la administración; por lo tanto, a menudo se administran agentes antialérgicos para minimizar el riesgo de una reacción alérgica. Agentes antialérgicos adecuados incluyen corticosteroides, tales como dexametasona (p. ej., Decadron®), beclometasona (p. ej., Beclovent®), hidrocortisona (también conocida como cortisona, succinato sódico de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona y vendida bajo los nombres comerciales Ala-Cort®), fosfato de hidrocortisona, Solu-Cortef®, Hydrocort Acetate® y Lanacort®), prednisolona (vendida bajo los nombres comerciales Delta-Cortel®, Orapred®, PEDIAPRED® y Prelone®), prednisona (vendida bajo los nombres comerciales Deltasone®, Liquid Red®, Meticorten® y Orasone®), metilprednisolona (también conocida como 6-metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, vendida bajo los nombres comerciales Duralone®, Medralone®, Medrol®, M-Prednisol® y Solu-Medrol®); antihistamínicos, tales como difenhidramina (p. ej., Benadryl®), hidroxizina y ciproheptadina; y broncodilatadores, tales como los agonistas del receptor beta-adrenérgico, albuterol (p. ej., Proventil®) y terbutalina (Brethine®).

Algunos pacientes pueden experimentar náuseas durante y después de la administración de los agentes terapéuticos descritos en esta memoria y/u otros agente o agentes anticancerosos; por lo tanto, los anti-eméticos se utilizan para prevenir las náuseas (parte superior del estómago) y los vómitos. Anti-eméticos adecuados incluyen aprepitant (Emend®), ondansetron (Zofran®), granisetron HCl (Kytril®), lorazepam (Ativan®), dexametasona (Decadron®), proclorperazina (Compazine®), casopitant (Rezonic® y Zunrisa®), y combinaciones de los mismos.

A menudo se prescribe medicación para aliviar el dolor experimentado durante el período de tratamiento para hacer que el paciente se sienta más cómodo. A menudo se utilizan analgésicos comunes de venta libre, tal como Tylenol®. Sin embargo, fármacos analgésicos opioides, tales como hidrocodona/paracetamol o hidrocodona/acetaminofen (p. ej., Vicodin®), morfina (p. ej., Astramorph® o Avinza®), oxycodona (p. ej., OxyContin® o Percocet®), hidrocloruro de oximorfona (Opana®), y fentanilo (p. ej., Duragesic®) también son útiles para el dolor moderado o severo.

En un esfuerzo por proteger las células normales de la toxicidad del tratamiento y limitar las toxicidades de los órganos, se pueden utilizar agentes citoprotectores (tales como neuroprotectores, eliminadores de radicales libres, cardioprotectores, neutralizadores de extravasación de antraciclina, nutrientes y similares) como terapia adjunta. Agentes citoprotectores adecuados incluyen Amifostina (Ethyol®), glutamina, dimesna (Tavocept®), mesna (Mesnex®), dexrazoxano (Zinecard® o Totect®), xaliproden (Xapрила®) y leucovorina (también conocida como leucovorina cálcica, factor citrovorum y ácido folínico).

La estructura de los compuestos activos identificados por números de código, nombres genéricos o comerciales puede tomarse de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o de bases de datos, p. ej., Patents International (p. ej., IMS World Publications).

Los compuestos arriba mencionados, que se pueden utilizar en combinación con un compuesto de la presente divulgación, se pueden preparar y administrar como se describe en la técnica, tal como en los documentos arriba citados.

En una realización, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la presente divulgación (p. ej., un compuesto de la presente divulgación) o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo junto con un soporte farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración a un sujeto humano o animal, ya sea solo o junto con otros agentes anticancerígenos.

5 En un caso, la presente divulgación proporciona métodos para tratar sujetos humanos o animales que padecen una enfermedad celular proliferativa, tal como el cáncer. La presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto humano o animal que necesita un tratamiento de este tipo, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente divulgación (p. ej., un compuesto de la presente divulgación) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, ya sea solo o en combinación con otros agentes anticancerígenos.

10 En particular, las composiciones se formularán juntas como una terapia de combinación o se administrarán por separado.

15 En la terapia de combinación, el compuesto de la presente divulgación y otros agente o agentes anticancerígenos pueden administrarse de forma simultánea, simultánea o secuencial sin límites de tiempo específicos, en donde una administración de este tipo proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente.

20 En un caso preferido, el compuesto de la presente divulgación y el o los otros agentes anticancerígenos se administran generalmente de forma secuencial en cualquier orden por infusión o por vía oral. El régimen de dosificación puede variar dependiendo de la fase de la enfermedad, la condición física del paciente, los perfiles de seguridad de los fármacos individuales y la tolerancia de los fármacos individuales, así como otros criterios bien conocidos por el médico tratante y el o los practicantes médicos que administran la combinación. El compuesto de la presente divulgación y otro u otros agentes anticancerígenos pueden administrarse con unos minutos de diferencia entre sí, con horas, días o incluso semanas de diferencia, dependiendo del ciclo particular que se utilice para el tratamiento. Además, el ciclo podría incluir la administración de un fármaco con más frecuencia que el otro durante el ciclo de tratamiento y en diferentes dosis por administración del fármaco.

25 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan kits que incluyen uno o más compuestos de la presente divulgación y un participante en la combinación tal como se describe en esta memoria. Kits representativos incluyen (a) un compuesto de la presente divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (b) al menos un participante en la combinación, p. ej., como se indica arriba, por lo que dicho kit puede comprender un prospecto u otro etiquetado que incluya instrucciones de administración.

30 Un compuesto de la presente divulgación también puede utilizarse con ventaja en combinación con procedimientos terapéuticos conocidos, p. ej., la administración de hormonas o, especialmente, radiación. Un compuesto de la presente divulgación puede utilizarse, en particular, como radiosensibilizador, especialmente para el tratamiento de tumores que exhiben poca sensibilidad a la radioterapia.

#### Combinación con una dosis baja de un inhibidor de mTOR

40 Los métodos descritos en esta memoria pueden utilizar una dosis baja, potenciadora de la inmunidad, de un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR alostérico, que incluye rapálogos tales como RAD001. La administración de una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR (p. ej., una dosis que es insuficiente para suprimir completamente el sistema inmunológico, pero suficiente para mejorar la función inmunológica) puede optimizar el rendimiento de las células efectoras inmunitarias, p. ej., células T o células que expresan CAR, en el sujeto. Métodos para medir la inhibición de mTOR, dosificaciones, regímenes de tratamiento y composiciones farmacéuticas adecuadas se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2015/0140036, presentada el 13 de noviembre de 2014.

50 En una realización, la administración de una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR puede resultar en uno o más de lo siguiente:

- i) una disminución en el número de células efectoras inmunitarias PD-1 positivas;
- ii) un aumento en el número de células efectoras inmunitarias PD-1 negativas;
- iii) un aumento en la relación de células efectoras inmunitarias PD-1 negativas/células efectoras inmunitarias PD-1 positivas;
- iv) un aumento en el número de células T naif;
- v) un aumento en la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD62L<sup>high</sup>, CD127<sup>high</sup>, CD27<sup>+</sup> y BCL2, p. ej., en células T de la memoria, p. ej., precursores de células T de la memoria;
- vi) una disminución en la expresión de KLRG1, p. ej., en células T de la memoria, p. ej., precursores de células T de la memoria; o
- 60 vii) un aumento en el número de precursores de células T de la memoria, p. ej., células con una cualquiera o una combinación de las siguientes características: CD62L<sup>alta</sup> incrementada, CD127<sup>alta</sup> incrementada, CD27<sup>+</sup> incrementada, KLRG1 reducida y BCL2 incrementada;

y en donde cualquiera de los anteriores, p. ej., i), ii), iii), iv), v), vi) o vii), ocurre, p. ej., al menos transitoriamente, p. ej., en comparación con un sujeto no tratado.

5 En otra realización, la administración de una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR da como resultado una proliferación incrementada o prolongada de células que expresan CAR, p. ej., en cultivo o en un sujeto, p. ej., en comparación con células que expresan CAR no tratadas o un sujeto no tratado. En realizaciones, la proliferación incrementada se asocia con un aumento en el número de células que expresan CAR. En otra realización, la administración de una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR da como resultado un exterminio incrementado de células cancerosas por parte de células que expresan CAR, p. ej., en cultivo o en un sujeto, p. ej., en comparación con células que expresan CAR no tratadas o un sujeto no tratado. En realizaciones, un exterminio incrementado de células cancerosas se asocia con una disminución del volumen del tumor.

15 En un caso, la célula que expresa una molécula de CAR, p. ej., una molécula de CAR descrita en esta memoria, se administra en combinación con una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico de un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor de mTOR alostérico, p. ej., RAD001, o un inhibidor de mTOR catalítico. Por ejemplo, la administración de la dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, del inhibidor de mTOR puede iniciarse antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria; completado antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria; iniciado al mismo tiempo que la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria; solapamiento con la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria; o continuar después de la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria.

25 Alternativamente o además, la administración de una dosis baja, potenciadora de la inmunidad, de un inhibidor de mTOR, puede optimizar las células efectoras inmunitarias para que sean manipuladas para expresar una molécula de CAR descrita en esta memoria. En tales casos, la administración de una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR, p. ej., un inhibidor alostérico, p. ej., RAD001, o un inhibidor catalítico, se inicia o completa antes de la recolección de células efectoras inmunitarias, p. ej., células T o células NK, a ser manipuladas para expresar una molécula de CAR descrita en esta memoria, a partir de un sujeto.

30 En otro caso, las células efectoras inmunitarias, p. ej., células T o células NK, a ser manipuladas para expresar una molécula de CAR descrita en esta memoria, p. ej., después de la recogida de un sujeto, o células efectoras inmunitarias que expresan CAR, p. ej., células T o células NK, p. ej., antes de la administración a un sujeto, puede cultivarse en presencia de una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR.

35 En una realización, administrar al sujeto una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR comprende administrar, p. ej., una vez a la semana, p. ej., en una forma de dosificación de liberación inmediata, 0,1 a 20, 0,5 a 10, 2,5 a 7,5, 3 a 6, o aproximadamente 5 mg de RAD001, o una dosis bioequivalente del mismo. En una realización, administrar al sujeto una dosis baja, potenciadora del sistema inmunológico, de un inhibidor de mTOR comprende administrar, p. ej., una vez a la semana, p. ej., en una forma de dosificación de liberación sostenida, 0,3 a 40 60, 1,5 a 30, 7,5 a 22,5, 9 a 18, o aproximadamente 15 mg de RAD001, o una dosis bioequivalente del mismo.

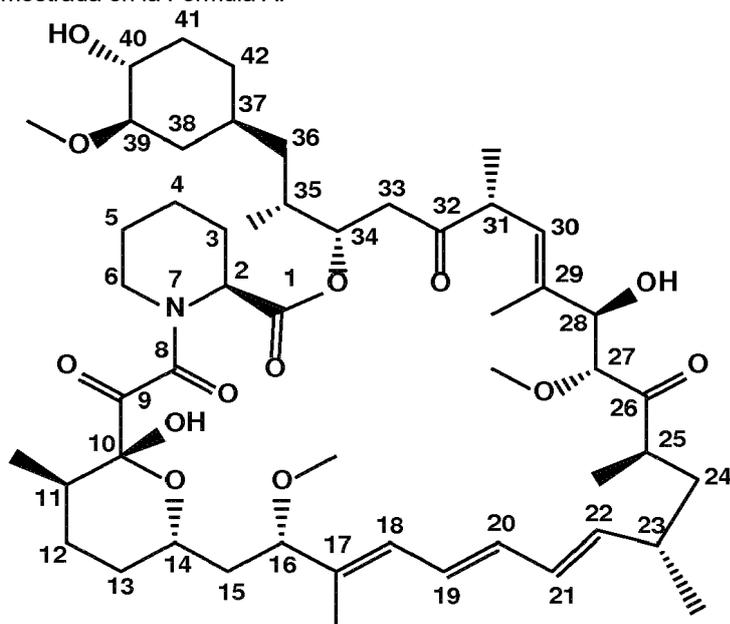
45 En una realización, una dosis de un inhibidor de mTOR se asocia con, o proporciona una inhibición de mTOR de al menos 5 pero no más del 90%, al menos 10 pero no más del 90%, al menos 15 pero no más del 90%, al menos 20 pero no más del 90%, al menos 30 pero no más del 90%, al menos 40 pero no más del 90%, al menos 50 pero no más del 90%, al menos 60 pero no más del 90%, al menos 70 pero no más del 90%, al menos 5 pero no más del 80%, al menos 10 pero no más del 80%, al menos 15 pero no más del 80%, al menos 20 pero no más del 80 %, al menos 30 pero no más del 80%, al menos 40 pero no más del 80%, al menos 50 pero no más del 80%, al menos 60 pero no más del 80%, al menos 5 pero no más del 70 %, al menos 10 pero no más del 70%, al menos 15 pero no más del 70%, al menos 20 pero no más del 70%, al menos 30 pero no más del 70%, al menos 40 pero no más del 70%, al menos 50 pero no más del 70%, al menos 5 pero no más del 60%, al menos 10 pero no más del 60%, al menos 15 pero no más del 60%, al menos 20 pero no más del 60%, al menos 30 pero no más del 60%, al menos 40 pero no más del 60%, al menos 5 pero no más del 50%, al menos 10 pero no más del 50%, al menos 15 pero no más del 50%, al menos 20 pero no más del 50%, al menos 30 pero no más del 50%, al menos 40 pero no más del 50%, al menos 5 pero no más del 40%, al menos 10 pero no más del 40%, al menos 15 pero no más del 40%, al menos 20 pero no más del 40%, al menos 30 pero no más del 40%, al menos 35 pero no más del 40%, al menos 5 pero no más del 30%, al menos 10 pero no más del 30%, al menos 15 pero no más del 30%, al menos 20 pero no más del 30%, o al menos 25 pero no más del 30%.

60 El grado de inhibición de mTOR puede expresarse como, o corresponde al grado de inhibición de la quinasa P70 S6, p. ej., el grado de inhibición de mTOR puede determinarse por el nivel de disminución de la actividad de la quinasa P70 S6, p.ej., por la disminución de la fosforilación de un sustrato de quinasa P70 S6. El nivel de inhibición de mTOR puede evaluarse mediante diversos métodos, tales como medir la actividad de quinasa P70 S6 mediante el ensayo de Boulay, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2015/01240036, o como se describe en la

Patente de EE.UU. Nº 7.727.950; medir el nivel de S6 fosforilado por transferencia Western; o evaluar un cambio en la relación de células efectoras inmunitarias PD1 negativas a células efectoras inmunitarias PD1 positivas.

5 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "inhibidor de mTOR" se refiere a un compuesto o ligando, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que inhibe la quinasa mTOR en una célula. En una realización, un inhibidor de mTOR es un inhibidor alostérico. Inhibidores de mTOR alostéricos incluyen el compuesto tricíclico neutro rapamicina (sirolimus), compuestos relacionados con rapamicina, es decir, compuestos que tienen similitud estructural y funcional con rapamicina, incluyendo, p. ej., derivados de rapamicina, análogos de rapamicina (también denominados rapálogos) y otros compuestos macrólidos que inhiben actividad de mTOR. En una realización, un inhibidor de mTOR es un inhibidor catalítico.

Rapamicina es un antibiótico macrólido conocido, producido por *Streptomyces hygroscopicus*, que tiene la estructura mostrada en la Fórmula A.



(A)

15 Véase, p. ej., McAlpine, J.B., et al., J. Antibiotics (1991) 44: 688; Schreiber, S.L., et al., J. Am. Chem. Soc. (1991) 113: 7433; Patente de EE.UU. Nº 3.929.992. Existen diversos esquemas de numeración propuestos para rapamicina. Para evitar confusiones, cuando análogos de rapamicina específicos se denominan en esta memoria, los nombres se dan con referencia a rapamicina utilizando el esquema de numeración de fórmula A.

20 Análogos de rapamicina útiles en la divulgación son, por ejemplo, análogos O-sustituídos, en los que el grupo hidroxilo en el anillo ciclohexilo de rapamicina está reemplazado por OR<sub>1</sub>, en que R<sub>1</sub> es hidroxialquilo, hidroxialcoxilalquilo, acilaminoalquilo o aminoalquilo; p. ej., RAD001, también conocido como everolimus tal como se describe en los documentos US 5.665.772 y WO94/09010. Otros análogos de rapamicina adecuados incluyen los sustituidos en la posición 26 o 28. El análogo de rapamicina puede ser un epímero de un análogo arriba mencionado, particularmente un epímero de un análogo sustituido en la posición 40, 28 o 26 y, opcionalmente, puede hidrogenarse adicionalmente, p. ej., tal como se describe en los documentos US 6.015.815, WO95/14023 y WO99/15530, p. ej., ABT578 también conocido como zotarolimus o un análogo de rapamicina descrito en los documentos US 7.091.213, WO98/02441 y WO01/14387, p. ej. AP23573 también conocido como ridaforolimus.

30 Ejemplos de análogos de rapamicina adecuados para uso en la presente divulgación del documento US 5.665.772 incluyen, pero no se limitan a 40-O-bencil-rapamicina, 40-O-(4'-hidroximetil)bencil-rapamicina, 40-O-[4'-(1,2-dihidroxietil)]bencil-rapamicina, 40-O-alil-rapamicina, 40-O-[3'-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4(S)-il)-prop-2'-en-1'-il]-rapamicina, (2'E,4'S)-40-O-(4',5'-dihidroxipent-2'-en-1'-il)-rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etoxicarbonilmetil-rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, 40-O-(3-hidroxi)propil-rapamicina, 40-O-(6-hidroxi)hexil-rapamicina, 40-O-[2-(2-hidroxi)etoxi]etil-rapamicina, 40-O-[(3S)-2,2-dimetildioxolan-3-il]metil-rapamicina, 40-O-[(2S)-2,3-dihidroxiprop-1-il]-rapamicina, 40-O-(2-acetoxi)etil-rapamicina, 40-O-(2-nicotinoiloxi)etil-rapamicina, 40-O-[2-(N-morfolino)acetoxi]etil-rapamicina, 40-O-(2-N-imidazolilacetoxi)etil-rapamicina, 40-O-[2-(N-metil-N'-piperazinil)acetoxi]etil-rapamicina, 39-O-desmetil-39,40-O,O-etileno-rapamicina, (26R)-26-dihidro-40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, 40-O-(2-aminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-acetaminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-nicotinamidoetil)-rapamicina, 40-O-(2-(N-metil-imidazo-2'-

ilcarbetoamido)etil)-rapamicina, 40-O-(2-etoxicarbonilaminoetil)-rapamicina, 40-O-(2-tolilsulfonamidoetil)-rapamicina y 40-O-[2-(4',5'-dicarboetoxi-1',2',3'-triazol-1'-il)-etil]-rapamicina.

Se conocen otros análogos de rapamicina útiles en la presente divulgación son análogos en los que el grupo hidroxilo en el anillo ciclohexilo de rapamicina y/o el grupo hidroxilo en la posición 28 está reemplazado por un grupo hidroxieéster, p. ej., análogos de rapamicina encontrados en el documento US RE44,768, p. ej., temsirolimus.

Otros análogos de rapamicina útiles en la presente descripción incluyen aquellos en los que el grupo metoxi en la posición 16 está reemplazado por otro sustituyente, preferiblemente alquiloxi (opcionalmente sustituido con hidroxilo), bencilo, ortometoxibencilo o clorobencilo y/o en los que el grupo metoxi en la posición 39 es eliminado junto con el carbono 39, de modo que el anillo ciclohexilo de rapamicina se convierte en un anillo ciclopentilo que carece del grupo metoxi en la posición 39; p. ej., tal como se describe en los documentos WO95/16691 y WO96/41807. Los análogos se pueden modificar adicionalmente de modo que el hidroxilo en la posición 40 de rapamicina se alquila y/o se reduce el 32-carbonilo.

Análogos de rapamicina del documento WO95/16691 incluyen, pero no se limitan a 16-desmetoxi-16-(pent-2-inil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-(but-2-inil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-(propargil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-(4-hidroxibut-2-inil)oxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-benciloxi-40-O-(2-hidroxi)etil)-rapamicina, 16-desmetoxi-16-benciloxi-rapamicina, 16-desmetoxi-16-ortometoxibencil-rapamicina, 16-desmetoxi-40-O-(2-metoxi)etil)-16-pent-2-inil)oxi-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-formil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-hidroximetil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-carboxi-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(4-metilpiperazin-1-il)carbonil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(morfolin-4-il)carbonil-42-nor-rapamicina, 39-desmetoxi-40-desoxi-39-[N-metil, N-(2-piridin-2-il-etil)]carbamoil-42-nor-rapamicina y 39-desmetoxi-40-desoxi-39-(p-toluenosulfonilhidrazonometil)-42-nor-rapamicina.

Análogos de rapamicina del documento WO96/41807 incluyen, pero no se limitan a 32-desoxo-rapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-desoxo-rapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-desoxo-40-O-(2-hidroxio)etil)-rapamicina, 16-O-pent-2-inil-32-(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxi)etil)-rapamicina, 32(S)-dihidro-40-O-(2-metoxi)etil)-rapamicina y 32(S)-dihidro-40-O-(2-hidroxi)etil)-rapamicina.

Otro análogo de rapamicina adecuado es umirolimus tal como se describe en el documento US2005/0101624.

RAD001, también conocido como everolimus (Afinitor®), tiene el nombre químico (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-12-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-hidroxi)etoxi]-3-metoxiciclohexil]-1-metil)etil]-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-11,36-dioxo-4-azatriciclo[3.3.1.0.4,9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraeno-2,3,10,14,20-pentaona.

Ejemplos adicionales de inhibidores alostéricos de mTOR incluyen sirolimus (rapamicina, AY-22989), 40-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]-rapamicina (también denominado temsirolimus o CCI-779) y ridaforolimus (AP-23573/MK-8669). Otros ejemplos de inhibidores alostéricos de mTor incluyen zotarolimus (ABT578) y umirolimus.

Alternativa o adicionalmente, se ha encontrado que inhibidores catalíticos de mTOR competitivos con ATP fijan directamente como objetivo al dominio de la quinasa mTOR y se fijan como objetivo tanto a mTORC1 como a mTORC2. Estos también son inhibidores más efectivos de mTORC1 que los inhibidores de mTOR alostéricos tales como rapamicina, porque modulan las salidas de mTORC1 resistente a rapamicina tales como la fosforilación de 4EBP1-T37 / 46 y la traducción dependiente del casquete.

Inhibidores catalíticos incluyen: BEZ235 o 2-metil-2-[4-(3-metil-2-oxo-8-quinolin-3-il-2,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-fenil]-propionitrilo, o la forma de sal monotosilato. La síntesis de BEZ235 se describe en el documento WO2006/122806; CCG168 (conocido de otro modo como AZD-8055, Chresta, C.M., et al., Cancer Res, 2010, 70(1), 288-298) que tiene el nombre químico {5-[2,4-bis-((S)-3-metil-morfolin-4-il)-pírido[2,3-d]pirimidin-7-il]-2-metoxi-fenil}-metanol; 3-[2,4-bis((3S)-3-metilmorfolin-4-il)pírido[2,3-d]pirimidin-7-il]-N-metilbenzamida (documento WO09104019); 3-(2-aminobenzo[d]oxazol-5-il)-1-isopropil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (documentos WO10051043 y WO2013023184); una N-(3-(N-(3-((3,5-dimetoxifenil)amino)quinoxalina-2-il)sulfamoil)fenil)-3-metoxi-4-metilbenzamida (documentos WO07044729 y WO12006552); PKI-587 (Venkatesan, A.M., J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645) que tiene el nombre químico 1-[4-[4-(dimetilamino)piperidina-1-carbonil]fenil]-3-[4-(4,6-dimorfolino-1,3,5-triazin-2-il)fenil]urea; GSK-2126458 (ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43) que tiene el nombre químico 2,4-difluoro-N-{2-metoxi-5-[4-(4-piridazinil)-6-quinolinil]-3-piridinil}bencenosulfonamida; 5-(9-isopropil-8-metil-2-morfolino-9H-purin-6-il)pirimidin-2-amina (documento WO10114484); (E)-N-(8-(6-amino-5-(trifluorometil)piridin-3-il)-1-(6-(2-cianopropan-2-il)piridin-3-il)-3-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2(3H)-ilideno)cianamida (documento WO12007926).

Ejemplos adicionales de inhibidores catalíticos de mTOR incluyen 8-(6-metoxi-piridin-3-il)-3-metil-1-(4-piperazin-1-il-3-trifluorometil-fenil)-1,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (documento WO2006/122806) y Ku-0063794 (Garcia-Martinez JM, et al., Biochem J., 2009, 421(1), 29-42. Ku-0063794 es un inhibidor específico de la diana de la rapamicina

en mamíferos (mTOR)). WYE-354 es otro ejemplo de un inhibidor catalítico de mTor (Yu K, et al. (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15): 6232-6240).

- 5 Inhibidores de mTOR útiles de acuerdo con la presente divulgación también incluyen profármacos, derivados, sales farmacéuticamente aceptables o análogos de los mismos de cualquiera de los anteriores.

10 Inhibidores de mTOR, tales como RAD001, pueden formularse para su suministro basándose en métodos bien establecidos en la técnica basados en las dosificaciones particulares descritas en esta memoria. En particular, la patente de EE.UU. 6.004.973 proporciona ejemplos de formulaciones utilizables con los inhibidores de mTOR descritos en esta memoria.

#### Composiciones y tratamientos farmacéuticos

15 Composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender una célula que expresa CAR, p. ej., una pluralidad de células que expresan CAR, tal como se describe en esta memoria, o un inhibidor de BTK, o ambos, y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales, en combinación con uno o más soportes, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Composiciones de este tipo pueden comprender tampones, tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; hidratos de carbono, tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos, tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio); y conservantes. En un aspecto, las composiciones de la presente invención están formuladas para administración intravenosa.

25 Composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad que se ha de tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración serán determinadas por factores tales como la condición del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque dosificaciones apropiadas pueden ser determinadas por ensayos clínicos.

30 En un caso, células que expresan CAR descritas en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK se administra a un sujeto en combinación con una molécula que disminuye la población de células Treg. Métodos que disminuyen el número de (p. ej., agotan) células Treg son conocidos en la técnica e incluyen, p. ej., agotamiento de CD25, administración de ciclofosfamida, modulación de la función de GITR. Sin desear estar ligados por la teoría, se cree que la reducción del número de células Treg en un sujeto antes de la aféresis o antes de la administración de una célula que expresa CAR descrita en esta memoria reduce el número de células inmunitarias no deseadas (p. ej., Tregs) en el microentorno del tumor y reduce el riesgo de recaída para el sujeto.

40 En un caso, una terapia descrita en esta memoria, p. ej., una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, se administra a un sujeto en combinación con una molécula que fija como objetivo GITR y/o modula las funciones de GITR, tales como un agonista de GITR y/o un anticuerpo de GITR que agota las células T reguladoras (Tregs). En casos, células que expresan CAR descritas en esta memoria se administran a un sujeto en combinación con ciclofosfamida. En un caso, las moléculas de unión a GITR y/o moléculas que modulan funciones de GITR (p. ej., agonista de GITR y/o anticuerpos de GITR que agotan Treg) se administran antes de la administración de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un caso, el agonista de GITR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En casos, la ciclofosfamida se administra al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o re-infusión) de la célula CAR que expresan o antes de la aféresis de las células. En casos, la ciclofosfamida y un anticuerpo anti-GITR se administran al sujeto antes de la administración (p. ej., infusión o re-infusión) de la célula que expresa CAR o antes de la aféresis de las células. En un caso, el sujeto tiene cáncer (p. ej., un cáncer sólido o un cáncer hematológico tal como ALL o CLL). En un caso, el sujeto tiene CLL. En casos, el sujeto tiene ALL. En casos, el sujeto tiene un cáncer sólido, p. ej., un cáncer sólido descrito en esta memoria.

55 Agonistas de GITR ejemplares incluyen, p. ej., proteínas de fusión GITR y anticuerpos anti-GITR (p. ej., anticuerpos anti-GITR bivalentes), tales como, p. ej., una proteína de fusión GITR descrita en la Patente de EE.UU. N°: 6.111.090, Patente Europea N°: 090505B1, Patente de EE.UU. N°: 8.586.023, Publicaciones PCT N°s: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-GITR descrito, p. ej., en la Patente de EE.UU. N°: 7.025.962, Patente Europea N°: 1947183B1, Patente de EE.UU. N°: 7.812.135, Patente de EE.UU. N°: 8.388.967, Patente de EE.UU. N°: 8.591.886, Patente Europea N°: EP 1866339, Publicación PCT N°: WO 2011/028683, Publicación PCT N°: WO 2013/039954, Publicación PCT N°: WO2005/007190, Publicación PCT N°: WO 2007/133822, Publicación PCT N°: WO2005/055808, Publicación PCT N°: WO 99/40196, Publicación PCT N°: WO 2001/03720, Publicación PCT N°: WO99/20758, Publicación PCT N°: WO2006/083289, Publicación PCT N°: WO 2005/115451, Patente de EE.UU. N°: 7.618.632, y Publicación PCT N°: WO 2011/051726.

60 En un caso, una célula que expresa CAR descrita en esta memoria, en combinación con un inhibidor de BTK descrito en esta memoria, se administra a un sujeto en combinación con un agonista de GITR, p. ej., un agonista de GITR

descrito en esta memoria. En un caso, el agonista de G1TR se administra antes que la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un caso, el agonista de G1TR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En un caso, el sujeto tiene CLL.

5 En una realización, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de, p. ej., no hay niveles detectables de un contaminante, p. ej., seleccionado del grupo que consiste en endotoxina, micoplasma, lentivirus competente para la replicación (RCL), p24, ácido nucleico VSV-G, VIH gag, perlas recubiertas anti-CD3/anti-CD28 residuales, anticuerpos de ratón, suero humano combinado, albúmina de suero bovino, suero bovino, componentes de medios de cultivo, componentes de plásmidos o células de empaquetamiento de vectores, una bacteria y un hongo. En una  
10 realización, la bacteria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* grupo A.

15 Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", se puede determinar por parte de un médico la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención que se han de administrar, teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y condición del paciente (sujeto). En algunos casos, una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en esta memoria se puede administrar a una dosis de  $10^4$  a  $10^9$  células/kg de peso corporal, en algunos casos  $10^5$  a  $10^6$  células/kg de peso corporal, incluyendo  
20 todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de células T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosificaciones. Las células se pueden administrar utilizando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, p. ej., Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988).

25 En algunas realizaciones, una dosis de células CAR comprende aproximadamente  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , o  $5 \times 10^8$  células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , o  $5 \times 10^8$  células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende hasta aproximadamente  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  
30  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ , o  $5 \times 10^8$  células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende aproximadamente  $1,1 \times 10^6$  -  $1,8 \times 10^7$  células/kg. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende aproximadamente  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ , o  $5 \times 10^9$  células. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ , o  $5 \times 10^9$  células. En algunas realizaciones, una dosis de células CAR (p. ej., células CAR CD19) comprende hasta aproximadamente  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ , o  $5 \times 10^9$  células.

35 En determinados aspectos, puede ser deseable administrar células T activadas a un sujeto y luego volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar células T de la misma de acuerdo con la presente divulgación y reinfundir al paciente con estas células T activadas y expandidas. Este procedimiento se puede realizar varias veces cada pocas semanas. En determinados aspectos, las células T pueden activarse a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En determinados aspectos, las células T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc o 100 cc.

45 La administración de las composiciones objeto se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo mediante inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en esta memoria pueden administrarse a un paciente por vía transarterial, subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.) o intraperitoneal. En un aspecto, las composiciones de células T de la presente invención se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En un aspecto, las composiciones de células T de la presente invención se administran mediante inyección i.v. Las composiciones de células T pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de  
50 infección.

55 En un aspecto particular ejemplar, los sujetos pueden someterse a leucoféresis, en donde los leucocitos se recogen, enriquecen o agotan ex vivo para seleccionar y/o aislar células de interés, p. ej., células T. Estos aislados de células T pueden expandirse mediante métodos conocidos en la técnica y tratarse de manera que se puedan introducir una o más construcciones de CAR de la divulgación, creando con ello una célula CAR T de la divulgación. Sujetos que lo necesiten pueden someterse posteriormente a un tratamiento estándar con quimioterapia de dosis alta seguida de un trasplante de células madre de la sangre periférica. En determinados aspectos, después del trasplante o simultáneamente con él, los sujetos reciben una infusión de las células CAR T expandidas de la presente invención.  
60 En un aspecto adicional, células expandidas son administradas antes o después de la cirugía.

La dosificación de los tratamientos anteriores a administrar a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se está tratando y el receptor del tratamiento. El escalamiento de las dosificaciones para la

administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis de CAMPATH, p. ej., estará generalmente en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, habitualmente administrada diariamente durante un período entre 1 y 30 días. La dosis diaria adecuada es de 1 a 10 mg al día, aunque en algunos casos se pueden utilizar dosis mayores de hasta 40 mg al día (descritas en la Patente de EE.UU. N° 6.120.766).

En un caso, el CAR se introduce en células T, p. ej., utilizando transcripción in vitro, y el sujeto (p. ej., un ser humano) recibe una administración inicial de células CAR T de la divulgación, y una o más administraciones posteriores de las células CAR T de la divulgación, en donde una o más administraciones posteriores se administran menos de 15 días, p. ej., 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días después de la administración anterior. En un caso, se administra más de una administración de las células CAR T de la divulgación al sujeto (p. ej., ser humano) a la semana, p. ej., se administran 2, 3 o 4 administraciones de las células CAR T de la divulgación a la semana. En un caso, el sujeto (p. ej., un sujeto humano) recibe más de una administración de las células CAR T por semana (p. ej., 2, 3 o 4 administraciones por semana) (a lo que también se alude en esta memoria como un ciclo), seguido de una semana de ninguna administración de células CAR T, y luego se administra al sujeto una o más administraciones adicionales de las células CAR T (p. ej., más de una administración de las células CAR T a la semana). En otro caso, el sujeto (p. ej., un sujeto humano) recibe más de un ciclo de células CAR T, y el tiempo entre cada uno de los ciclos es menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 días. En un caso, las células CAR T se administran cada dos días durante 3 administraciones por semana. En un caso, las células CAR T se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

En un aspecto, las células que expresan CAR se generan utilizando vectores virales lentivirales, tales como lentivirus. Las células, p. ej., los CARTs generados de esa manera, tendrán una expresión de CAR estable.

En un aspecto, las células que expresan CAR, p. ej., CART, se generan utilizando un vector viral tal como un vector gammaretroviral, p. ej., un vector gammaretroviral descrito en esta memoria. Los CARTs generados utilizando estos vectores pueden tener una expresión CAR estable.

En un aspecto, los CARTs expresan transitoriamente vectores CAR durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días después de la transducción. La expresión transitoria de CARs se puede efectuar mediante el suministro del vector ARN CAR. En un caso, el ARN CAR se transduce en la célula T mediante electroporación.

Un problema potencial que puede surgir en pacientes que están siendo tratados con células CAR T que expresan de manera transitoria (particularmente con ScFv murinos que portan CARTs) es la anafilaxia después de múltiples tratamientos.

Sin estar ligados por esta teoría, se cree que una respuesta anafiláctica de este tipo podría ser provocada por un paciente que desarrolla una respuesta humoral anti-CAR, es decir, anticuerpos anti-CAR que tienen un isotipo anti-IgE. Se cree que células productoras de anticuerpos de un paciente experimentan una conmutación de clase de isotipo IgG (que no provoca anafilaxia) a isotipo IgE cuando hay una pausa de diez a catorce días de la exposición al antígeno.

Si un paciente tiene un alto riesgo de generar una respuesta de anticuerpos anti-CAR durante el curso de la terapia con CAR transitoria (como las generadas por las transducciones de ARN), las pausas de infusión CART no deberían durar más de diez a catorce días.

#### Construcciones de CAR ejemplares

Una molécula de anticuerpo CD19 puede ser, p. ej., una molécula de anticuerpo (p. ej., una molécula de anticuerpo anti-CD19 humanizada) descrita en el documento WO2014/153270. El documento WO2014/153270 también describe métodos para ensayar la unión y la eficacia de diversas construcciones de CART. Determinados dominios variables de CD19 humanizado se reproducen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de los dominios variables de CD19 humanizado (SEQ ID NOs: 114-117, respectivamente, en orden de aparición).

Chothia CDR		CDR H1		CDR H2
Kabat CDR		CDR H1		CDR H2
Kabat #	1-200	201-300	301-400	401-500
FMC63 VH hz1	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCTVSGVSL	PDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIW	GSETTYYNISLKS
FMC63 VH hz2	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCTVSGVSL	PDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIW	GSETTYYSLSLKS
FMC63 VH hz3	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCTVSGVSL	PDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIW	GSETTYYSLSLKS

Chothia CDR		CDR H3
Kabat CDR		CDR H3
Kabat #	501-600	601-700
FMC63 VH hz1	RVTISKDN	SKNQVSLKLS
FMC63 VH hz2	RVTISKDN	SKNQVSLKLS
FMC63 VH hz3	RVTISKDN	SKNQVSLKLS

Chothia CDR		CDR L1	CDR L2
Kabat CDR		CDR L1	CDR L2
Kabat #	1-200	201-300	301-400
FMC63 VL hz	EIVMTQSPATLSL	SPGERATLSCRASQ	DISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHS

Chothia CDR		CDR L3
Kabat CDR		CDR L3
Kabat #	401-500	501-600
FMC63 VL hz	GIPARFSGSGSG	TDYTLTIS

5 El orden en el que aparecen los dominios VL y VH en el scFv puede variar (es decir, orientación VL-VH o VH-VL) y (por ejemplo) se pueden utilizar tres o cuatro copias de la subunidad "G4S" (SEQ ID NO:18), en el que cada una de las subunidades comprende la secuencia GGGGS (SEQ ID NO:18) (p. ej., (G4S)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:107) o (G4S)<sub>4</sub>(SEQ ID NO:106)), conectan los dominios variables para crear la totalidad del dominio scFv, tal como se muestra en la Tabla 2.

10 Tabla 2 Construcciones scFv de CD19 humanizadas que muestran la orientación VH y VL y la longitud del enlazador ("3G4S" se describe como SEQ ID NO: 107 y "4G4S" se describe como SEQ ID NO: 106).

ID construcción	Longitud de aa	anotación	cambio Vh
mscFvCTL019	486	VL-VH, 3G4S	
104879	491	VL-VH, 4G4S	N/S
104880	491	VL-VH, 4G4S	N/Q
104881	491	VH-VL, 4G4S	N/S
104882	491	VH-VL, 4G4S	N/Q
104875	486	VL-VH, 3G4S	N/S
104876	486	VL-VH, 3G4S	N/Q
104877	486	VH-VL, 3G4S	N/S
104878	486	VH-VL, 3G4S	N/Q
105974	491	VL-VH, 4G4S	S/N
105975	491	VH-VL, 4G4S	S/N
105976	486	VL-VH, 3G4S	S/N
105977	486	VH-VL, 3G4S	S/N

15 Las secuencias de fragmentos scFv humanizados (SEQ ID NOs: 1-12) se proporcionan a continuación en la Tabla 3. Las construcciones CAR completas se proporcionan como SEQ ID NOs: 1-12. Secuencias adicionales, SEQ ID NOs: 13-17, que se muestran a continuación, se pueden utilizar para generar construcciones CAR completas con SEQ DI NOs: 31-42.

- conductora (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 13)  
MALPVTALLLPLALLHAARP
- conductora (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 54)  
ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACC

- 20 C
- bisagra CD8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 14)  
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
  - bisagra CD8 (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 55)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTG  
 TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTG  
 GACTTCGCCTGTGAT

• **transmembrana CD8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 15)**  
 YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

5 • **transmembrana (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 56)**  
 ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTCTCTCTGTCCTGTTATCAC  
 CCTTTACTGC

• **dominio intracelular de 4-1BB (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 16)**  
 KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

10 • **dominio intracelular de 4-1BB (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 60)**  
 AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA  
 ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGT  
 GAACTG

• **dominio intracelular de ICOS (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 135)**  
 T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L

• **dominio intracelular de ICOS (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 136)**  
 ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAGA

15 GCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA  
 • **dominio intracelular de CD3 zeta (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 17)**  
 RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE  
 LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

• **CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 101)**  
 AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTC  
 TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC  
 CGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAA  
 TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG  
 CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC  
 CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

20 • **dominio de CD3 zeta (secuencia de aminoácidos; Secuencia de Referencia del NCBI NM\_000734.3) (SEQ ID NO:43)**  
 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE  
 LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

• **CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico; Secuencia de Referencia del NCBI NM\_000734.3) (SEQ ID NO:44)**

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG  
 AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT  
 TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA  
 AGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG  
 AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC

25 ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC  
 CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC  
**Bisagra IgG4 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 102)**

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGV  
 EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR  
 LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM

**Bisagra IgG4 (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 103)**

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCA  
 GCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGT  
 GACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG  
 GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACC  
 TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC  
 AAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCC  
 AAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACC  
 AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG  
 AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACA  
 GCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGG  
 GCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAG  
 CCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

- 5 Los clones contienen opcionalmente un cambio de residuo Q/K en el dominio de señal del dominio co-estimulador derivado de 4-1BB.

Tabla 3: Construcciones de CAR CD19 Humanizadas

Nombre	SEQ ID	Secuencia
<b>CAR1</b>		
<b>dominio scFv de CAR1</b>	1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYYSLSLRSRTISKDNSKNQVSLKL SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLVTVSS
<b>103101 CAR1 scFv soluble -nt</b>	61	atggccctccctgtcaccgacctgtgcttccgctggetcttctgctccac

ES 2 876 974 T3

		<p>gccgctcggccccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctt  tcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctca  aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctg  atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcgg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatcttctgtcagcaagggaaacaccctgccctacacctt  ggacagggcaccaagctcgagattaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggt  cttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagt  tctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccaccggggaaggt  ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactactcttca  tcctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtg  tactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcctgtactattgc  gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag  ggactctggtcaccggtgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat</p>
<p><b>103101</b>  <b>CAR1</b>  <b>scFv</b>     -aa  <b>soluble</b></p>	<p>73</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u></b>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdis  kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpe  dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpg  lvkpsetlslctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyss  slksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq  gtlvtvss<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>104875</b>  <b>CAR1</b>     -  <b>Completo - nt</b></p>	<p>85</p>	<p>atggccctccctgtcaccgcctgtgcttccgctggctcttctgctccac  gccgctcggccccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctt  tcacccggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctca  aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctg  atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccaggttcagcgg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatcttctgtcagcaagggaaacaccctgccctacacctt  ggacagggcaccaagctcgagattaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaagcggaccgggt  cttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagt  tctctccccgattacgggggtgtcttgatcagacagccaccggggaaggt  ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactactcttca  tcctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtg</p>

ES 2 876 974 T3

		tcaactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgc gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag ggtactctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccacc accccggctectaccatcgctcccagcctctgtccctgctccggaggca tgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcc tgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggctctgctg ctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctg tacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctggtcatgccggtcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactg cgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggag aaccagctctacaacgaactcaatcttggctcgagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcaga aagaatccccaaagagggctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca gaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggc cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgccgctcgg
<b>104875</b> <b>CAR1</b> <b>Completo</b> <b>aa</b>	31	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc <u>rasqdis</u> <u>kyln</u> wyqqkpgqaprlliy <u>htsrlhs</u> giparfsgsgsgtdytltisslqpe dfavyfc <u>qgntlpyt</u> fgqgtkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpg lvkpsetlsltctvsgvslp <u>dygvs</u> wirppgkglewig <u>viwgsettyys</u> <u>slks</u> rvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycak <u>hyyyggsyamdy</u> wgq gtlvtvssttppaprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiywaplagtgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqee dgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydv ldkrrgrdpemgkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgk hdglyqglstatkdydalhmqalppr
<b>CAR2</b>		
<b>dominio scFv</b> <b>de CAR2</b>	2	eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylwyyqqkpgqaprlliyht srlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqgntlpytfgqgt kleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp ygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvsllk ssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss
<b>103102</b> <b>CAR2- scFv</b> <b>Soluble - nt</b>	62	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccac gccgctcgccccgaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctt

ES 2 876 974 T3

		<p>tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctca  aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctg  atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggtcagcggg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatcttctgtcagcaagggaaacaccctgcctacaccttt  ggacagggcaccaagctcgagattaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagccagggtccaactccaagaaagcggaccgggt  cttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtg  tctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggt  ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatca  tcctcaagtcaagcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagggtg  tactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtgtactattgc  gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag  ggtaactctggtcaccgtgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat</p>
<p><b>103102</b>  <b>CAR2- scFv</b>  <b>Soluble - aa</b></p>	<p>74</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u></b>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdis  kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpe  dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpg  lvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqs  slksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgq  gtlvtvss<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>104876</b>  <b>CAR2 -</b>  <b>Completo - nt</b></p>	<p>86</p>	<p>atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccac  gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctt  tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctca  aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctg  atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggtcagcggg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatcttctgtcagcaagggaaacaccctgcctacaccttt  ggacagggcaccaagctcgagattaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagccagggtccaactccaagaaagcggaccgggt  cttgtgaagccatcagaaactctttcactgacttgtactgtgagcggagtg  tctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggt  ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatca  tcctcaagtcaagcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagggtg  tactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtgtactattgc</p>

		gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag ggtactctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgagggccaccc acccggctcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggca tgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcc tgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcgggggtcctgctg ctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctg tacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcggtgcgaactg cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcaga aagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca gaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggc cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggeccctgccgctcgg
<b>104876 CAR2 Completo aa</b>	32	MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlsispgeratlsc <u>rasqdis</u> <u>kyln</u> wyqqkpgqaprlly <u>htsrlhs</u> giparfsgsgsgtdytltisslqpe dfavyfc <u>qqgntlpyt</u> fgqgkkleikggggsgggsgggsgvqlqesgpg lvkpssetlsltctvsgvslp <u>dygvs</u> wirqppgkglewig <u>viwgsettyyqs</u> <u>slks</u> rvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycak <u>hyyyggsyamyd</u> wgq gtlvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqee dgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrreeydv ldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkg hdglyqglstatkdydalhmqalppr
<b>CAR3</b>		
<b>dominio scFv de CAR3</b>	3	qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigvi wgsettyysslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyg gsyamywgqggtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlsispger atlsccrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrlhsgiparfsgsgsgt dytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik
<b>103104 CAR 3 - scFv Soluble - nt</b>	63	atggctctgccggtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcac gccgctcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaag ccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgctccctccca

ES 2 876 974 T3

		<p>gactacggagtgagctggattagacagcctcccgaaagggactggagtgg  atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactattcatcttcctgaag  tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag  ctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcat  tactactatggagggctcctacgccatggactactggggccagggactctg  gtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga  gggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttct  cccggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaa  tacctcaattgggatcaacagaagccgggacagggccctaggcttcttate  taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtct  ggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggac  ttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc  cagggcaccaagcttgagatcaaacatcaccaccatcatcaccatcac</p>
<p><b>103104 CAR 3 - scFv Soluble - aa</b></p>	<p>75</p>	<p><u><b>MALPVTALLLPLALLLHAARP</b></u>qvqlqesgpglvkpseltctvsgvslp  dygvswirppgkglewigviwgsettyysssllksrvtiskdnknqvsllk  lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgg  ggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlli  yhtsrhlhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavycqqgntlpytfg  qgkkleik<u>hhhhhhh</u></p>
<p><b>104877 CAR 3 - Completo - nt</b></p>	<p>87</p>	<p>atggctctgcccgtagccgcaactcctcctgccactggctctgctgctcac  gccgctcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaag  ccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcca  gactacggagtgagctggattagacagcctcccgaaagggactggagtgg  atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactattcatcttcctgaag  tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag  ctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcat  tactactatggagggctcctacgccatggactactggggccagggactctg  gtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga  gggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttct  cccggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaa  tacctcaattgggatcaacagaagccgggacagggccctaggcttcttate  taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtct  ggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggac  ttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc</p>

ES 2 876 974 T3

		cagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgctccaaggccacc acccctgccccgaccatcgctctcagccgctttccctgctccggaggca tntagaccgcagctggtggggccgtgcatacccgggtcttgacttcgcc tgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgccgggtcctgctg ctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctg tacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag gacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactg cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggag aaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtg ctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcaga aagaatccccagagggctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca gaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggc cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
<b>104877 CAR3 - Completo - aa</b>	33	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslp <u>dygvs</u> wirqppgkglewig <u>viwgsettyysslks</u> rvtiskdnsknqvs lssvtaadtavyycak <u>hyyyggsyamdy</u> wgqgtlvtvssggggsgggsgg ggseivmtqspatlsispgeratlsc <u>rasqdiskyl</u> nwyqqkpgqaprlli <u>yhtsrllhs</u> giparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfc <u>qqgntlpyt</u> fg qgkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa cdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqee dgcsrpfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydv ldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgk hdglyqglstatkdydalhmqalppr
<b>CAR4</b>		
<b>dominio scFv de CAR4</b>	4	qvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvs klssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggg ggseivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrllhs giparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfc qqgntlpytfgqgkleik
<b>103106 CAR4- scFv Soluble - nt</b>	64	atggctctgcccgtagccgcactcctcctgccactggctctgctgcttca gccgctcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaag ccactctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcca gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaaggactggagtgg

ES 2 876 974 T3

		<p>atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactatcaatcttcctgaag          tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag          ctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcat          tactactatggagggtcctacgccatggactactggggccaggaactctg          gtcaactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtgga          ggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttct          cccggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaa          tacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatc          taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtct          ggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggac          ttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacacctcggc          cagggcaccaagcttgagatcaaaccatcaccaccatcatcaccatcac</p>
<p>103106 CAR4- scFv Soluble - aa</p>	<p>76</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u></b>qvqlqesgpglvkpsetlslctvsgvslp          dygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskngvslk          lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsgg          ggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlli          yhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltltisslqpedfavyfcqqgntlpytfg          qgtkleik<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p>104878 CAR 4 - Completo - nt</p>	<p>88</p>	<p>atggctctgcccgtagaccgcaactcctcctgccactggctctgctgcttca          gccgctcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaag          ccactctgagactctgtccctcacttgcaccgtagcggaggtgtccctccca          gactacggagtgagctggattagacagcctcccgaaagggactggagtgga          atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactatcaatcttcctgaag          tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag          ctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcat          tactactatggagggtcctacgccatggactactggggccaggaactctg          gtcaactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcggtgga          ggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttct          cccggggaacgggctaccctttcttgtcgggcatcacaagatatctcaaaa          tacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatc          taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgctttagcgggtct          ggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggac          ttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacacctcggc          cagggcaccaagcttgagatcaaaccactactcccgctccaaggccacc</p>

ES 2 876 974 T3

		<p>accctgccccgaccatcgctctcagccgctttccctgctccggaggca  tgtagaccgcagctggtggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcc  tgcgatctacatttgggcccctctggctggtacttgccgggtcctgctg  ctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctg  tacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag  gacggctggtcatgcccgttcccagaggaggaggaaaggcggctgcgaactg  cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag  aaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtg  ctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcaga  aagaatccccaaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca  gaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggc  cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac  gctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
104878 CAR 4 - Completo - aa	34	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsctlsltctvsgvslp  <u>dygvs</u>wirpppgkglewig<u>viwgsettyyqsslks</u>rvtiskdnsknqvslk  lssvtaadtavyycak<u>hyyyggsyamdy</u>wgqgtlvtvssggggsgggsgg  ggseivmtqspatlsispgeratlsc<u>rasqdiskyl</u>nwyqqkpgqaprlli  y<u>htsrlhs</u>giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc<u>qqgntlpyt</u>fg  qgkkleiktttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa  cdiyiwaplagtgcvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqee  dgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydv  ldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrrgkg  hdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<b>CAR5</b>		
<b>dominio scFv de CAR5</b>	5	<p>eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyht  srlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgt  kleikggggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsctlsltctvsg  vslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyysssllksrvtiskdnsknq  vslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss</p>
<b>99789 CAR5 - scFv Soluble - nt</b>	65	<p>atggccctcccagtgaccgctctgctgctgctcctcgcacttcttctcoat  gccgctcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctg  tcaccggcgagagggaacccttcatgcagggccagccaggacatttct  aagtacctcaactggtatcagcagaagccagggcaggctcctcgcctgctg  atctaccacaccagccgcctccacagcggatccccgccagattttccggg</p>

ES 2 876 974 T3

		<p>agcgggtctggaaccgactacacctcaccatctcttctctgcagcccag  gatttcgccgtctatcttctgccagcaggggaatactctgccgtacacctc  ggtcaaggtaccaagctggaatcaagggaggcggaggatcaggcgggtggc  ggaagcggaggagggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttca  gaatcaggaccgacttgtgaagccatcagaaacctctccctgacttgt  accgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttgattcgccag  cctccggggaagggtcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagact  acttactactcttcatcacttaagtacgggtcaccatcagcaaagataat  agcaagaaccaagtgtcacttaagtgtcatctgtgaccgccgtgacacc  gccgtgtactattgtgccaaacattactattacggagggtcttatgctatg  gactactggggacaggggaccctgggtgactgtctctagccatcaccatcac  caccatcatcac</p>
<p><b>99789 CAR5- scFv Soluble - aa</b></p>	<p>77</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u></b>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdis  kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpe  dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlq  esgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset  tyysslksrvtiskdnknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyggsyam  dywgqgtlvtvss<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>104879 CAR 5 - Completo - nt</b></p>	<p>89</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccac  gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctt  tcaccgggtgagcgcgcaacctgtcttgagagcctccaagacatctca  aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctg  atctaccacaccagccggtccattctggaatccctgccagggtcagcgg  agcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatcttctgtcagcaagggaaacacctgccctacacctt  ggacagggcaccaagctcgagattaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagcggcggaggcgggagccagggtccaactcaa  gaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctcactgacttgt  actgtgagcggaggtgtctctccccgattacggggtgtcttgatcagacag  ccaccggggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagact  acttactactcttcatccctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaac  tctaagaatcagggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacacc  gccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg  gattactggggacagggactctggtcaccgtgtccagcaccactaccca</p>

		gcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtcc ctgctccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgg ggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggccctctggctggtact tgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt cggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaa ggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggc gggaagccgcgcagaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaaagc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc <u>rasqdis</u> <u>kyln</u> wyqqkpgqaprlly <u>htsrlhs</u> giparfsgsgsgtdytltlisslqpe dfavyfc <u>qggntlpyt</u> fgqgkkleikggggsgggsgggsgggsgvqlq esgpglvkpsetlsltctvsgvslp <u>dygvs</u> wirppgkglewig <u>viwgset</u> <u>tyysslks</u> rvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycak <u>hyyyggsyam</u> <u>dy</u> wgqgltvtvsssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvq ttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgr eeydvlkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkger rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
<b>104879 CAR5 - Completo - aa</b>	35	
<b>CAR6</b>		
<b>dominio scFv de CAR6</b>	6	eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyyqqkpgqaprllyht srlhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedefavyfcqggntlpytfgqgt kleikggggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvsg vslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknq vslkssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgltvtvss atggccctcccagtgaccgctctgctgctgctctcgcaacttcttctccat gccgctcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtcctg tcaccggcgagagggaacccttcatgcagggccagccaggacatttct aagtacctcaactggtatcagcagaagccagggcaggctcctcgctgctg atctaccacaccagccgctccacagcggatccccgccagattttccggg
<b>99790 CAR6 - scFv Soluble - nt</b>	66	

ES 2 876 974 T3

		<p>agcgggtctggaaccgactacaccctcaccatctcttctctgcagcccag  gatttcgccgtctatttctgccagcaggggaataactctgccgtacaccttc  ggtcaaggtaccaagctggaatcaagggaggcggaggatcaggcgggtggc  ggaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaagtgcagcttcaa  gaatcaggaccocggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctgacttgt  accgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgccag  cctccggggaagggctcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagact  acttactaccagtcatacacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataat  agcaagaaccaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacacc  gccgtgtactattgtgccaaacattactattacggagggtcttatgctatg  gactactggggacaggggaccctggtgactgtctctagccatcaccatcac  caccatcatcac</p>
<p><b>99790 CAR6- scFv Soluble - aa</b></p>	<p>78</p>	<p><u><b>MALPVTALLLPLALLHAARP</b></u>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdis  kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpe  dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlq  esgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset  tyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyam  dywgqgtlvtvss<u>hhhhhhh</u></p>
<p><b>104880 CAR6 - Completo - nt</b></p>	<p>90</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccac  gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctt  tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctca  aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctg  atctaccacaccagccggctcattctggaatccctgccagggttcagcgg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatttctgtcagcaaggaacaccctgcctacaccttt  ggacagggcaccaagctcgagattaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagcggaggcggaggagccagggtccaactcaa  gaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgt  actgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacag  ccaccggggaagggctctggaatggattggagtgatttggggctctgagact  acttactaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaac  tctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacacc  gccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg  gattactggggacaggggtactctgggtcaccgtgtccagcaccactaccca</p>

		<p>gcaccgaggccaccacccccggctcctaccatcgccctcccagcctctgtcc  ctgcgctccggagggcatgtagaccgcagctgggtggggcogtgcataccgg  ggctcttgacttcgctgcgatatctacatttgggcccctctggctggact  tgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgggt  cggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag  actactcaagaggaggacggctgttcatgccgggttcccagaggaggaggaa  ggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc  tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga  gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggc  gggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaa  aaggataagatggcagaagcctatagcgagattgggatgaaaggggaacgc  agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc  aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgectcgg</p>
<p><b>104880  CAR6-  Completo  -  aa</b></p>	<p>36</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEivmtqspatlslspgeratlsc<u>rasqdis</u>  <u>kyln</u>wyqqkpgqaprlliy<u>htsrlhs</u>giparfsgsgsgtdytltisslqpe  dfavyfc<u>qqgntlpyt</u>fgqgkkleikggggsgggsgggsgggsgvqlq  espgplvkpsetlsltctvsgvslp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgset</u>  <u>tyyqsslks</u>rvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycak<u>hyyyggsyam</u>  <u>dy</u>wgqgtlvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr  gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvq  ttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr  eeydvlkrrgrdpemggkprrrknpqeglynelqkdkmaeyseigmkger  rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p><b>CAR7  dominio scFv  de CAR7</b></p>	<p>7</p>	<p>qvqlqespgplvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigvi  wgsettyysslksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadtavyycakhyyyg  gsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqspatlsl  spgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsqiparfsg  sgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleik</p>
<p><b>100796 CAR7  -  scFv  Soluble - nt</b></p>	<p>67</p>	<p>atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggccctccttctgcat  gccgccaggccccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggatgaag  ccgtctgagactctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccc  gactacggagtgtcatggatccgccaacctcccgggaaagggttgaatgg  attggtgtcatctggggttctgaaaccactactactcatcttccctgaag</p>

		<p>tccagggtgaccatcagcaaggataattccaagaaccaggtcagccttaag  ctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgccgtgtattactgcgccaagcac  tactattacggaggaagctacgctatggactattggggacagggcactctc  gtgactgtgagcagcggcggtggaggggtctggaggtggaggatccgggtgg  gggtgggtcaggcggaggagggagcagattgtgatgactcagtcaccagcc  accctttctctttcaccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccagc  caggacatttctaagtacctcaactggatcagcaaaaaccggggcaggcc  cctcgctcctgatctaccatacctcagccttactctggatccccgct  cggtttagcggatcaggatctggtagcactacactctgaccatttccagc  ctgcagccagaagatttcgcagtgtatttctgccagcagggcaataccctt  ccttacaccttcggtcagggaaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccat  catcaccaccat</p>
<p><b>100796</b>  <b>CAR7- scFv</b>  <b>Soluble - aa</b></p>	<p>79</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u></b>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp  dygvswirppgkglewigviwgsettyysssiksrvtiskdsknqvslk  lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgg  ggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgga  prlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavyfcqqgntl  pytfgqggtkleik<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>104881 CAR</b>  <b>7 Completo -</b>  <b>nt</b></p>	<p>91</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttca  gccgctcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaag  ccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcca  gactacggagtgagctggattagacagcctcccgaaagggactggagtgg  atcggagtgatttgggtagcgaaccacttactattcatcttcctgaag  tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag  ctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgccgtgtattactgtgccaagcat  tactactatggagggctctacgccatggactactggggccagggaaactctg  gtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga  gggtggctccggaggtggcggaaagcgaatcgtgatgaccagagccctgca  accctgtccctttctcccggggaacgggctaccctttctgtcgggcatca  caagatatctaaaatacctcaattggatcaacagaagccgggacaggcc  cctaggettcttctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgca  cgcttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatct  ctccagcccaggaacttcgcccgtctacttctgccagcagggtaacacctg  ccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactccc</p>

		<p>gctccaaggccaccaccctgccccgaccatcgctctcagccgctttcc  ctgctccggagcatgtagaccgcagctggtggggcctgcataccgg  ggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggccctctggctggtact  tgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt  cggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag  actactcaagaggaggacggtgttcatgccggttcccagaggaggaggaa  ggcggtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc  tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga  gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggc  gggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaa  aaggataagatggcagaagcctatagcgagattgggatgaaaggggaacgc  agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc  aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgectcgg</p>
<p><b>104881 CAR7</b>  <b>Completo</b> -  <b>aa</b></p>	<p>37</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp  <u><b>dygvs</b></u>wirqppgkglewig<u><b>viwgsettyysss</b></u>lksrvtiskdsknqvslk  lssvtaadtavyyca<u><b>hyyyggsyamdy</b></u>wgqgtlvtvssggggsgggsgg  ggsggggseivmtqspatlsispgeratls<u><b>crasqdiskyl</b></u>nwyqqkpgqa  prlliy<u><b>htsr</b></u>lhsqiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc<u><b>qqgntl</b></u>  <u><b>pyt</b></u>fgqgkkleiktttpprppptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtr  gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvq  ttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr  eeydvlkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkger  rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p><b>CAR8</b></p>		
<p><b>dominio scFv</b>  <b>de CAR8</b></p>	<p>8</p>	<p>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigvi  wgsettyyqsslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycahyyyg  gsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsggggsggggseivmtqspatls  spgeratls<u><b>crasqdiskyl</b></u>nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgqiparfsg  sgsgtdytltisslqpedfavyfc<u><b>qqgntlpyt</b></u>fgqgkkleik</p>
<p><b>100798 CAR8</b>  -  <b>scFv</b>  <b>Soluble - nt</b></p>	<p>68</p>	<p>atggcactgctgtcactgcctcctgctgctcctcctcctctgcat  gccgccaggcccaagtccagctgcaagagtccaggaccggactggtgaag  ccgtctgagactctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccc  gactacggagtgtcatggatccccaacctcccgggaaaggccttgaatgg  attggtgtcatctggggttctgaaaccactactaccagctctcctgaag</p>

ES 2 876 974 T3

		<p>tccagggtgaccatcagcaaggataattccaagaaccaggtcagccttaag  ctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgccgtgtattactgcgccaagcac  tactattacggaggaagctacgctatggactattggggacagggcactctc  gtgactgtgagcagcggcggtggagggctggaggtggaggatccgggtgg  gggtgggtcaggcggaggagggagcagattgtgatgactcagtcaccagcc  accctttctctttcaccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccagc  caggacatttctaagtacctcaactgggtatcagcaaaaaccggggcaggcc  cctcgctcctgatctaccatacctcacgccttactctggatccccgct  cggtttagcggatcaggatctggtagcactacactctgaccatttccagc  ctgcagccagaagatttgcagtgatcttctgccagcagggcaataccctt  ccttacaccttcggtcagggaaaccaagctcgaaatcaagcaccatcacat  catcatcaccac</p>
<p><b>100798 CAR8- scFv Soluble - aa</b></p>	<p>80</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u></b>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslp  dygvswirpppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvs  lssvtaadtavyycakhyyyggsyamywgqgtlvtvssggggsgggsgg  ggsggggseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgqa  prlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqgntl  pytfgqgkcleik<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>104882 CAR 8 - Completo - nt</b></p>	<p>92</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcac  gccgctcgcccacaagtcagcttcaagaatcagggcctggctgggtgaag  ccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgccctcca  gactacggagtgagctggattagacagcctcccgaaagggactggagtgg  atcggagtgatttgggtagcgaaccacttactatcaatcttcctgaag  tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag  ctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcat  tactactatggagggctctacgccatggactactggggccagggactctg  gtcactgtgtcatctggtaggaggttagcggaggaggcgggagcgggtgga  gggtggctccggaggcgggtgggtcagaaatcgtgatgaccagagccctgca  accctgtccctttctccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcatca  caagatatctcaaaatcctcaattgggtatcaacagaagcgggacaggcc  cctaggcttcttctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccga  cgcttagcgggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatct  ctccagcccaggaacttcgcccgtctacttctgccagcagggtaacacctg  ccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactccc</p>

		gctccaaggccaccaccctgccccgaccatcgctctcagccgctttcc ctgcgccggagggcatgtagaccgcagctggtggggcctgcataccgg ggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtact tgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt cggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgcccgggtcccagaggaggaggaa ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggc gggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
<b>104882 CAR8 - Completo - aa</b>	38	MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsctlsltctvsgvslp <u>dygvs</u> wirpppgkglewig <u>viwgsettyyqsslks</u> rvtiskdnsknqvs lssvtaadtavyycak <u>hyyyggsyamdy</u> wggggtlvtvssggggsgggsgg ggsggggseivmtqspatlsispgeratlsc <u>rasqdiskyln</u> wyqqkpgqa prlliy <u>htsrlhs</u> giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyc <u>qqgntl</u> <u>pyt</u> fgqggtkleiktttpprppptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvq ttqeedgcscrffpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr eeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkraeayseigmkger rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
<b>CAR9</b>		
<b>dominio scFv de CAR9</b>	9	eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyht srllhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgt kleikggggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsctlsltctvsg vslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknq vslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywggggtlvtvss atggccctcccagtgaccgctctgctgctgctctcgcacttcttccat gccgctcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctg tcacccggcgagagggaacccttcatgcagggccagccaggacatttct aagtacctcaactggtatcagcagaagccagggcaggctcctcgctgctg atctaccacaccagccgctccacagcggatccccgccagatttccggg
<b>99789 CAR9 - scFv Soluble - nt</b>	69	

ES 2 876 974 T3

		<p>agcgggtctggaaccgactacaccctcaccatctcttctctgcagcccag  gatttcgccgtctatctctgccagcaggggaataactctgccgtacacctc  ggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcggaggatcaggcgggtggc  ggaagcggaggagggtggctccggaggaggaggttccaagtgcagcttcaa  gaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaaccctctccctgacttgt  accgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttggattcgccag  cctccggggaagggctcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagact  acttactacaattcatcacttaagtcacgggtcaccatcagcaaagataat  agcaagaaccaagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgtgacacc  gccgtgtactattgtgccaaacattactattacggagggtcttatgctatg  gactactggggacaggggaccctgggtgactgtctctagccatcaccatcac  caccatcatcac</p>
<p><b>99789 CAR9- scFv Soluble - aa</b></p>	<p>81</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u></b>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdis  kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpe  dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikggggsgggsgggsgggsgvqlq  esgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset  tyynsslksrvtiskdnsknqvs1klssvtaadtavyycakhyyyggsyam  dywgqgtlvtvss<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>105974 CAR 9 - Completo - nt</b></p>	<p>93</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccac  gccgctcggccccgaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctt  tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctcccaagacatctca  aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctg  atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggtcagcgg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatctctgtcagcaagggaaacaccctgccctacacctt  ggacagggcaccaagctcgagattaaggtggagggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagcggaggcgggtgggagccagggtccaactcaa  gaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgt  actgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacag  ccaccggggaagggctggaatggattggagtgatttggggctctgagact  acttactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaac  tctaagaatcagggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacacc  gccgtgtactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg  gattactggggacaggggtactctgggtcaccgtgtccagcaccactaccca</p>

		<p>gcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtcc  ctgcgtccggagggcatgtagaccgcagctggtggggcctgcatacccg  ggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtact  tgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt  cggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag  actactcaagaggaggacggctgttcatgcccgggttcccagaggaggaggaa  ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc  tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga  gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggc  gggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaa  aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc  agaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc  aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg</p>
<p><b>105974 CAR  9 - Completo  - aa</b></p>	<p>39</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc<u>rasqdis</u>  <u>kyln</u>wyqqkpgqaprlliy<u>htsrllhs</u>giparfsgsgsgtdytltisslqpe  dfavyfc<u>qqgntlpyt</u>fgqgtnkleikggggsgggsgggsgggsgvqlq  esgpglvkpssetlslctvsgvslp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgset</u>  <u>tyynsslks</u>rvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycak<u>hyyyggsyam</u>  <u>dy</u>wgqgtlvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavht  gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvq  ttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr  eeydvlkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeyseigmkger  rrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p><b>CAR10</b></p>		
<p><b>dominio scFv  de CAR10</b></p>	<p>10</p>	<p>qvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvswirppgkglewigvi  wgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyg  gsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqspatlsl  spgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrllhsqiparfsg  sgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtnkleik</p>
<p><b>100796  CAR10 - scFv  Soluble - nt</b></p>	<p>70</p>	<p>atggcactgcctgtcactgcctcctcctgctgctcctggcctccttctgcat  gccgccaggccccaagtcagctgcaagagtcaggaccggactggtgaag  cogtctgagactctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctcccc  gactacggagtgtcatggatccgccaacctccgggaaaggccttgaatgg  attggtgtcatctggggttctgaaaccactactacaactcttcctgaag</p>

ES 2 876 974 T3

		<p>tccaggggtgaccatcagcaaggataattccaagaaccaggtcagccttaag  ctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgccgtgtattactgcgccaagcac  tactattacggaggaagctacgctatggactattggggacagggcactctc  gtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggaggtggaggatccgggtgg  gggtgggtcaggcggaggaggaggagcagagattgtgatgactcagtcaccagcc  accctttctctttcacccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccagc  caggacatttctaagtacctcaactgggtatcagcaaaaaccggggcaggcc  cctcgectcctgatctaccatacctcacgccttactctgggtatccccgt  cggtttagcggatcaggatctggtagcactacactctgaccatttccagc  ctgcagccagaagatttcgcagtgtatttctgccagcagggcaataccctt  ccttacaccttcggtcagggaaaccaagctcgaaatcaagcaccatcacat  catcaccaccat</p>
<p><b>100796 CAR10- scFv Soluble - aa</b></p>	<p>82</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u></b>qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslp  dygvswirppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdsknqvslk  lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgg  ggsggggseivmtqspatlsispgeratlsctasqdiskylnwyqqkpgqa  prlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntl  pytfgqgkkleik<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>105975 CAR 10 Completo - nt</b></p>	<p>94</p>	<p>atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccac  gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctt  tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgcagagcctccaagacatctca  aaataccttaattgggtatcaacagaagcccggacaggetcctcgcttctg  atctaccacaccagccggtccattctggaatccctgccaggttcagcgg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatcttctgtcagcaagggaaaccctgccctacacctt  ggacagggcaccagctcgagattaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagcggagcgggtgggagccaggtccaactcaa  gaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgt  actgtgagcggagtgctctccccgattacgggggtgcttggatcagacag  ccaccggggaagggctggaatggattggagtgattggggctctgagact  actactacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaac  tctaagaatcaggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacacc  gccgtgactattgcgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatg  gattactggggacagggactctgggtcaccgtgtccagcaccactaccca</p>

ES 2 876 974 T3

		gcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtcc ctgctccggaggeatgtagaccgcagctggtggggcctgcatacccg ggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggcccctctggctggtact tgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactcttactgtaaagcggg cgaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcag actactcaagaggaggacggctgttcatgccggtcccagaggaggaggaa ggcggtgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggc gggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc agaagaggcaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg
<b>105975 CAR10 Completo aa</b>	40	<b>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLS</b> <u><b>CRASQDIS</b></u> <b>KYLN</b> WYQQKPGQAPRLLIY <u><b>HTSRLHS</b></u> GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFAVYFC <u><b>QQGNTLPYT</b></u> FGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQ ESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLP <u><b>DYGVS</b></u> WIRQPPGKGLEWIG <u><b>VIWGSET</b></u> <u><b>TYNSSLKS</b></u> RVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAK <u><b>HYYYGGSYAM</b></u> <u><b>DY</b></u> WGQGTLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR
<b>CAR11</b>		
<b>dominio scFv de CAR11</b>	11	eivmtqspatlsfspgeratls <del>crasqdisk</del> kylnwyqqkpgqaprlliyht srlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgt kleikggggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslp ygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslkl ssvtaadtavyycahyygggsyamdywgqgtlvtvss
<b>103101 CAR11 - scFv Soluble - nt</b>	71	Atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccac gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctt tcaccgggtgagcgcgaaccctgtcttgagagcctccaagacatctca

ES 2 876 974 T3

		<p>aaataccttaattggtatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctg  atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggtcagcgg  agcggatctgggaccgactacaccctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatttctgtcagcaaggaacaccctgcctacacctt  ggacagggcaccaagctcgagattaaggtggaggtggcagcggaggaggt  gggtccggcgggtggaggaagccagggtccaactccaagaaagcggaccgggt  cttgtgaagccatcagaaactcttccactgacttgtactgtgagcggagt  tctctccccgattacgggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagggt  ctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactactacaattca  tcctcaagtcaagcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtg  tactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcctgtactattgc  gctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacag  ggtactctggtcaccgtgtccagccaccaccatcatcaccatcaccat</p>
<p><b>103101  CAR11- scFv  Soluble - aa</b></p>	<p>83</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u></b>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdis  kylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpe  dfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikggggsgggsgggsgvqlqesgpg  lvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyns  slksrvtiskdnsknqvsllkssvtaadvyycahyyyggsyamdywgq  gtlvtvss<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>105976 CAR  11 Completo  - nt</b></p>	<p>95</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgcaactcctcctgccactggctctgctgcttca  gccgctcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaag  ccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctccca  gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtgg  atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactataactcttccctgaag  tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag  ctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtgccaagcat  tactactatggagggtcctacgccatggactactggggccagggactctg  gtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga  gggtggtccggagggtggcggaaagcgaatcgtgatgaccagagccctgca  accctgtcccttctcccggggaacgggctacccttcttctgctgggcatca  caagatatctaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggc  cctaggcttcttctaccacacctctcgctgcatagcgggattcccgca  cgcttagcgggtctggaagcgggaccgactaactctgacctctcatct  ctccagcccaggacttcgccgtctacttctgccagcagggtaacacctg</p>

ES 2 876 974 T3

		<p>ccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgagatcaaaaccactactccc  gctccaaggccaccaccctgccccgaccatcgctctcagccgctttcc  ctggtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggcgtgcataccgg  ggtcttgacttcgctgcgatctacatttgggcccctctggctggtact  tgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggt  cggaagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcatgaggcctgtgcag  actactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaa  ggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcc  tacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggaga  gaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggc  gggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaa  aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgc  agaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacc  aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg</p>
<p><b>105976</b>  <b>CAR11</b>  <b>Completo</b>  <b>aa</b></p>	41	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLP  <u><b>DYGV</b></u>SWIRQPPGKLEWIG<u><b>VIWGSETTYNSSLKS</b></u>RVTIISKDNSKNQVSLK  LSSVTAADTAVYYCAK<u><b>HYYYGGSYAMDY</b></u>WGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGSGG  GGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLS<u><b>CASQDISKYL</b></u>NWYQQKPGQA  PRLLIY<u><b>HTSRLHS</b></u>GIPARFSGSGSDYTLTISSLQPEDFAVYFC<u><b>QQGNTL</b></u>  <u><b>PYT</b></u>FGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR  GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ  TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRR  EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGER  RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
<p><b>CAR12</b>  <b>dominio scFv</b>  <b>de CAR12</b></p>	12	<p>qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigvi  wgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyyg  gsyamywgqglvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlsfspger  atlsccrasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrlhsgiparfsgsgsgt  dyltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkcleik</p>
<p><b>103104</b>  <b>CAR12- scFv</b>  <b>Soluble - nt</b></p>	72	<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcac  gccgctgcccacaagtccagcttcaagaatcaggcctggtctggtgaag</p>

ES 2 876 974 T3

		<p>ccatctgagactctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctccca  gactacggagtgagctggattagacagcctcccggaaagggactggagtgg  atcggagtgatttggggtagcgaaccacttactataactcttcctgaag  tcacgggtcaccatttcaaaggataactcaaagaatcaagtgagcctcaag  ctctcatcagtcaccgccgctgacaccgccgtgtattactgtccaagcat  tactactatggagggtcctacgccatggactactggggccagggaactctg  gtcactgtgtcatctggaggaggtagcggaggaggcgggagcgggtgga  gggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtccctttct  cccggggaacgggctaccctttctgtcgggcatcacaagatatctcaaaa  tacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttatc  taccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgcttagcgggtct  ggaagcgggaccgactaactctgaccatctcatctctccagcccaggac  ttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggc  cagggcaccaagcttgagatcaaacatcaccaccatcatcaccatcac</p>
<p><b>103104</b>  <b>CAR12- scFv</b>  <b>Soluble - aa</b></p>	<p>84</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u></b>qvqlqesgpglvkpsletlslctvsgvslp  dygvswirppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslk  lssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgg  ggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlli  yhtrsrlhsgiparfsgsgsgtdytltlisslqpedfavycqqgntlpytfg  qgtleik<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>105977 CAR</b>  <b>12 -</b>  <b>Completo - nt</b></p>	<p>96</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccac  gccgctcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctt  tcaccgggtgagcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctca  aaataccttaattggtatcaacagaagccggacaggctcctcgcttctg  atctaccacaccagccggctccattctggaatccctgccagggtcagcgg  agcggatctgggaccgactacacctcactatcagctcactgcagccagag  gacttcgctgtctatttctgtcagcaaggaacaccctgccctacacctt  ggacagggcaccaagctcgagattaaagggtggagggtggcagcggaggagt  gggtccggcgggtggaggaagccagggtccaactccaagaaagcggaccgggt  cttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtactgtgagcggagt  tctctccccgattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagggt  ctggaatggattggagtgatttggggtctgagactactactacaactca  tcctcaagtacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcagggtg  tactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgc</p>

		<p>gctaagcattactattatggcgaggactacgcaatggattactggggacag                  ggtactctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccc                  accccggctcctaccatcgectcccagcctctgtccctgcgtccggaggca                  tgtagaccgcgagctggtggggccgtgcataccggggctcttgacttcgcc                  tgcgatatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggctctgctg                  ctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctg                  tacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggag                  gacggctgttcatgccggttcccagaggaggagggaaggcggctgcgaactg                  cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag                  aaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtg                  ctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcaga                  aagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggca                  gaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggc                  cacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgac                  gctcttcacatgcaggecctgccgcctcgg</p>
<p><b>105977</b>  <b>CAR12</b> -  <b>Completo</b> -  <b>aa</b></p>	42	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSC<u><b>RASQDIS</b></u>  <u><b>KYLN</b></u>WYQQKPGQAPRLLIY<u><b>HTSRLHS</b></u>GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPE                  DFAVYFC<u><b>QOGNTLPYT</b></u>FGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPG                  LVKPSSETLSLTCTVSGVSLP<u><b>DYGVSW</b></u>WIRQPPGKGLEWIG<u><b>VIWGSETTYNS</b></u>  <u><b>SLKS</b></u>RVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAK<u><b>HYYYGGSYAMDY</b></u>WGQ                  GTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA                  CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE                  DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV                  LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK                  HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>

Tabla 7: Construcciones de CAR CD19 Murinas

<b>CTL019</b>		
<p><b>CTL019-</b>  <b>scFv</b>  <b>Soluble-</b>  <b>Histag - nt</b></p>	97	<p>atggccctgcccgtcaccgctctgctgctgccccttgcctctgcttcttcat                  gcagcaaggccggacatccagatgacccaaccacctcatccctctctgcc                  tctcttgagacagggtgaccatttcttgtcgcgccagccaggacatcagc                  aagtatctgaactggtatcagcagaagccggacggaaccgtgaagctcctg</p>

ES 2 876 974 T3

		<p>atctaccatacctctcgcctgcatagcggcgtgccctcacgcttctctgga  agcggatcaggaaccgattattctctcactatttcaaactcttgagcaggaa  gatattgccacctatttctgccagcagggtataacctgccctacacctc  ggaggagggaccaagctcgaaatcaccggtggaggaggcagcggcggtgga  gggtctggtggagggtggttctgaggtgaagctgcaagaatcaggccctgga  cttgtggcccttcacagtcctgagcgtgacttgaccggtgtccggagtc  tcctgcccgactacggagtgatcatggatcagacaacctccacggaaagga  ctggaatggctcgggtgcatctgggtagcgaaactacttactacaattca  gccctcaaaagcaggctgactattatcaaggacaacagcaagtcccaagt  ttcttaagatgaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgt  gctaagcactactactacggaggatcctacgctatggattactggggacaa  ggtacttccgtcactgtctcttccacaccatcatcaccatcaccatcac</p>
<p><b>CTL019- scFv Soluble -Histag- aa</b></p>	<p>98</p>	<p><b><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u></b>diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdis  kylnwyqqkpdgtvkllyhtsrhsgvpsrfsqsgsgtdysltisnleqe  diatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevkqlqesgpg  lvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirpprkglewlgviwgsettyyns  alksrhtiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycahyyyggsyamdywgq  gtsvtvss<b><u>hhhhhhh</u></b></p>
<p><b>CTL019 Completo - nt</b></p>	<p>99</p>	<p>atggccttaccagtgaccgccttgetcctgccgctggccttgetgctccac  gccgccaggccggacatccagatgacacagactacatcctcctgtctgcc  tctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagt  aaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctg  atctaccatacatcaagattacactcaggagtcctcatcaagggtcagtggc  agtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaa  gatattgccacttacttttgccaacagggtatacgttccgtacacgctc  ggaggggggaccaagctggagatcacaggtggcgggtggctcgggcgggtggt  gggtcgggtggcggcggatctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggc  ctggtggcgcctcacagagcctgtccgtcacatgcaactgtctcaggggtc  tcattaccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaaggggt  ctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaccacatactataattca  gctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagtt  ttcttaaaaatgaacagctctgcaaactgatgacacagccatttactactgt  gccaacattattactacgggtggtagctatgctatggactactggggccaa  ggaacctcagtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcggcggcaccacca</p>

		<p>acaccggcgcccaccatcgcggtcgagcccctgtccctgcgcccagaggcg                  tgccggccagcgggcgggggcgagtgacacgagggggctggacttcgcc                  tgtgatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtggggctccttctc                  ctgtcactgggtatcaccctttactgcaaacggggcagaaagaactcctg                  tataatccaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaa                  gatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg                  agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcagggccag                  aaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtt                  ttggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaagg                  aagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcg                  gaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcggcgagggggcaagggg                  cacgatggcctttaccaggggtctcagtacagccaccaaggacacctacgac                  gcccttcacatgcaggccctgccccctcgc</p>
<b>CTL019 Completo - aa</b>	58	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdis                  kylnwyqqkpdgtvkllyhtsrlhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqe                  diatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevklqesgpg                  lvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqprrkglewlgviwgsettyyns                  alksrlytiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycahyyyggsyamdywgq                  gtsvtvssttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfa                  cdiyiwaplagtgcvlslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqee                  dgscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreedydv                  ldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkg                  hdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<b>dominio scFv de CTL019</b>	59	<p>diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvkllyht                  srlhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfggg                  kleitggggsgggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslp                  ygvswirqprrkglewlgviwgsettyynsalksrlytiikdnsksqvflkm                  nslqtddtaiyycahyyyggsyamdywgqgtsvtvss</p>

Las secuencias de las secuencias de CDR humanizadas de los dominios scFv se muestran en la Tabla 4 para los dominios variables de la cadena pesada y en la Tabla 5 para los dominios variables de la cadena ligera. "ID" representa la SEQ ID NO respectiva para cada CDR

5

Tabla 4 CDRs de Dominio Variable de Cadena Pesada (Kabat)

Candidato	DIR	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
murina CART19		GVSLPDYGVV	19	VIWGSETTYNSALKS	20	HYYYGGSYAMDY	24
humanizada CART19 a	VH4	GVSLPDYGVV	19	VIWGSETTYSSSLKS	21	HYYYGGSYAMDY	24
humanizada CART19 b	VH4	GVSLPDYGVV	19	VIWGSETTYQSSSLKS	22	HYYYGGSYAMDY	24

humanizada\_CART19 c    VH4    GVSLPDYGVV    19    VIWGSETTYNSSLKS    23    HYYYGGSYAMDY    24

Tabla 5 CDRs de Dominio Variable de Cadena Ligera

Candidato	DIR	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
murine CART19		RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
humanizada CART19 a	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
humanizada CART19 b	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
humanizada_CART19 c	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27

- 5 La Tabla 6 es una clave de identificación que correlaciona los nombres numéricos de las construcciones de CD19 con la orientación específica de las cadenas ligeras y pesadas del scFv, el número de unidades de enlazador (es decir, (G4S)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:107) o (G4S)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:106)), separando las cadenas pesada y ligera, y las secuencias de aminoácidos distintivas en la CDR2 de cadena pesada.

Tabla 6: Designaciones CAR CD19

Clon ID/CARn°	Alt. ID Clon	Orientación de la Cadena	Enlazadores	Sitio de mutación de CDR2 Pesado	SEQ NO	ID
104875 (CAR1)	C2136	L2H	3x	YSSSL	28	
104876 (CAR2)	C2137	L2H	3x	YQSSL	29	
104877 (CAR3)	C2138	H2L	3x	YSSSL	28	
104878 (CAR4)	C2139	H2L	3x	YQSSL	29	
104879 (CAR5)	C2140	L2H	4x	YSSSL	28	
104880 (CAR6)	C2141	L2H	4x	YQSSL	29	
104881 (CAR7)	C2142	H2L	4x	YSSSL	28	
104882 (CAR8)	C2143	H2L	4x	YQSSL	29	
105974 (CAR9)	C2144	L2H	4x	YNSSL	30	
105975 (CAR10)	C2145	H2L	4x	YNSSL	30	
105976 (CAR11)	C2146	L2H	3x	YNSSL	30	
105977 (CAR12)	C2147	H2L	3x	YNSSL	30	
CTL019	muCART19	L2H	3x	YNSAL	57	

10

Los fragmentos scFv de CAR se pueden clonar en vectores lentivirales para crear una construcción CAR de longitud completa en un solo marco de codificación, utilizando el promotor EF1 alfa para la expresión (SEQ ID NO: 100). Promotor EF1 alfa

CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAG  
GGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTTCGTGTACT  
GGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTT  
TTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTA  
CGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGC  
TTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAG  
TTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTG  
CTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATA  
GTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGG  
CCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGGCCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGG  
GGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGG  
CGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAG  
GGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGG  
CCTTTCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATT  
AGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCC  
ACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCC  
TTTTTGAGTTTGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTT  
AGGTGTCGTGA (SEQ ID NO: 100).

5 Con referencia al sitio de CDR 2 pesado (Tabla 1), pueden estar presentes cada una de las tres variaciones YSSSL, YQSSL e YNSSL (SEQ ID NOS: 28, 29 y 30, respectivamente).

Además, se puede utilizar un enlazador G4S que contiene 3 copias de la subunidad (3G4S) (SEQ ID NO: 107) y el enlazador G4S que contiene 4 copias de la subunidad (4G4S) (SEQ ID NO: 106).

10 **EJEMPLOS**

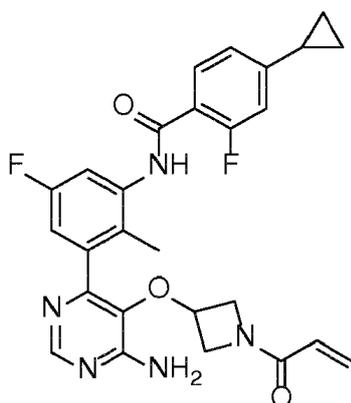
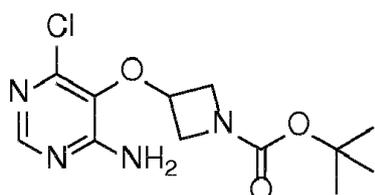
15 La divulgación se describe adicionalmente en detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la divulgación no debe interpretarse de modo alguno como limitada a los siguientes ejemplos, sino que debe interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que resulten evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en esta memoria.

20 Sin una descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, preparar y utilizar los compuestos de la presente divulgación y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo señalan específicamente diversos aspectos de la presente divulgación, y no deben interpretarse como limitante de modo alguno el resto de la divulgación.

Ejemplo 1

**N-(3-(5-((1-acrilolazetidín-3-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

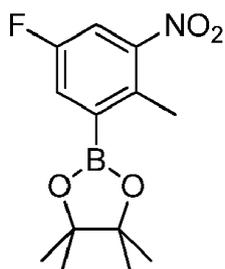
25

(1) 3-((4-amino-6-cloropirimidin-5-il)oxi)azetidina-1-carboxilato de t-erc-butilo, **INT 1**

5

A una solución de *N*-Boc-3-yodoazetidina (6,84 g, 24,16 mmol) en DMF (37 mL) se añadió 4-amino-6-cloropirimidin-5-ol (2,00 g, 13,74 mmol), seguido de carbonato de potasio (5,70 g, 41,24 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 16 h. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio. La capa acuosa se volvió a extraer con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 veces) y salmuera (2 veces), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron. El producto bruto se secó en vacío durante 30 min. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (gradiente de DCM/MeOH, 0-5%). El residuo aislado se trituró con ciclohexano. El sólido blanquecino resultante se separó por filtración, se lavó con ciclohexano y se secó en vacío para proporcionar el compuesto del título **INT 1** en forma de un sólido blanquecino.

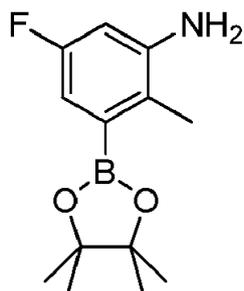
UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  301,0,  $r_t = 0,83$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7,98 (s, 1H), 7,34 (s a, 2H), 4,93-4,70 (m, 1H), 4,23-3,95 (m, 4H), 1,39 (s, 9H).

20 (2) 2-(5-fluoro-2-metil-3-nitrofenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano, **INT 2**

A una mezcla de 1-bromo-5-fluoro-2-metil-3-nitrobenzoceno (5,0 g, 21,37 mmol) y bis(difenilfosfino)ferrocenodichloropaladio(II) (0,78 g, 1,06 mmol) en dioxano (200 mL) se añadió BISPIN (8,14 g, 32,05 mmol) seguido de acetato de potasio (7,34 g, 74,79 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 6 h. Después de enfriar, la mezcla parduzca se diluyó con agua (200 mL) y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y salmuera (2 veces), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; ciclohexano/EtOAc 9:1) para proporcionar **INT 2** en forma de un aceite amarillo.

$^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7,79 (d, 1H), 7,55 (d, 1H), 2,48 (s, 3H), 1,31 (s, 12H).

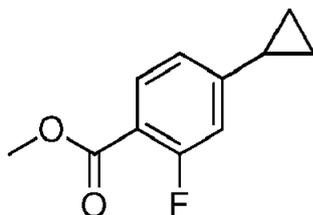
35 (3) 5-fluoro-2-metil-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina, **INT 3**



5 A una solución de **INT 2** (12,4 g, 44,1 mmol) en EtOAc (300 mL) se le añadió Pd al 10%/ C (4,0 g). La mezcla de reacción se hidrogenó a temperatura ambiente y presión normal durante 18 h. La mezcla se filtró sobre tierra de diatomeas (Supelco) y el filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice, EtOAc) para proporcionar **INT 3** en forma de un sólido beige.

MS (ESI): 252,2 [M+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 6,52-6,46 (m, 2H), 5,13 (s a, 2H), 2,17 (s, 3H), 1,29 (s, 12H).

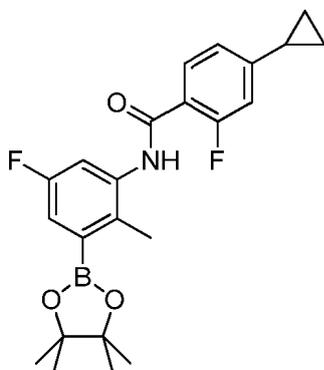
10 (4) 4-ciclopropil-2-fluorobenzoato de metilo, **INT 4**



15 Una mezcla de 4-bromo-2-fluorobenzoato de metilo (20,00 g, 85,82 mmol), ácido ciclopropilborónico (9,68 g, 112,69 mmol) y fosfato de potasio (35,70 g, 168,00 mmol) en tolueno (250 mL) se desgasificó con argón durante 5 min. Luego, se añadieron triciclohexilfosfina (2,36 g, 8,41 mmol) y agua (1,82 mL, 101,00 mmol) y la mezcla se desgasificó de nuevo con argón durante 5 min. Se añadió acetato de paladio(II) (0,94 g, 4,21 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante la noche. La mezcla se repartió entre EtOAc y agua. La suspensión se filtró a través de una almohadilla de Celite. Las fases del filtrado se separaron y la capa acuosa se volvió a extraer con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (ciclohexano/EtOAc gradiente 0- 15%) para proporcionar **INT 4** en forma de un aceite naranja.

20 UPLC-MS: MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 195,0, rt = 1,11 min. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7,83 (t, 1H), 6,90 (d, 1H), 6,79 (d, 1H), 3,92 (s, 3H), 2,00-1,96 (m, 1H), 1,15-1,03 (m, 2H), 0,84-0,73 (m, 2H).

25 (5) 4-ciclopropil-2-fluoro-*N*-(5-fluoro-2-metil-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)benzamida, **INT 5**

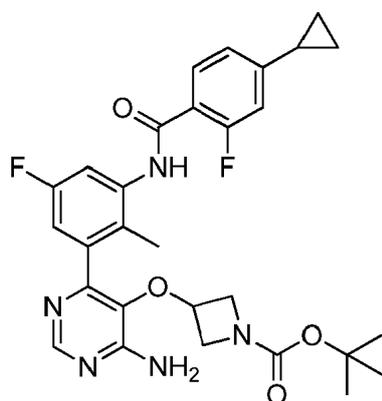


35 A una solución de **INT 3** (5,88 g, 23,41 mmol) e **INT 4** (5,00 g, 25,70 mmol) en THF (200 mL) a 0 °C se añadió gota a gota una solución de NaHMDS (1 M en THF, 35,1 mL, 35,10 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h

y luego se añadió una solución adicional de NaHMDS (1 M en THF, 5,0 mL, 5,00 mmol). Después de agitar durante otra hora, se añadió más solución de NaHMDS (1 M en THF, 5,0 mL, 5,00 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 h adicionales. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El producto bruto se suspendió en EtOAc y se filtró. El sólido recogido se lavó con EtOAc y se secó en vacío para proporcionar compuesto **INT 5** en forma de un sólido beige.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  414,2,  $r_t = 1,45$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 9,70 (s a, 1H), 7,62 (t, 1H), 7,51 (d, 1H), 7,19 (dd, 1H), 7,10-7,00 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,06-1,96 (m, 1H), 1,31 (s, 12H), 1,08-0,99 (m, 2H), 0,82-0,73 (m, 2H).

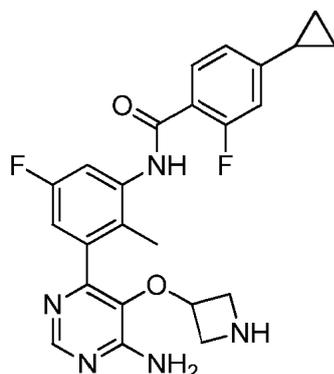
(6) 3-((4-amino-6-(3-(4-ciclopropil-2-fluorobenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidin-5-il)oxi)azetidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo, **INT 6**



A una solución de **INT 1** (500 mg, 1,66 mmol) en DME (8,4 mL) y agua (1,2 mL) se añadió **INT 5** (756 mg, 1,83 mmol) seguido de una solución acuosa de carbonato de sodio (1 M, 4,99 mL, 4,99 mmol). La mezcla se desgasificó con argón durante 10 min y luego se añadió dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (58,3 mg, 0,083 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 min a 110 °C en un reactor de microondas. Se añadió más **INT 5** (137 mg, 0,33 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 10 min adicionales en un reactor de microondas. La mezcla se repartió entre EtOAc y una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio. El sólido se separó por filtración, se lavó con agua y EtOAc y se secó en vacío para proporcionar el compuesto **INT 6** en forma de un sólido blanquecino. Las aguas madres de la filtración se transfirieron a un embudo de extracción y las capas se separaron. La capa acuosa se volvió a extraer con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DCM/EtOAc, 0-100%) para proporcionar más **INT 6** en forma de un sólido blanquecino.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  552,3,  $r_t = 1,15$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 9,86 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,66 (t, 1H), 7,58 (d, 1H), 7,21-6,91 (m, 5H), 4,31-4,16 (m, 1H), 3,77-3,46 (m, 4H), 2,08-1,99 (solapamiento s, 3H y m, 1H), 1,31 (s, 9H), 1,12-0,98 (m, 2H), 0,87-0,73 (m, 2H).

(7) *N*--(3-(6-amino-5-(azetidín-3-iloxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 7**



A una solución de **INT 6** (100 mg, 0,18 mmol) en DCM (2,0 mL) se añadió gota a gota TFA (0,210 mL, 2,72 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla se concentró y el residuo se secó en vacío para proporcionar **INT 7** bruto en forma de la sal de TFA en forma de un aceite pardo.

5 UPLC-MS: MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 452,3, rt = 0,73 min. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 10,04 (s, 1H), 8,84 (s, a, 2H), 8,63 (s, 1H), 8,56 (s, a, 2H), 7,73-7,61 (m, 2H), 7,32-7,24 (m, 1H), 7,14-7,03 (m, 2H), 4,54-45 (m, 1H), 3,92-3,46 (m, a, 4H), 2,10-2,01 (solapamiento s, 3H y m, 1H), 1,12-1,03 (m, 2H), 0,83-0,77 (m, 2H).

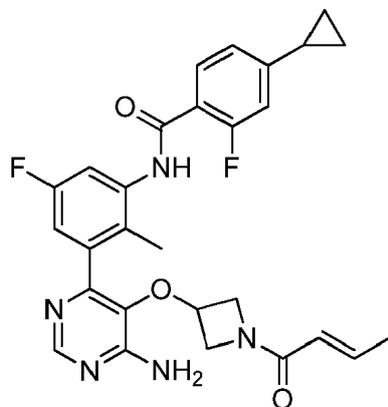
10 (8) *N*-(3-(5-((1-acrililazetidín-3-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

A una solución de ácido acrílico (73 mg, 1,02 mmol) en DMF (1,5 mL) se añadió DIPEA (0,47 mL, 2,71 mmol) seguido de una solución de T3P (50% en DMF) (0,51 mL, 0,88 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 20 min. A una solución de **INT 7** (que contiene 2,5 eq de TFA) (499 mg, 0,68 mmol) y DIPEA (0,36 mL, 2,03 mmol) en DMF (5,3 mL) a 0 °C se añadió gota a gota la solución anterior. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 90 min. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio. La capa acuosa se volvió a extraer con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera (2 veces), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DCM/(MeOH con hidróxido de amonio acuoso al 2%), 0-10%) para proporcionar el compuesto del título del **Ejemplo 1** en forma de un sólido blanco después de la trituración con dietil éter.

25 UPLC-MS: MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 506,2, rt = 0,93 min. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 9,89 (s, 1H), 8,2 (s, 1H), 7,66 (t, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,2-7,0 (m, 5H), 6,15 (dd, 1H), 6,02 (dd, 1H), 5,61 (dd, 1H), 4,37-4,29 (m, 1H), 4,11-3,95 (m, 2H), 3,8-3,66 (m, 2H), 2,08-1,99 (solapamiento s, 3H y m, 1H), 1,08-1,02 (m, 2H), 0,83-0,76 (m, 2H).

Ejemplo 2

30 **(E)-N**-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-enoil)azetidín-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

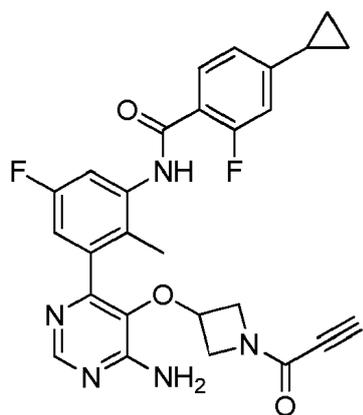


35 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 1** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 1** reemplazando el ácido acrílico con ácido (*E*)-but-2-enoico en la etapa 8.

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 520,2, rt = 0,97 min.:

Ejemplo 3

40 **N**-(3-(6-amino-5-((1-propilolilazetidín-3-il)oxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida



El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 1** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 1** reemplazando el ácido acrílico por ácido propiónico en la etapa 8.

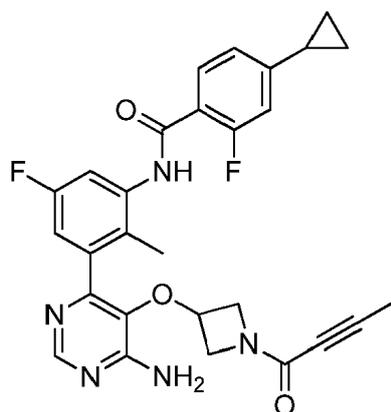
5

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  504,2,  $rt = 0,95$  min.:

Ejemplo 4

10

**N-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-inoil)azetidín-3-il)oxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



15

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 1** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 1** reemplazando el ácido acrílico por ácido 2-butinoico en la etapa 8.

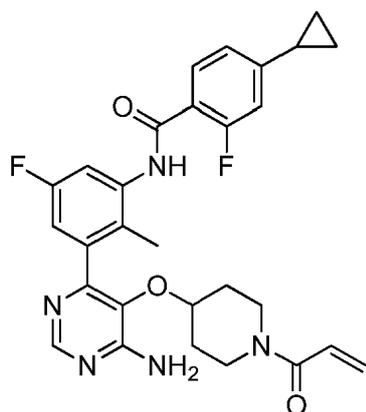
UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  518,2,  $rt = 0,97$  min.:

20

Ejemplo 5

**N-(3-(5-((1-acriloilpiperidín-4-il)oxi)-6-aminopirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

25



El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 1** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 1** reemplazando *N*-Boc-3-yodoazetidina por *N*-Boc-4-bromopiperidina en la etapa 1.

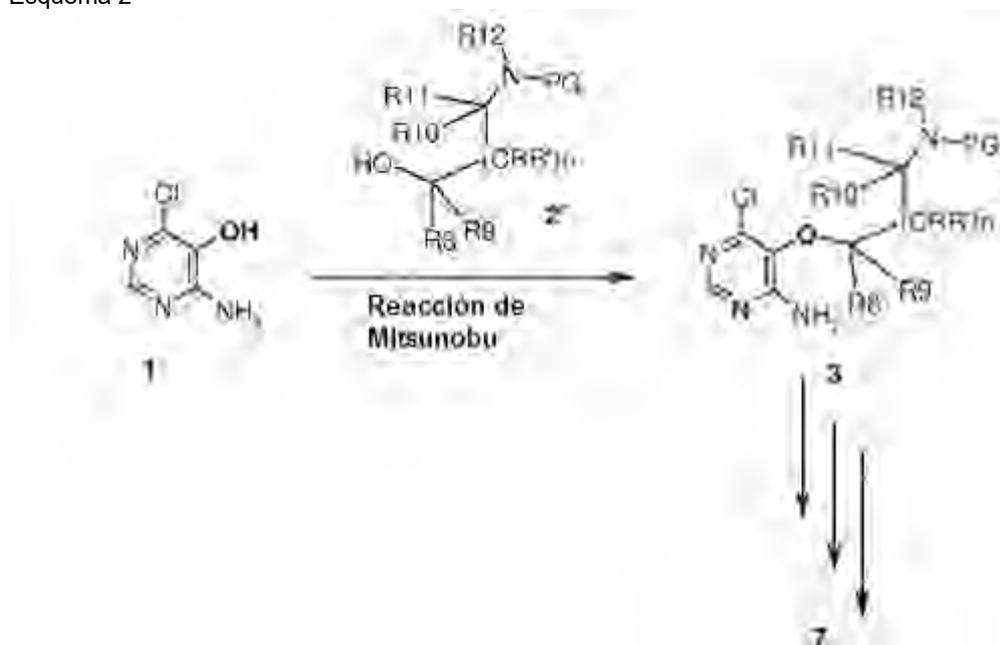
5

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  534,2,  $t_r = 0,94$  min.:

Alternativamente, los agentes de la divulgación se pueden preparar mediante una secuencia de reacción que implica la reacción de Mitsunobu de 4-amino-6-cloropirimidin-5-ol con un alcohol de fórmula 2' utilizando un azodicarboxilato apropiado, tal como DIAD, y Smopex-301 o trifenilfosfina; a continuación, se llevan a cabo las secuencias de reacción del esquema 1, es decir, el acoplamiento de Suzuki con un éster borónico utilizando un catalizador apropiado, tal como dicloruro de bis(trifenilfosfina)-paladio(II), desprotección utilizando un ácido apropiado, tal como TFA o HCl, seguido de la formación de amida de la sal de amonio o la amina libre con un ácido y utilizando un reactivo de acoplamiento apropiado, tal como T3P, y una base apropiada, tal como DIPEA, o con un cloruro de ácido utilizando una base apropiada, tal como DIPEA, para proporcionar un compuesto de la divulgación, es decir, un compuesto de fórmula 7, tal como se muestra en el **Esquema 2** que figura a continuación:

15

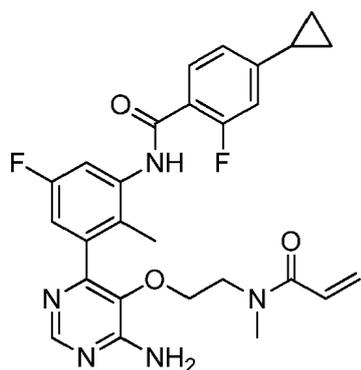
Esquema 2



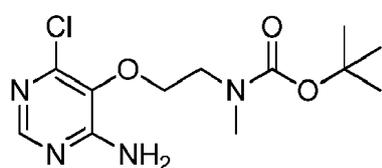
20

Ejemplo 6  
***N*-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-metilacrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

25



(1) (2-((4-amino-6-cloropirimidin-5-il)oxi)etil)(metil)carbamato de *terc.*-butilo, **INT 8**



5

A una solución de 4-amino-6-cloropirimidin-5-ol (contenido del 90%, 2,00 g, 12,37 mmol) en THF (120 mL) se añadió *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxiethylamina (6,07 g, 34,64 mmol) seguido de SMOPEX-301 (1 mmol/g, 30,90 g, 30,90 mmol). Luego se añadió lentamente una solución de DIAD (6,01 mL, 30,52 mmol) en THF (20 mL). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 3 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró para proporcionar un aceite que se trituró con EtOAc y se formó un precipitado blanco. El sólido se retiró por filtración para proporcionar **INT 8**. Las aguas madres se concentraron y el residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DCM / EtOAc, 0-100%) para proporcionar más **INT 8** en forma de un sólido beige.

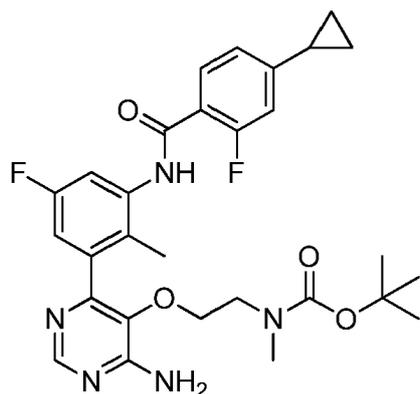
10

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  303,1,  $r_t = 0,86$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7,97 (s, 1H), 7,26 (s, a, 2H), 4,02-3,93 (m, 2H), 3,54 (t, 2H), 2,89 (s, a, 3H), 1,39 (s, 9H).

15

(2) (2-((4-amino-6-(3-(4-ciclopropil-2-fluorobenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)(metil)carbamato de *terc.*-butilo, **INT 9**

20



A una solución de **INT 8** (447 mg, 1,48 mmol) en DME (7,0 mL) y agua (1,0 mL) se añadió **INT 5** (638 mg, 1,54 mmol) seguido de una solución acuosa de carbonato de sodio (1 M, 4,21 mL, 4,21 mmol). La mezcla se desgasificó con argón durante 10 min y luego se añadió dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (49,2 mg, 0,070 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 10 min en un reactor de microondas. Se añadió más **INT 5** (232 mg, 0,56 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 15 min adicionales en un reactor de microondas. La mezcla se repartió entre solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DCM/EtOAc, 0-100%) para proporcionar **INT 9** en forma de un sólido blanquecino.

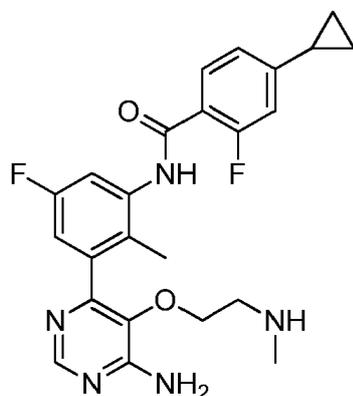
25

30

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  554,3,  $r_t = 1,21$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) rotámeros 9,76 (s, 1H), 8,19 (s, 1H),

7,74-7,53 (m, 2H) 7,20-6,85 (m, 5H), 3,57-3,48 (m, 2H), 3,29-3,15 (m, 2H), 2,58 (s, 3H), 2,08-1,99 (solapamiento s, 3H y m, 1H), 1,34 y 1,28 (s, 9H), 1,10-1,02 (m, 2H), 0,84-0,77 (m, 2H).

5 (3) *N*-(3-(6-amino-5-(2-(metilamino)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 10**



10 A una solución de **INT 9** (335 mg, 0,61 mmol) en DCM (5,0 mL) se añadió TFA (0,47 mL, 6,05 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 h. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se secó en vacío para proporcionar **INT 10** en forma de la sal TFA en forma de un aceite pardo.

15 UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  454,3,  $rt = 0,73$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 10,02 (s, 1H), 9,07-8,13 (s, v a, numero de H no se puede asignar), 8,58 (s, 1H), 8,51 (s, a, 2H), 7,71-7,61 (m, 2H), 7,29-7,22 (m, 1H), 7,14-7,05 (m, 2H), 3,75-3,65 (m, 2H), 3,16-3,07 (m, 2H), 2,48 (s, 3H, solapamiento con pico de disolvente), 2,12 (s, 3H), 2,10-1,99 (m, 1H), 1,11-1,03 (m, 2H), 0,83-0,76 (m, 2H).

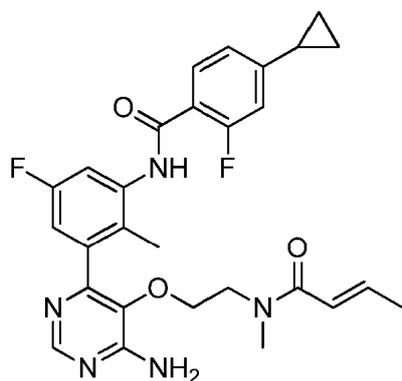
20 (4) *N*-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-metilacrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

25 A una solución de ácido acrílico (62 mg, 0,87 mmol) en DMF (4,0 mL) se añadió DIPEA (0,302 mL, 1,73 mmol) seguido de una solución de T3P (50% en DMF) (0,438 mL, 0,750 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 30 min. A una solución de **INT 10** (que contiene 3,0 eq de TFA, 90%, 510 mg, 0,577 mmol) y DIPEA (0,302 mL, 1,731 mmol) en DMF (2,0 mL) a 0 °C se añadió gota a gota la solución anterior. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua (2 veces) y salmuera (2 veces), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DCM/(MeOH con hidróxido de amonio acuoso al 2%), 0-9%) para proporcionar el compuesto del título del **Ejemplo 6** en forma de un sólido blanco.

30 UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  508,3,  $rt = 0,95$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) rotámeros 9,77 y 9,56 (s, total 1H), 8,25-8,14 (m, 1H), 7,79-7,50 (m, 2H), 7,17-6,93 (m, 5H), 6,70-6,55 (m, 1H), 6,06 (t, 1H), 5,59 (d, 1H), 3,63-3,40 (m, 4H), 2,80 y 2,49 (s, total 3H, pico a 2,49 solapamiento con pico de disolvente), 2,09-1,93 (m, 4H), 1,11-1,00 (m, 2H), 0,85-0,76 (m, 2H).

Ejemplo 7

40 (*E*)-*N*-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida



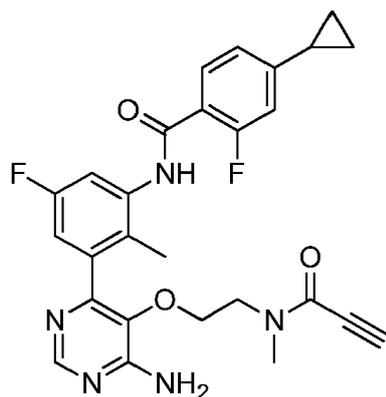
El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando ácido acrílico por ácido (*E*)-but-2-enoico en la etapa 4.

5

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  522,2, *rt* = 0,97 min.:

Ejemplo 8

10 ***N*-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-metilpropiolamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



15

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando el ácido acrílico por ácido propiónico en la etapa 4.

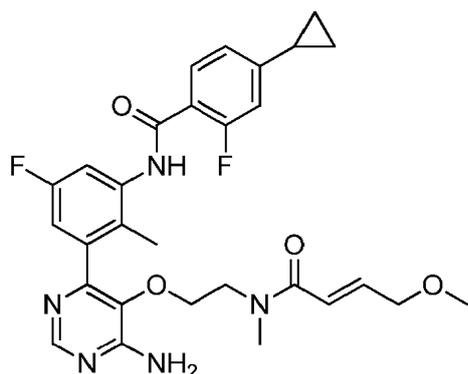
UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  506,3, *rt* = 0,95 min.:

20

Ejemplo 9

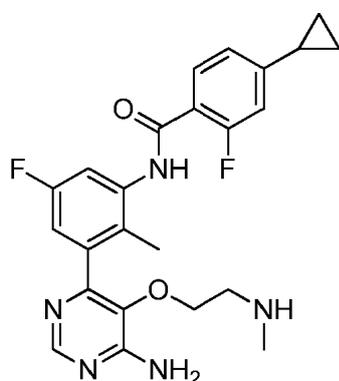
25 ***(E)*-N-(3-(6-amino-5-(2-(4-metoxi-*N*-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

25



(1) *N*-(3-(6-amino-5-(2-(metilamino)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 11**

5



A una solución de **INT 9** (2,50 g, 4,52 mmol) en DCM (30 mL) se añadió HCl (2 M en dietil éter, 20,0 mL, 40,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 h. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se secó en vacío para proporcionar **INT 11** en forma de la sal hidrocioruro en forma de un sólido blanco.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  454,2,  $r_t = 0,70$  min.  $^1H$  RMN (MeOD- $d_3$ ):  $\delta$  (ppm) 8,60 (s, 1H), 7,82 (t, 1H), 7,69-7,62 (m, 1H), 7,41-7,36 (m, 1H), 7,10 (d, 1H), 7,02 (d, 1H), 4,10-3,80 (m, a, 2H), 3,39-3,20 (m, 2H), 2,70 (s, 3H), 2,26 (s, 3H), 2,11-1,99 (m, 1H), 1,19-1,07 (m, 2H), 0,89-0,77 (m, 2H).

15

(2) *(E)*-*N*-(3-(6-amino-5-(2-(4-metoxi-*N*-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

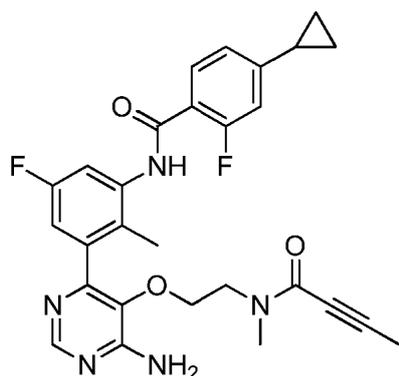
El compuesto del título se preparó siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 4 del **Ejemplo 6** reemplazando **INT 10** por **INT 11** (sal hidrocioruro) y reemplazando ácido acrílico por ácido (*E*)-4-metoxi-but-2-enoico.

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  552,2,  $r_t = 0,93$  min.:

Ejemplo 10

25

***N*-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-metilbut-2-inamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



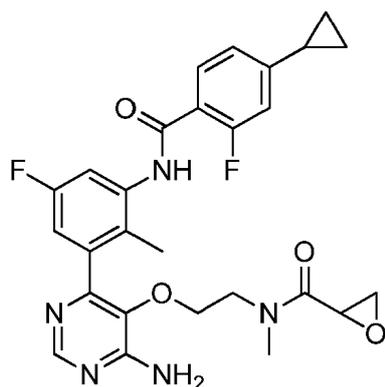
5 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando el ácido acrílico por ácido 2-butinoico en la etapa 4.

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  520,2,  $rt = 0,96$  min.:

Ejemplo 11

10

***N***-2-((4-amino-6-(3-(4-ciclopropil-2-fluorobenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-*N*-metiloxirano-2-carboxamida



15

A una solución de TBHP (5,5 M en decano, 0,079 mL, 0,434 mmol) en THF (2,0 mL) a  $-78$  °C se añadió *n*-butil litio (2,5 M en hexano, 0,145 mL, 0,362 mmol). La mezcla se agitó a  $-78$  °C durante 10 min. Luego, se añadió una solución de **Ejemplo 6** (147 mg, 0,290 mmol) en THF (1,0 mL) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 h. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (Xterra 150, gradiente de agua/acetonitrilo) para proporcionar el **Ejemplo 11** en forma de un sólido blanco después de la liofilización.

20

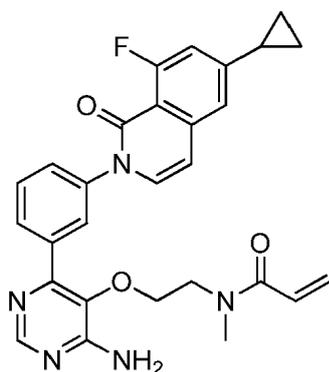
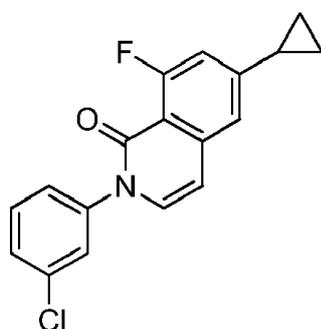
UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  524,4,  $rt = 0,88$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) rotámeros 9,83 y 9,58 (s, total 1H), 8,26-8,15 (m, 1H), 7,78-7,61 (m, 1H), 7,61-7,48 (m, 1H), 7,22-6,90 (m, 5H), 3,84-3,39 (m, 5H), 2,89 (s, 1,2H), 2,87-2,76 (m, 1H), 2,71-2,61 (m, 1H), 2,44 (s, 1,8H, solapamiento con pico de disolvente), 2,10-1,93 (m, 4H), 1,12-0,99 (m, 2H), 0,87-0,74 (m, 2H).

25

Ejemplo 12

30

***N***-2-((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-8-fluoro-1-oxisoquinolin-2(1*H*)-il)fenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-*N*-metilacrilamida

(1) 2-(3-clorofenil)-6-ciclopropil-8-fluoroisoquinolin-1(2H)-ona, **INT 12**

5

Una mezcla de 1-cloro-3-yodobenceno (0,439 ml, 3,54 mmol), 6-ciclopropil-8-fluoro-isoquinolin-1(2H)-ona (600 mg, 2,95 mmol), 2-oxociclohexanocarboxilato de etilo (0,094 mL, 0,591 mmol) y carbonato de cesio (2020 mg, 6,20 mmol) en DMSO (15 mL) se desgasificó con argón durante 5 min. Se añadió yoduro de cobre(I) (112 mg, 0,59 mmol), se selló el matraz de reacción y la mezcla se agitó a 120 °C durante 16 h. La mezcla se enfrió a TA y se diluyó con EtOAc (100 mL). La suspensión resultante se filtró sobre Hyflo y la torta de filtración se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 5-40%) para proporcionar **INT 12** en forma de un sólido amarillo.

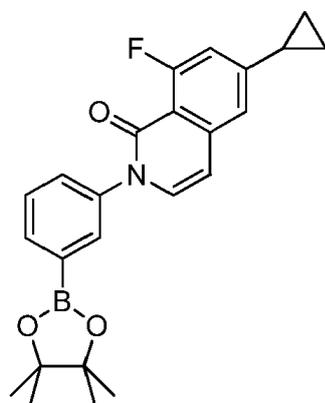
10

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  314,1,  $t_r = 1,25$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7,61 (s, 1H), 7,59-7,50 (m, 2H), 7,48-7,40 (m, 2H), 7,26 (s, 1H), 6,99 (d, 1H), 6,60 (d, 1H), 2,12-2,02 (m, 1H), 1,14-1,05 (m, 2H), 0,92-0,83 (m, 2H).

15

(2) 6-ciclopropil-8-fluoro-2-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)isoquinolin-1(2H)-ona, **INT 13**

20



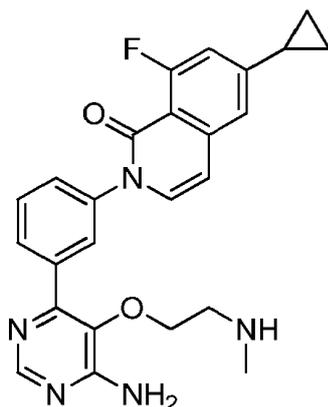
25

Se desgasificó una mezcla de **INT 12** (808 mg, 2,58 mmol), BISPIN (981 mg, 3,86 mmol), X-Phos (123 mg, 0,26 mmol) y acetato de potasio (758 mg, 7,73 mmol) en dioxano (13 mL) bajo argón durante 5 min. Se añadió tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (118 mg, 0,13 mmol) y se selló el matraz de reacción. La mezcla de reacción se agitó a 105 °C durante 2 h. La mezcla se enfrió a TA, se filtró sobre Hyflo y la torta de filtración se lavó con EtOAc. Se añadió trifenilfosfina (169 mg, 0,64 mmol) al filtrado. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante

cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 5-40%). El residuo se trituró con una mezcla de dietil éter y pentano (1:1) y se filtró. La torta de filtración se lavó con pentano y se secó en vacío para proporcionar **INT 13** en forma de un sólido blanco.

5 UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  406,3,  $rt = 1,40$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7,75-7,70 (m, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,59-7,54 (m, 2H), 7,44 (d, 1H), 7,25 (s, 1H), 6,98 (d, 1H), 6,59 (d, 1H), 2,11-2,02 (m, 1H), 1,31 (s, 12H), 1,13-1,06 (m, 2H), 0,91-0,84 (m, 2H).

10 3) 2-(3-(6-amino-5-(2-(metilamino)etoxi)pirimidin-4-il)fenil)-6-ciclopropil-8-fluoroisoquinolin-1(2H)-ona, **INT 14**



15 El **INT 14** intermedio se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo a las etapas 2 y 3 del **Ejemplo 6** reemplazando **INT 5** por **INT 13** en la etapa 2, y realizando un tratamiento básico en la etapa 3 para proporcionar **INT 14** en forma de la amina libre.

20 UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  446,3,  $rt = 0,71$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 8,21 (s, 1H), 8,13-8,02 (m, 2H), 7,63 (t, 1H), 7,51 (t, 2H), 7,45-7,31 (m, 2H), 7,27 (s, 1H), 6,99 (d, 1H), 6,62 (d, 1H), 3,73-3,64 (m, 2H), 2,73-2,64 (m, 2H), 2,23 (s, 3H), 2,12-2,03 (m, 1H), 1,14-1,06 (m, 2H), 0,92-0,83 (m, 2H).

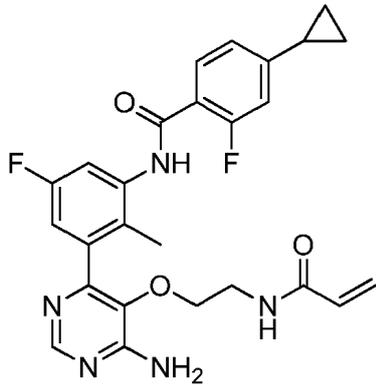
25 (4) *N*-(2-((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-8-fluoro-1-oxoisoquinolin-2(1H)-yl)fenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-*N*-metilacrilamida

30 A una solución de **INT 14** (73 mg, 0,16 mmol) y DIPEA (86  $\mu$ l, 0,492 mmol) en THF (1,6 mL) a -20 °C se le añadió cloruro de acrililo (14  $\mu$ l, 0,172 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -20 °C durante 10 min. La mezcla se diluyó con una solución acuosa de carbonato de sodio (2 M) y agua y se extrajo con DCM (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por SFC para proporcionar el **Ejemplo 12** en forma de un sólido de blanco.

35 UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  500,4,  $rt = 0,93$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) rotámeros 8,26-8,18 (m, 1H), 8,04-7,87 (m, 2H), 7,64-7,43 (m, 3H), 7,27 (s, 1H), 7,16-7,03 (m, 2H), 7,03-6,95 (m, 1H), 6,85 y 6,69 (dd, total 1H), 6,65-6,58 (m, 1H), 6,09 (d, 1H), 5,60 (t, 1H), 3,84-3,72 (m, 2H), 3,71-3,60 (m, 2H), 3,04 y 2,76 (s, total 3H), 2,13-2,02 (m, 1H), 1,16-1,05 (m, 2H), 0,93-0,83 (m, 2H).

Ejemplo 13

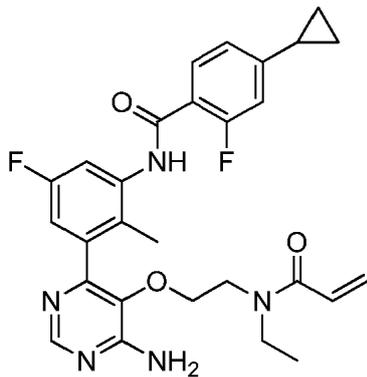
40 ***N*-(3-(5-(2-acrilamidoetoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxiethylamina por *N*-Boc-2-hidroxiethylamina en la etapa 1.  
 5 UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 494,2, rt = 0,91 min.:

Ejemplo 14

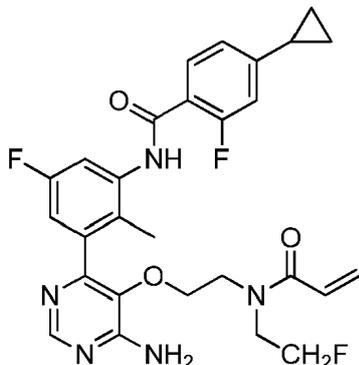
10 ***N*-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-etilacrilamido)etoxy)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



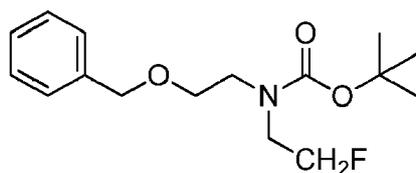
El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxiethylamina por *N*-etil-2-hidroxiethylamina en la etapa 1.  
 15 UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 522,4, rt = 0,99 min.:

Ejemplo 15

20 ***N*-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-(2-fluoroetil)acrilamido)etoxy)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



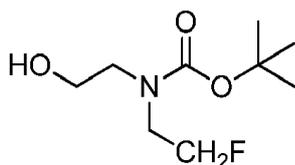
25 (1) (2-(benciloxi)etil)(2-fluoroetil)carbamato de terc.-butilo, **INT 15**



5 A una solución de hidrocloreto de 2-fluoroetanamina (4,35 g, 43,71 mmol) y 2-(benciloxi)-acetaldehído (6,04 g, 5,65 mL, 40,22 mmol) en MeOH (70 mL) se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (10,44 g, 49,26 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 h. La mezcla se concentró. El residuo se recogió en EtOAc y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio, agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se recogió en una solución acuosa de NaOH (2 M, 175 mL, 350 mmol) y se añadió dicarbonato de di-*terc.*-butilo (17,65 g, 80,87 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche.

10 La mezcla se diluyó con agua y EtOAc. Las capas se separaron. La capa acuosa se volvió a extraer con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice, gradiente de ciclohexano/EtOAc, 0-10%) para proporcionar **INT 15** en forma de un aceite incoloro pálido. MS (ESI):  $[M+H]^+$  298,3.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7,41-7,24 (m, 5H), 4,59-4,39 (m, 4H), 3,59-3,45 (m, 4H), 3,44-3,36 (m, 2H), 1,46-1,31 (m, 9H).

(2) *N*-Boc-*N*-(2-fluoroetil)-2-hidroxiethylamina, **INT 16**



20 A una solución de **INT 15** (3,40 g, 11,43 mmol) en THF (115 mL) se añadió Pd al 10%- C (340 mg). La mezcla de reacción se hidrogenó a TA y presión normal durante 7 h. Se añadió Pd al 10%-C (340 mg) y la mezcla de reacción se hidrogenó a TA y presión normal durante la noche. Se añadió más Pd al 10%-C (340 mg) y la mezcla de reacción se hidrogenó a TA y presión normal durante 4 h adicionales. La mezcla se diluyó con DCM, se filtró sobre una almohadilla de Celite y se concentró para proporcionar **INT 16** bruto en forma de un aceite incoloro.

25 MS (ESI):  $[M+H]^+$  208,2.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 4,70-4,63 (m, 1H), 4,54 (t, 1H), 4,42 (t, 1H), 3,53 (t, 1H), 3,46 (t, 3H), 3,28-3,21 (m, 2H), 1,39 (s, 9H).

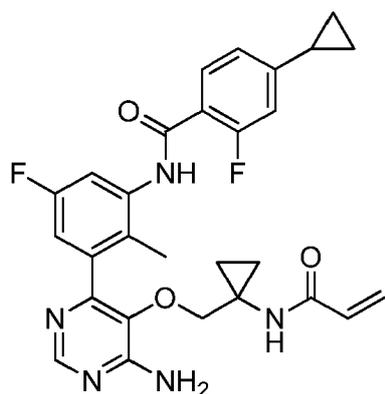
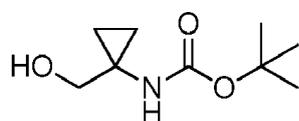
30 (3) *N*-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-(2-fluoroetil)acrilamido)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

35 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxiethylamina por **INT 16** en la etapa 1.

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  540,3,  $rt = 0,96$  min.:

40 Ejemplo 16

***N*-(3-(5-((1-acrilamidociclopropil)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

(1) *N*-Boc-1-(hidroximetil)-ciclopropilamina, **INT 17**

5

A una solución de 1-((*terc.*-butoxicarbonil)amino)ciclopropanocarboxilato de metilo (9,30 g, 43,20 mmol) en THF (45 mL) se añadió una solución de borohidruro de litio (2 M en THF, 40,0 mL, 80,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla se enfrió a 0 °C y se extinguió cuidadosamente con agua. La mezcla se extrajo con dietil éter (2 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron para proporcionar **INT 17** bruto en forma de un sólido blanco.

10

MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 188,2. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 7,03 (s, 1H), 4,55 (t, 1H), 3,38 (d, 2H), 1,37 (s, 9H), 0,63-0,50 (m, 4H).

15

(2) *N*-(3-(5-((1-acrilamidociclopropil)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxi-etilamina por **INT 17** en la etapa 1.

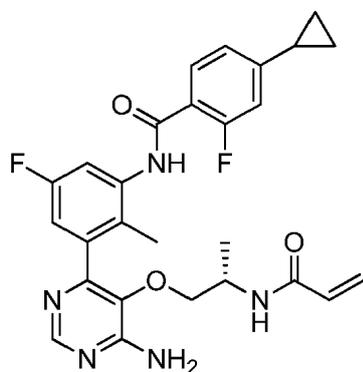
20

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 520,4, *rt* = 0,95 min.:

Ejemplo 17

25

**(S)**-*N*-(3-(5-(2-acrilamidopropoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida



30

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxi-etilamina por (*S*)-2-(Boc-amino(-1-propanol en la etapa 1.

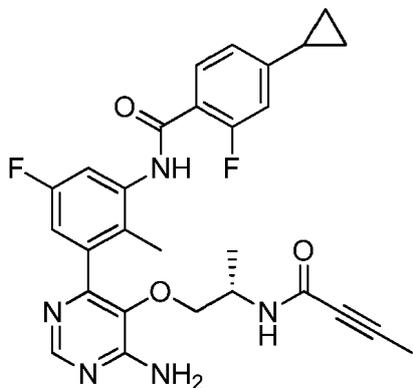
UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 508,2, *rt* = 0,95 min.:

35

## Ejemplo 18

**(S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(but-2-inamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

5



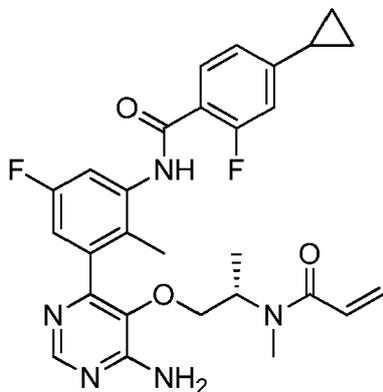
El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por (*S*)-2-(Boc-amino(-1-propanol en la etapa 1 y reemplazando ácido acrílico por ácido 2-butinoico en la etapa 4.

10

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  520,2,  $t_r = 0,97$  min.:

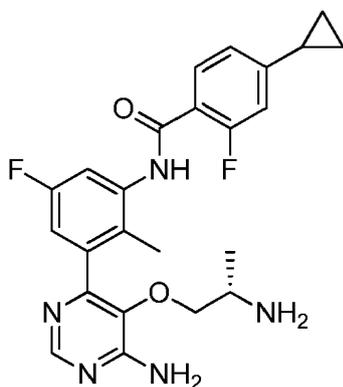
## Ejemplo 19

15

**(S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-metilacrilamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

20

(1) (*S*)-N-(3-(6-amino-5-(2-aminopropoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 18**



25

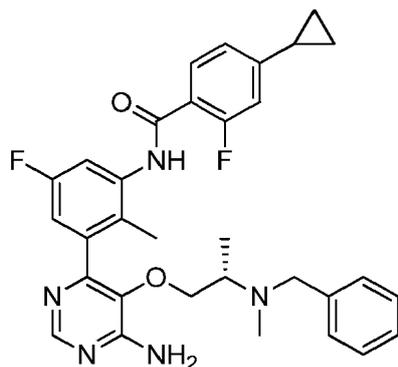
**INT 18** se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo a la **INT 10** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxiethylamina por (*S*)-2-(Boc-amino)-1-propanol en la etapa 1, y reemplazando TFA por HCl en la etapa 3 para proporcionar **INT 18** en forma de la sal hidrocloreto.

5

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  454,3,  $rt = 0,73$  min.:

(2) (*S*)-*N*-(3-(6-amino-5-(2-(bencil(metil)amino)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 19**

10



A una solución de **INT 18** (que contiene 2 eq de HCl, 590 mg, 1,12 mmol) en MeOH (30 mL) se añadió DIPEA (0,489 mL, 2,80 mmol), seguido de ácido acético (0,321 mL, 5,60 mmol). Luego se añadió una solución de benzaldehído (131 mg, 1,23 mmol) en MeOH (3 mL). La mezcla se agitó a TA durante 1 h y luego se añadió cianoborohidruro de sodio (77 mg, 1,23 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. Se añadió más cianoborohidruro de sodio (35 mg, 0,561 mmol) y la mezcla se agitó durante una hora adicional. Se añadió formaldehído (al 37% en agua, 1,00 mL, 13,45 mmol) y se continuó agitando durante otra hora. La mezcla se diluyó con DCM y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DCM/EtOAc, 0-100%) para proporcionar **INT 19** en forma de un sólido blanco.

15

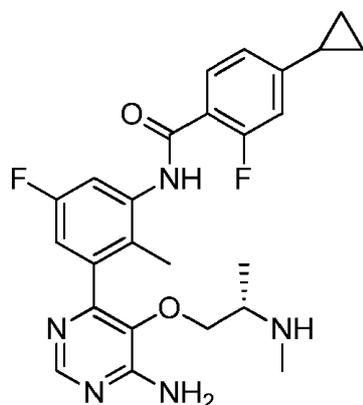
20

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  558,4,  $rt = 0,90$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 9,79 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,63 (t, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,34-7,14 (m, 7H), 7,12-6,95 (m, 3H), 3,65-3,56 (m, 1H), 3,48 (d, 1H), 3,39 (d, 1H), 3,34-3,27 (m, 2H), 2,99-2,86 (m, 1H), 2,03-1,99 (m, 4H), 1,94 (s, 3H), 1,11-0,99 (m, 2H), 0,83-0,70 (m, 2H).

25

(3) (*S*)-*N*-(3-(6-amino-5-(2-(metilamino)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 20**

30



A una solución de **INT 19** (470 mg, 0,843 mmol) en MeOH (9 mL) se añadió Pd al 10%-C (47 mg). La mezcla de reacción se hidrogenó a TA y presión normal durante 18 h. Se añadió más Pd al 10%-C (47 mg) y la mezcla de reacción se hidrogenó a TA y presión normal durante la noche. La mezcla se diluyó con DCM y se filtró sobre una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró y el residuo se secó en vacío para proporcionar **INT 20** bruto en forma de un sólido

35

de color pardo grisáceo.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  468,4,  $rt = 0,76$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 9,84 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,58-7,49 (m, 1H), 7,28 (s, a, 1H), 7,09-7,00 (m, 3H), 3,34-3,25 (m, 3H), 3,17 (s, a, 1H), 2,17-1,98 (m, 7H), 1,67 (s, a, 1H), 1,08-1,01 (m, 2H), 0,81-0,77 (m, 2H).

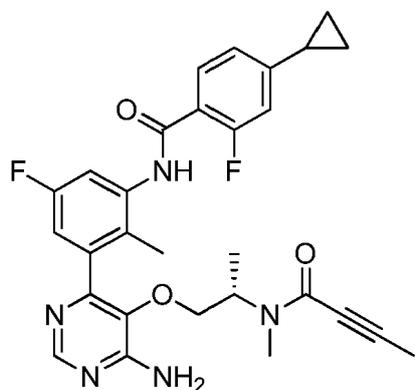
(4) (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilacrilamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 4 del **Ejemplo 6** reemplazando **INT 10** por **INT 20**.

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  522,3,  $rt = 0,99$  min.:

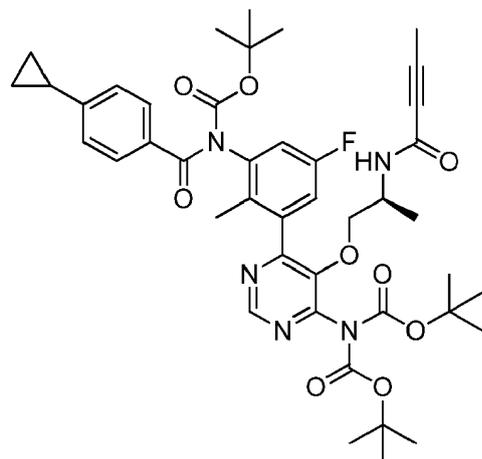
Ejemplo 20

(S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-inamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida



(1) (5-(2-(but-2-inamido)propoxi)-6-(3-(N-(*tert.*-butoxicarbonil)-4-ciclopropilbenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidin-4-il)(*tert.*-butoxicarbonil)carbamato de (S)-*tert.*-butilo, **INT 21**

25

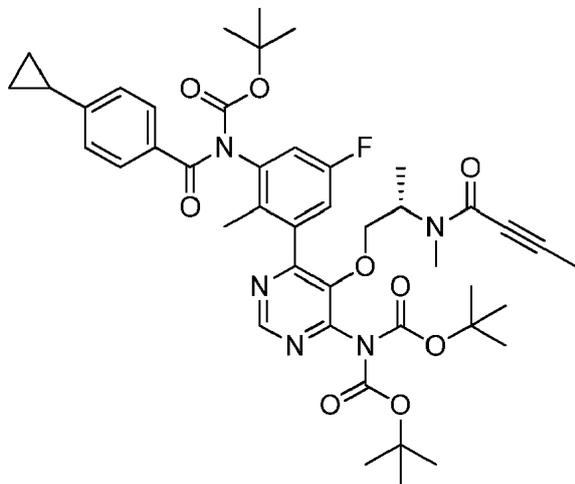


A una solución de **Ejemplo 18** (152 mg, 0,29 mmol) en THF (10 mL) se añadió DIPEA (0,200 mL, 1,15 mmol) seguido de dicarbonato de di-*tert.*-butilo (233 mg, 1,07 mmol) y 4 -(dimetilamino)piridina (4 mg, 0,033 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. Se añadió más dicarbonato de di-*tert.*-butilo (100 mg, 0,46 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1,5 h. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 0-100%) para proporcionar **INT 21** en forma de un residuo amarillo.

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  820,4,  $rt = 1,48$  min.:

(2) (6-(3-(*N*-(*tert*-butoxicarbonil)-4-ciclopropil-benzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)-5-(2-(*N*-metilbut-2-inamido)propoxi)pirimidin-4-il)carbamato de (*S*)-*tert*-butil *tert*-butoxicarbonilo, **INT 22**

5



A una solución de **INT 21** (257 mg, 0,31 mmol) y yodometano (0,040 mL, 0,64 mmol) en DMF (5,0 mL) a 0 °C se añadió NaH (al 60% en aceite mineral, 26 mg, 0,65 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h mientras se dejaba calentar a TA. La mezcla se vertió en HCl acuoso (0,5 M) y se extrajo con EtOAc (2 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 0-100%) para proporcionar **INT 22**.

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  834,5,  $r_t = 1,49$  min.:

(3) (*S*)-*N*-(3-(6-amino-5-(2-(*N*-metilbut-2-inamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

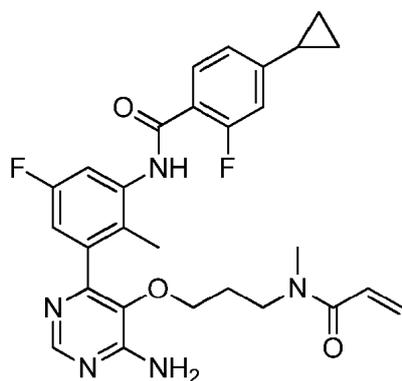
A una solución de **INT 22** (117 mg, 0,14 mmol) en DCM (5,0 mL) se añadió TFA (0,200 mL, 2,60 mmol), seguido de una gota de agua. La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla se concentró. El residuo se recogió en EtOAc y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio. La capa acuosa se volvió a extraer con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de EtOAc/MeOH, 0-15%), seguido de purificación por SFC para proporcionar **Ejemplo 20**.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  534,3,  $r_t = 1,02$  min.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) rotámetros 8,65-8,54 (m, 1H), 8,38 y 8,33 (s, total 1H), 8,19-8,05 (m, 2H), 7,07-6,95 (m, 2H), 6,90-6,82 (m, 1H), 5,76 y 5,23 (s, total 2H), 4,99-4,92 y 4,76-4,68 (m, total 1H), 3,54-3,45 (m, 1H), 3,43-3,37 y 3,28-3,21 (m, total 1H), 2,91 y 2,65 (s, total 3H), 2,16 (s, 3H), 2,03-1,92 (solapamiento s y m, total 4H), 1,15-1,08 (m, 2H), 1,01 y 0,95 (d, total 3H), 0,83-0,77 (m, 2H).

Ejemplo 21

35

***N*-(3-(6-amino-5-(3-(*N*-metilacrilamido)propoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

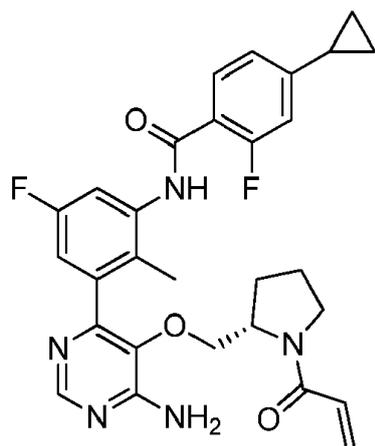


El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por *N*-Boc-*N*-metil-3-hidroxiopropilamina en la etapa 1.

5 UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 522,4, rt = 0,95 min.:

Ejemplo 22

10 **(S)-N-(3-(5-((1-acriloylpirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



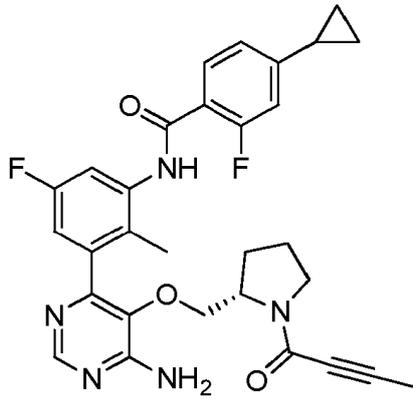
15 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por (*S*)-*N*-Boc-2-(hidroximetil)pirrolidina en la etapa 1.

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 534,3, rt = 1,00 min.:

20 Ejemplo 23

**(S)-N-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-inoil)pirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

25



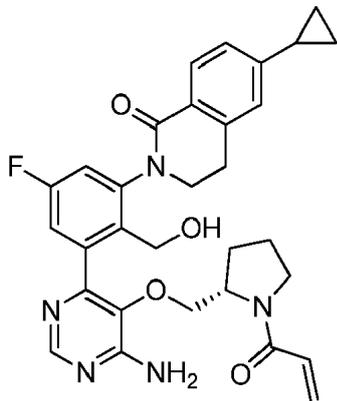
5 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por (*S*)-*N*-Boc-2-(hidroximetil)pirrolidina en la etapa 1 y reemplazando ácido acrílico por ácido 2-butinoico en la etapa 4.

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 546,3, rt = 1,02 min.:

Ejemplo 24

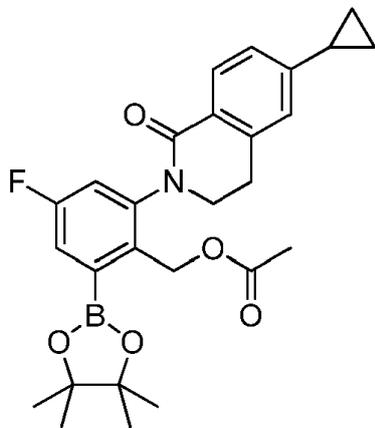
10

**(S)-2-(3-(5-((1-acriloilpirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona**



15

(1) Acetato de 2-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-4-fluoro-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)bencilo, **INT 23**



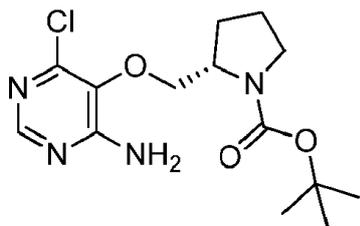
20

**INT 23** se preparó siguiendo un procedimiento análogo a **INT 2**, reemplazando 1-bromo-5-fluoro-2-metil-3-nitrobenzoceno por éster 2-bromo-6-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolin-2-il)-bencílico del ácido acético (documento WO2010/000633).

5 UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  480,4,  $r_t = 1,36$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7,76 (s, 1H), 7,49-7,46 (m, 1H), 7,38-7,35 (m, 1H), 7,10 (d, 1H), 7,06 (s, 1H), 5,24 (d, 1H), 4,93 (d, 1H), 4,07-3,98 (m, 1H), 3,65-3,58 (m, 1H), 3,15-2,99 (m, 2H), 2,04-1,96 (m, 1H), 1,91 (s, 3H), 1,31 (s, 12H), 1,05-1,00 (m, 2H), 0,80-0,75 (m, 2H).

(2) 2-(((4-amino-6-cloropirimidin-5-il)oxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato de (*S*)-*terc.*-butilo, **INT 24**

10



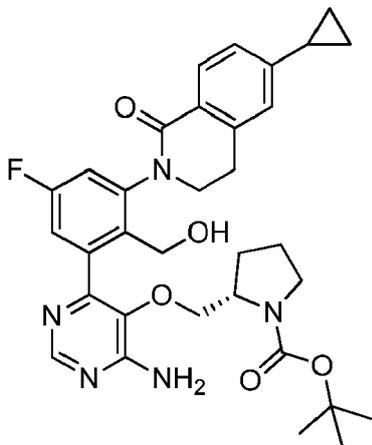
**INT 24** se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 1 del **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por (*S*)-*N*-Boc-2-(hidroximetil)pirrolidina.

15

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  329,2,  $r_t = 0,97$  min.:

(3) 2-(((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)pirimidin-5-il)oxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato de (*S*)-*terc.*-butilo, **INT 25**

20



A una solución de **INT 24** (contenido 66%, 200 mg, 0,40 mmol) en DME (3,0 mL) y agua (0,43 mL) se añadió **INT 23** (212 mg, 0,44 mmol) seguido de una solución acuosa de carbonato de sodio (1 M, 1,20 mL, 1,20 mmol). La mezcla se desgasificó con argón durante 10 min y luego se añadió dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (14 mg, 0,020 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 6 h. Después de enfriar a TA, se añadió una solución acuosa de NaOH (2 M, 2,0 mL, 4,00 mmol) y la mezcla se agitó a TA durante 20 min. La mezcla se diluyó con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DCM/EtOAc, 0-100%) para proporcionar **INT 25** en forma de un sólido beige.

25

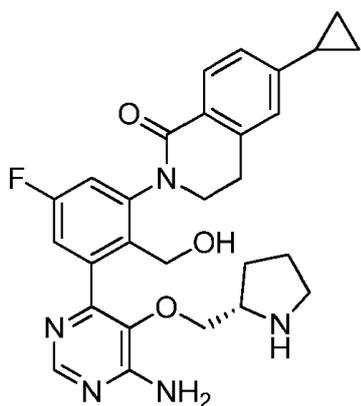
30

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  604,5,  $r_t = 1,20$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 8,21 (s, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,21 (d, 1H), 7,11 (d, 1H), 7,07 (s, 1H), 7,04-6,87 (s, a, 2H), 4,86-4,66 (m, 1H), 4,31 (m, 2H), 4,03-3,93 (m, 1H), 3,81-3,70 (m, 2H), 3,64-3,53 (m, 2H), 3,35-3,00 (m, 4H), 2,03-1,97 (m, 1H), 1,64-1,44 (m, 4H), 1,40-1,24 (m, 9H), 1,06-1,01 (m, 2H), 0,79-0,76 (m, 2H).

35

(4) (*S*)-2-(3-(6-amino-5-(pirrolidin-2-ilmetoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2*H*)-ona, **INT 26**

40



5 **INT 26** se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 3 del **Ejemplo 6** reemplazando **INT 9** por **INT 25**.

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  504,4,  $rt = 0,75$  min.:

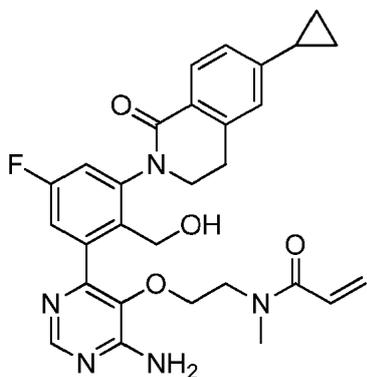
10 (5) (S)-2-(3-(5-((1-acriloilpirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 4 del **Ejemplo 6** reemplazando **INT 10** por **INT 26**.

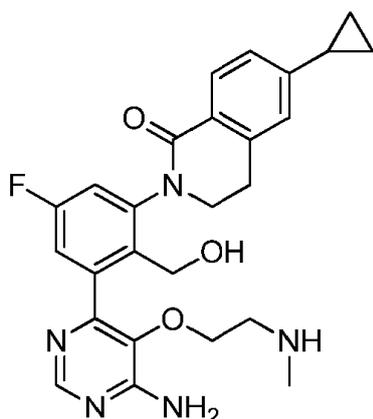
15 UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  558,4,  $rt = 0,98$  min.:

Ejemplo 25

20 **N**-(2-((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-N-metilacrilamida



25 (1) 2-(3-(6-amino-5-(2-(metilamino)etoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)-fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona, **INT 27**



5 **INT 27** se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo a **INT 26** reemplazando **INT 24** por **INT 8** en la etapa 3, purificando la sal de TFA sobre un cartucho SPE (resina PL-HCO<sub>3</sub> MP) para proporcionar **INT 27** en forma de la amina libre en la etapa 4.

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 478,3, rt = 0,62 min.:

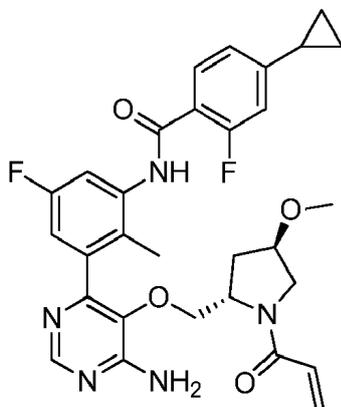
10 (2) *N*-(2-((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidroisoquinolin-2(1*H*)-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)pirimidin-5-il)oxi)etil)-*N*-metilacrilamida

15 A una solución de **INT 27** (amina libre, 130 mg, 0,272 mmol) y DIPEA (0,238 ml, 1,361 mmol) en DCM (9,0 mL) a -20 °C se añadió una solución de cloruro de acrililo (24,64 mg, 0,272 mmol) en DCM (0,6 mL). La mezcla de reacción se agitó a -20 °C durante 10 min. La mezcla se diluyó con DCM y se vertió en salmuera. La capa acuosa se volvió a extraer con DCM. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. El filtrado se cargó directamente en un cartucho de sílice y se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de heptano/acetona, 0-80%) para proporcionar un sólido blanco. El residuo se trituró en acetonitrilo, se separó por filtración y se lavó con acetonitrilo. El sólido se secó al vacío para proporcionar el **Ejemplo 25** en forma de un sólido de blanco.

25 UPLC-MS: MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 530,5, rt = 0,89 min. 1H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) rotámeros 8,23-8,16 (m, 1H), 7,83-7,77 (m, 1H), 7,43-7,32 (m, 1H), 7,20-7,04 (m, 5H), 6,70-6,60 (m, 1H), 6,11-6,00 (m, 1H), 5,69-5,53 (m, 1H), 4,77-4,61 (m, 1H), 4,37-4,24 (m, 2H), 4,05-3,93 (m, 1H), 3,83-3,73 (m, 1H), 3,68-3,55 (m, 2H), 3,54-3,44 (m, 1H), 3,27-3,15 (m, 2H), 3,09-2,99 (m, 1H), 2,89-2,55 (m, 3H), 2,05-1,95 (m, 1H), 1,08-0,99 (m, 2H), 0,81-0,74 (m, 2H).

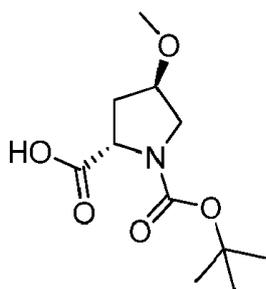
Ejemplo 26

30 ***N*-(3-(5-(((2*S*,4*R*)-1-acriloil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



(1) Ácido (2*S*,4*R*)-*N*-Boc-4-metoxipirrolidina-2-carboxílico, **INT 28**

35

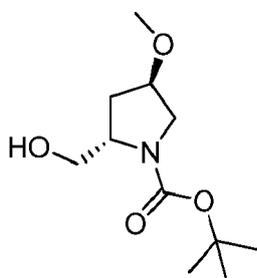


**INT 28** se preparó siguiendo un procedimiento análogo al documento WO2002/102790.

5 MS (ESI):  $[M-H]^-$  244,2.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) rotámetros 4,05-3,97 (m, 1H), 3,95-3,87 (m, 1H), 3,45-3,30 (m, 2H), 3,20 (s, 3H), 2,25-2,11 (m, 1H), 1,99-1,91 (m, 1H), 1,39 y 1,33 (s, total 9H).

(2) (2S,4R)-N-Boc-2-(hidroximetil)-4-metoxipirrolidina, **INT 29**

10



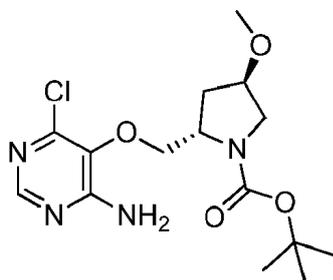
A una solución de **INT 28** (5,00 g, 20,39 mmol) en THF (100 mL) a 0 °C se añadió gota a gota una solución de complejo de borano y tetrahidrofurano (1 M en THF, 30,6 mL, 30,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 6 h. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota agua (80 mL). La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 1 h y luego se diluyó con EtOAc. La capa orgánica se lavó con una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se secó al vacío para proporcionar **INT 29** bruto en forma de un líquido incoloro.

15

20 MS (ESI):  $[M+H-tBu]^+$  176,1.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 4,69 (t, 1H), 3,94-3,88 (m, 1H), 3,73 (s, v a, 1H), 3,48-3,36 (m, 3H), 3,31-3,22 (m, 1H), 3,20 (s, 3H), 2,08-1,87 (m, 2H), 1,40 (s, 9H).

(3) 2-(((4-amino-6-cloropirimidin-5-il)oxi)metil)-4-metoxipirrolidina-1-carboxilato de (2S,4R)-terc.-butilo, **INT 30**

25



**INT 30** se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 1 del **Ejemplo 6** reemplazando N-Boc-N-metil-2-hidroxiethylamina por **INT 29**.

30

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  359,3,  $rt = 0,91$  min.:

(4) N-(3-(5-(((2S,4R)-1-acriloil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

35

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando **INT 8** por **INT 30** en la etapa 2.

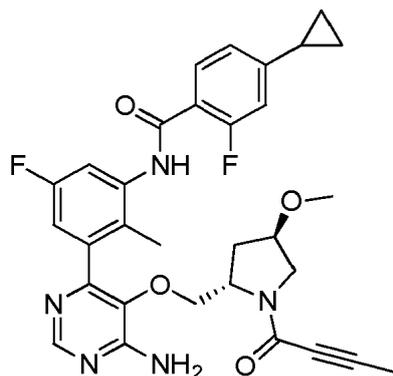
UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  564,4,  $rt = 0,98$  min.:

5

Ejemplo 27

***N***-**(3-(6-amino-5-(((2*S*,4*R*)-1-(but-2-inoil)-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

10



El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por **INT 29** en la etapa 1 y reemplazando ácido acrílico por ácido 2-butinoico en la etapa 4.

15

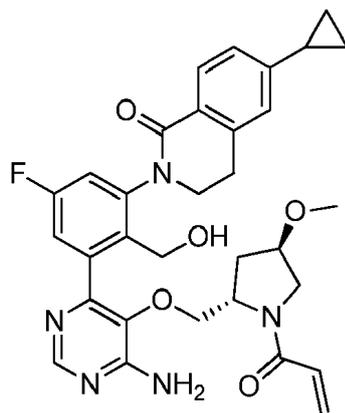
UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  576,4,  $rt = 1,01$  min.:

20

Ejemplo 28

**2-(3-(5-(((2*S*,4*R*)-1-acriolil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2*H*)-ona**

25



El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 24** reemplazando **INT 24** por **INT 30** en la etapa 3.

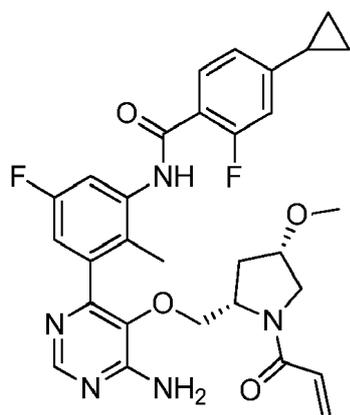
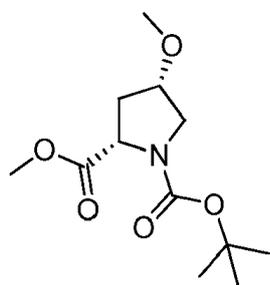
30

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  588,5,  $rt = 0,95$  min.:

Ejemplo 29

***N***-**(3-(5-(((2*S*,4*S*)-1-acriolil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

35

(1) *N*-Boc-4-metoxipirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*S*)-metilo **INT 31**

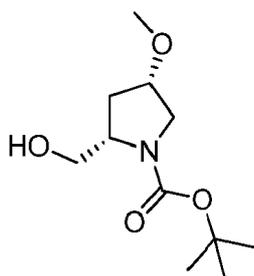
5

A una solución de *N*-Boc-4-hidroxipirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*S*)-metilo (3,00 g, 12,23 mmol) en acetonitrilo (60 mL) se añadió óxido de plata (2,83 g, 12,23 mmol) seguido de yodometano (15,0 mL, 240,95 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 85 °C durante 4 h. Se añadió más yodometano (5,0 mL, 80,32 mmol) y la mezcla se agitó a 85 °C durante 5 h adicionales. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se diluyó con dietil éter y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio. La capa acuosa se volvió a extraer con dietil éter. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron para proporcionar **INT 31** bruto en forma de un aceite amarillo pálido.

MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 260,3. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) rotámeros 4,30-4,23 (m, 1H), 3,95-3,91 (m, 1H), 3,64 y 3,61 (s, total 3H), 3,55-3,50 (m, 1H), 3,27-3,21 (m, 1H), 3,17 y 3,16 (s, total 3H), 2,42-2,28 (m, 1H), 2,06-1,97 (m, 1H), 1,41 y 1,34 (s, total 9H).

(2) (2*S*,4*S*)-*N*-Boc-2-(hidroximetil)-4-metoxipirrolidina, **INT 32**

20



A una solución de **INT 31** (3,10 g, 11,96 mmol) en THF (120 mL) a 0 °C se añadió una solución de borohidruro de litio (2 M en THF, 11,96 mL, 23,91 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla se enfrió a 0 °C y se vertió en agua helada. La mezcla se agitó durante 15 min a TA y luego se extrajo con dietil éter. La capa acuosa se volvió a extraer con dietil éter. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron para proporcionar **INT 32** bruto en forma de un aceite incoloro.

MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 232,3. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 4,64 (t, 1H), 3,87 (s, 1H), 3,68-3,44 (m, 3H), 3,32-3,26 (m, 1H), 3,21 (s, 3H), 3,18-3,15 (m, 1H), 2,04-1,97 (m, 1H), 1,42-1,34 (m, 1H), 1,40 (s, 9H).

30

(3) *N*-(3-(5-(((2*S*,4*S*)-1-acriloil-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

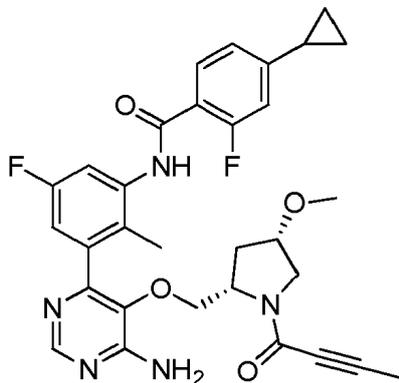
5 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por **INT 32** en la etapa 1.

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 564,4, rt = 0,99 min.:

10 Ejemplo 30

***N*-(3-(6-amino-5-(((2*S*,4*S*)-1-(but-2-inoil)-4-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

15



20 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por **INT 32** en la etapa 1 y reemplazando ácido acrílico por ácido 2-butinoico en la etapa 4.

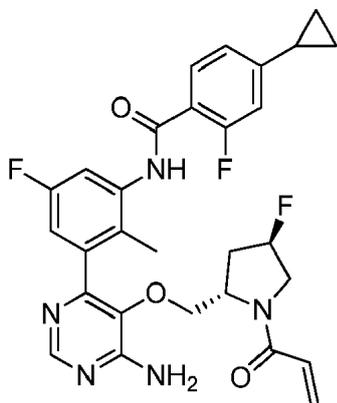
20

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 576,4, rt = 1,02 min.:

Ejemplo 31

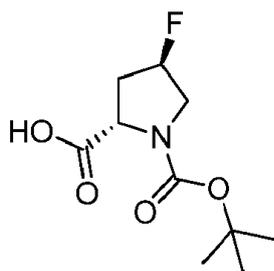
25

***N*-(3-(5-(((2*S*,4*R*)-1-acriloil-4-fluoropirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



30

(1) Ácido (2*S*,4*R*)-*N*-Boc-4-fluoropirrolidina-2-carboxílico, **INT 33**



Una solución de *N*-Boc-4-hidroxi-pirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*R*)-metilo (250 g, 1,02 mol), trifetilfosfina (401 g, 1,53 mmol) y ácido benzoico (187 g, 1,53 mol) en THF (3,50 L) se enfrió para alcanzar una temperatura interna de -4 °C, luego se añadió una solución de azodicarboxilato de dietilo (40% en tolueno, 625 mL, 1,43 mmol) en THF (1,50 L) en el espacio de 1 h. La mezcla de reacción se calentó a TA y se agitó a TA durante la noche. La mezcla se concentró. El residuo se recogió en dietil éter (2,5 L) y la mezcla se calentó a reflujo durante 1 h. La suspensión se enfrió a 0 °C, el sólido blanco se separó por filtración y se lavó con etanol frío. El filtrado se concentró. El residuo se disolvió en una mezcla 4:1 de hexano/EtOAc caliente (1,5 L) y se agitó a TA durante 1 h. La mezcla se enfrió a 10 °C y se trató con hexano (250 mL). La mezcla se agitó a TA durante 30 min y se formó un precipitado. El sólido se separó por filtración y se lavó con hexano frío (150 mL). El filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; hexano/EtOAc 4:1) para proporcionar *N*-Boc-4-(benzoiloxi)pirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*S*)-2-metilo en forma de un sólido blanco.

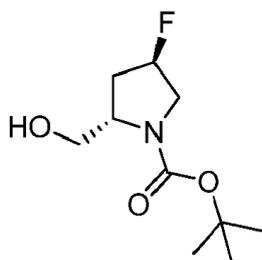
A una solución de *N*-Boc-4-(benzoiloxi)pirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*S*)-2-metilo (248 g, 0,71 mol) en MeOH (4,5 L) se añadió carbonato de sodio (98 g, 0,92 mol) seguido de más MeOH (0,5 L). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 h. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta un volumen de aproximadamente 1 L. La solución se diluyó con EtOAc (5,0 L), se enfrió a 5°C y se lavó con agua. La capa acuosa se volvió a extraer con EtOAc (2 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y una mezcla 1:1 de salmuera y agua, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El residuo se cristalizó en DCM/hexano para proporcionar *N*-Boc-4--pirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*S*)-2-metilo en forma de un sólido blanco.

A una solución de *N*-Boc-4--pirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*S*)-2-metilo (270 g, 1,10 mol) en DCM (2,6 L) a -80 °C se añadió gota a gota trifluoruro de (dietilamino) azufre (567 mL, 4,29 mol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla se enfrió a -78 °C y después se añadió a una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio enfriada a -10 °C. Durante la adición, la temperatura interna se mantuvo por debajo de 5 °C. Después, la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. Las capas se separaron y la capa acuosa se volvió a extraer con DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; hexano/EtOAc, 10-40%) para proporcionar *N*-Boc-4-fluoro-pirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*R*)-2-metilo en forma de un aceite amarillo.

A una solución de *N*-Boc-4-fluoro-pirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*R*)-2-metilo (13,0 g, 52,58 mmol) en dioxano (270 mL) a 15 °C se añadió gota a gota una solución de hidróxido de sodio (4,2 g, 105,00 mmol) en agua (30 mL). La mezcla se enfrió a 7 °C y la suspensión se agitó a 7 °C durante la noche. Se añadió ácido acético (80 mL) y la mezcla se diluyó con DCM. Las capas se separaron y la capa acuosa se volvió a extraer con DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El residuo se cristalizó en dietil éter/hexano para proporcionar **INT 33** en forma de un sólido blanco.

MS (ESI): [M-H]<sup>-</sup> 232,2. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) rotámeros 12,72 (s, a, 1H), 5,40-5,21 (m, 1H), 4,22-4,13 (m, 1H), 3,72-3,58 (m, 1H), 3,58-3,36 (m, 1H), 2,60-2,44 (m, 1H, solapamiento con pico de disolvente), 2,19-1,97 (m, 1H), 1,41 y 1,36 (s, total 9 H).

(2) (2*S*,4*R*)-*N*-Boc-2-(hidroximetil)-4-fluoropirrolidina, **INT 34**



A una solución de **INT 33** (5,00 g, 21,44 mmol) en THF (105 mL) a 0 °C se añadió una solución de complejo de borano y tetrahidrofurano (1 M en THF, 32,2 mL, 32,20 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota agua (100 mL). La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 1 h y luego se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con solución acuosa de ácido cítrico al 10%, solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró para proporcionar **INT 34** bruto en forma de un aceite amarillo.

MS (ESI): [M+H-tBu]<sup>+</sup> 164,2. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 5,23 (d, 1H), 4,74 (t, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,74-3,62 (m, 1H), 3,57-3,44 (m, 2H), 3,41-3,23 (m, 1H), 2,22-2,05 (m, 2H), 1,41 (s, 9H).

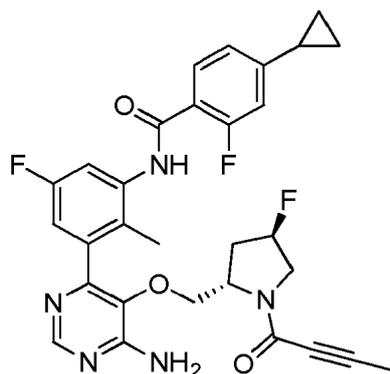
(3) *N*-(3-(5-(((2*S*,4*R*)-1-acriloil-4-fluoropirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por **INT 34** en la etapa 1.

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 552,5, rt = 1,00 min.:

Ejemplo 32

***N*-(3-(6-amino-5-(((2*S*,4*R*)-1-(but-2-inoil)-4-fluoropirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

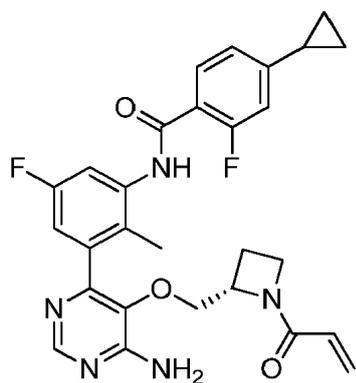


El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-2-hidroxietilamina por **INT 34** en la etapa 1 y reemplazando ácido acrílico por ácido 2-butinoico en la etapa 4.

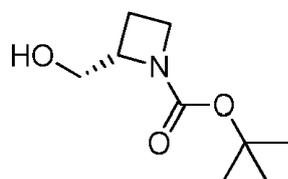
UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 564,5, rt = 1,03 min.:

Ejemplo 33

***S*-(3-(5-(((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



(1) (S)-N-Boc-2-(hidroximetil)azetidina, INT 35



5

INT 35 se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 2 del **Ejemplo 26** reemplazando INT 28 por ácido (S)-N-Boc-azetidina-2-carboxílico

10 MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 188,1.

(2) (S)-N-(3-(5-((1-acriolilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

15

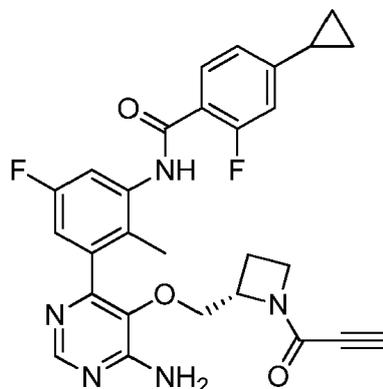
El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando N-Boc-N-metil-2-hidroxietilamina por INT 35 en la etapa 1.

20 UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 520,2, rt = 0,96 min.:

Ejemplo 34

(S)-N-(3-(6-amino-5-((1-propiolilazetidín-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

25

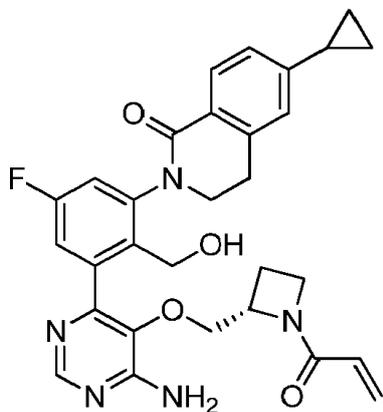


30 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando N-Boc-N-metil-2-hidroxietilamina por INT 35 en la etapa 1 y reemplazando ácido acrílico por ácido propiólico en la etapa 4.

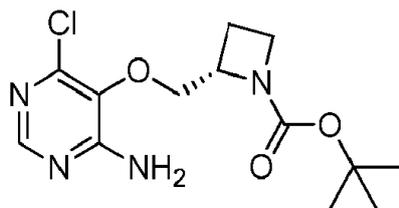
UPLC-MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 518,3, rt = 0,96 min.

Ejemplo 35

5 **(S)-2-(3-(5-((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona**



10 (1) 2-(((4-amino-6-cloropirimidin-5-il)oxi)metil)azetidina-1-carboxilato de (S)-terc.-butilo, INT 36



15 INT 36 se preparó de acuerdo con el Esquema 2 siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 1 del Ejemplo 6 reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-hidroxietilamina por INT 35.

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 315,1, rt = 0,91 min.:

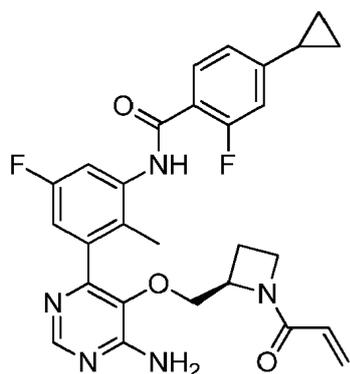
20 (2) **(S)-2-(3-(5-((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona**

25 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el Esquema 2 siguiendo un procedimiento análogo al Ejemplo 24 reemplazando INT 24 por INT 36 en la etapa 3.

UPLC-MS MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 544,4, rt = 0,94 min.:

Ejemplo 36

30 **(R)-N-(3-(5-((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 33** reemplazando el ácido (*S*)-*N*-Boc-azetidina-2-carboxílico por ácido (*R*)-*N*-Boc-azetidina-2-carboxílico en la etapa 1.

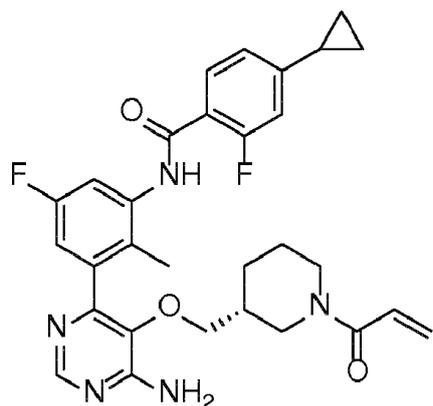
5

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  520,3,  $r_t = 0,99$  min.:

Ejemplo 37

10

**(*R*)-*N*-((3-(5-((1-acriloilpiperidin-3-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



15

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 2** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 6** reemplazando *N*-Boc-*N*-metil-hidroxi-etilamina por (*R*)-*N*-Boc-3-(hidroximetil)piperidina en la etapa 1.

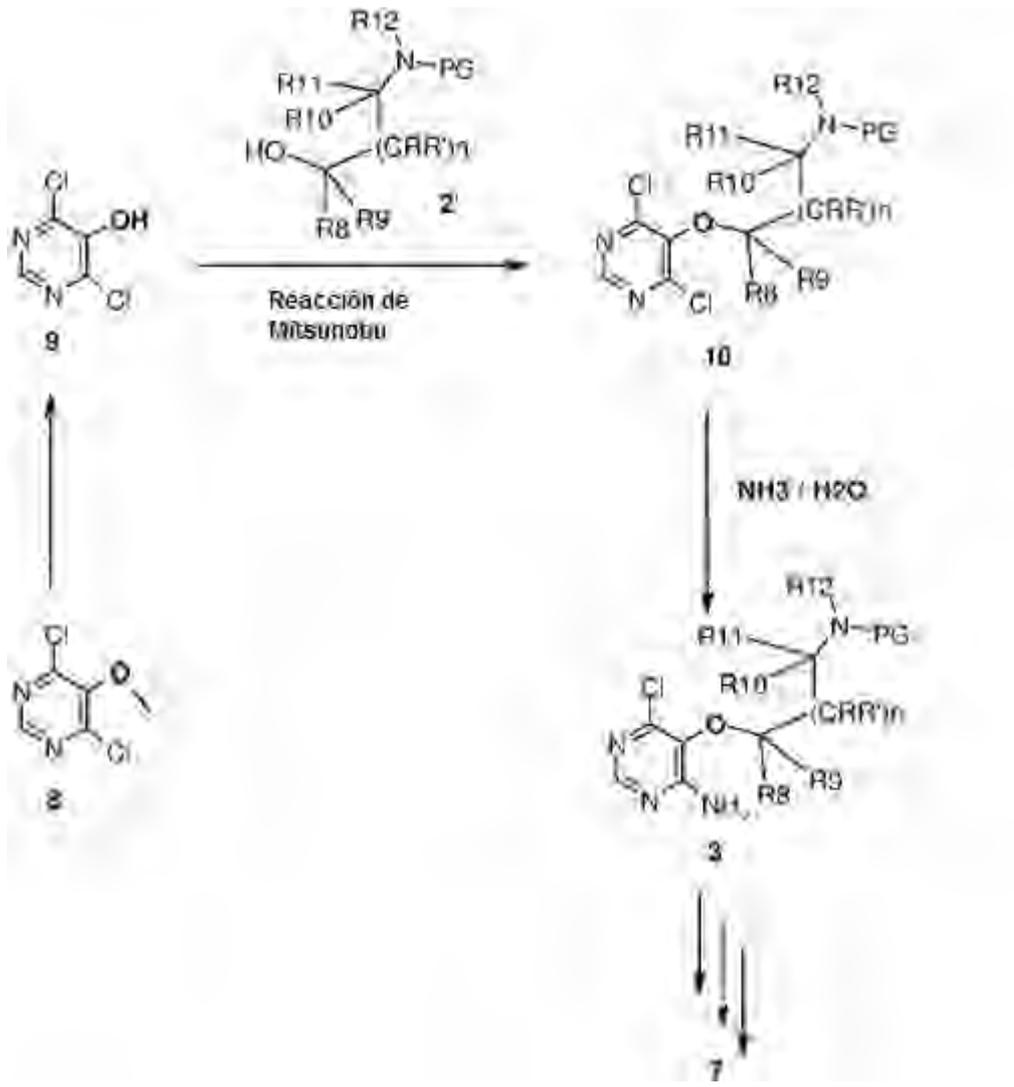
UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  548,5,  $r_t = 1,02$  min.:

20

Alternativamente, los agentes de la divulgación se pueden preparar mediante una secuencia de reacción que implica la desprotección, p. ej., con un ácido de Lewis de 4,6-dicloro-5-metoxipirimidina 8 para proporcionar 4,6-dicloro-5-hidroxioxi-pirimidina 9, seguido de una reacción de Mitsunobu del pirimidinol con un compuesto alcohólico 2' utilizando un azodicarboxilato apropiado, tal como DIAD, y Smopex-301 o trifenilfosfina para proporcionar el compuesto intermedio 10, seguido de una sustitución aromática nucleofílica, p. ej., con amoníaco en agua para proporcionar el compuesto intermedio de aminopirimidina 3. A continuación, el compuesto intermedio 3 se convierte en un compuesto final de la divulgación, es decir, un compuesto 7, mediante las secuencias de reacción descritas anteriormente del esquema 1 y/o esquema 2, es decir, un acoplamiento de Suzuki con un éster borónico utilizando un catalizador apropiado, tal como dicloruro de bis(trifenilfosfina), paladio(II), desprotección utilizando un ácido apropiado, tal como TFA o HCl, seguido de formación de amida, p. ej., de la sal de amonio o la amina libre con un ácido y utilizando un reactivo de acoplamiento apropiado, tal como T3P, y una base apropiada, tal como DIPEA, o con un cloruro de ácido utilizando una base apropiada, tal como DIPEA, tal como se muestra en el **Esquema 3** que figura a continuación:

35

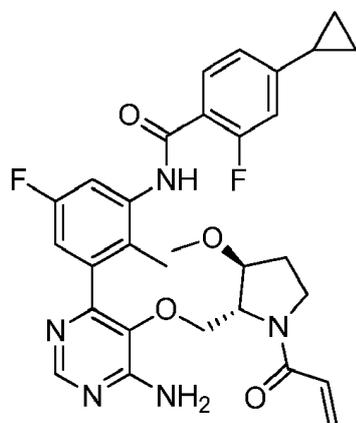
Esquema 3:



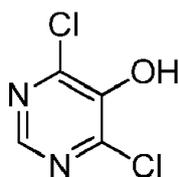
## Ejemplo 38

**N-(3-(5-(((2R,3S)-1-acriloil-3-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

5

(1) 4,6-dicloropirimidin-5-ol, **INT 37**

10

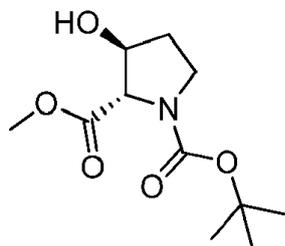


A una solución de 4,6-dicloro-5-metoxipirimidina (5,00 g, 27,93 mmol) en DCE (80 mL) a 0 °C se añadió cloruro de aluminio (5,48 g, 41,10 mmol) en una porción. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a 50 °C durante 6 h. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió lentamente una solución acuosa de HCl (1 M, 40 mL) seguida de MeOH (10 mL). La mezcla se agitó vigorosamente a TA durante 10 min, luego se diluyó con agua y se extrajo con una mezcla de DCM/MeOH (10:1, 2 x 100 mL) y EtOAc (1 x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para proporcionar **INT 37** bruto en forma de un sólido beige.

15

UPLC-MS: MS (ESI): [M-H]<sup>-</sup> 163,0, rt = 0,45 min. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 11,71 (s, a, 1H), 8,39 (s, 1H).

20

(2) *N*-Boc-3-hidroxipirrolidina-2-carboxilato de,(2*S*,3*S*)-metilo **INT 38**

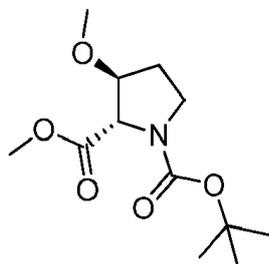
25

A una solución de ácido (2*S*,3*S*)-*N*-Boc-3-hidroxipirrolidina-2-carboxílico (4,10 g, 17,73 mmol) en DMF (100 mL) se añadió carbonato de potasio (4,00 g, 28,94 mmol) seguido de yodometano (1,3 mL, 20,79 mmol). La mezcla de reacción se calentó a TA y se agitó a TA durante 4 h y luego a 90 °C durante 1 h. Después de enfriar a TA, se añadió yodometano (0,70 mL, 11,19 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla se diluyó con salmuera y se extrajo con EtOAc (3 veces). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 0-50%) para proporcionar **INT 38** en forma de un aceite incoloro.

30

MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 246,2. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) rotámeros 4,42 (s, a, 1H), 4,29 y 4,18 (s, total 1H), 3,74 (s, 3H), 3,66-3,53 (m, 3H), 2,13-2,03 (m, 1H), 1,97-1,88 (m, 1H), 1,46 y 1,41 (s, total 9H).

35

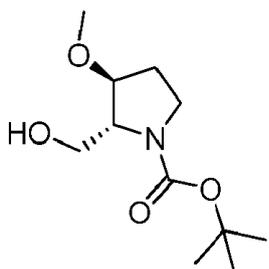
(3) *N*-Boc-3-metoxipirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,3*S*)-2 metilo **INT 39**

5

A una solución de **INT 38** (2,53 g, 10,33 mmol) en DMF (25,0 mL) se añadió yodometano (3,2 mL, 51,60 mmol), seguido de óxido de plata(I) (7,18 g, 31,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA a lo largo del fin de semana. La mezcla se diluyó con EtOAc y se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se lavó con salmuera, una solución acuosa de tiosulfato de sodio al 10% y una solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para proporcionar **INT 39** bruto en forma de un aceite incoloro.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) rotámeros 4,41 y 4,26 (s, total 1H), 3,94-3,87 (m, a, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,69-3,53 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 2,11-1,95 (m, 2H), 1,46 y 1,41 (s, total 9H).

15

(4) (2*R*,3*S*)-*N*-Boc-2-hidroximetil-3-metoxi-pirrolidina, **INT 40**

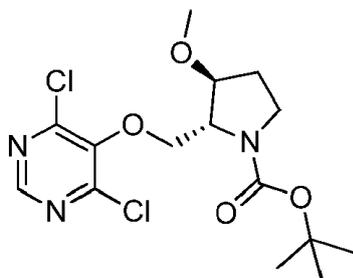
20

A una solución de **INT 39** (2,28 g, 8,81 mmol) en THF (25 mL) se añadió cloruro de litio (1,12 g, 26,40 mmol), seguido de borohidruro de sodio (1,00 g, 26,40 mmol). Se añadió EtOH (50 mL) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 4 h. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió lentamente agua. La mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. La capa acuosa se diluyó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y se volvió a extraer con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Los residuos combinados se purificaron mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 15-100%) para proporcionar **INT 40** en forma de un líquido incoloro.

25

MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 232,2. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) rotámeros 4,03-3,92 y 3,89-3,77 (m, a, total 2H), 3,72-3,55 (m, a, 2H), 3,52-3,30 (solapamiento m, 2H y s, 3H), 2,01-1,92 (m, a, 2H), 1,47 (s, 9H).

30

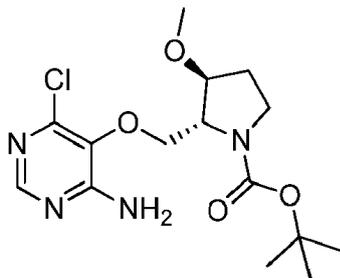
(5) 2-(((4,6-dicloropirimidin-5-il)oxi)metil)-3-metoxipirrolidina-1-carboxilato de (2*R*,3*S*)-*tert*-butilo, **INT 41**

35

A una solución de **INT 37** (105 mg, 0,64 mmol) e **INT 40** (221 mg, 0,96 mmol) en THF (12 mL) se añadió trifenilfosfina (250 mg, 0,96 mmol) seguido de la adición gota a gota de DIAD (0,186 mL, 0,96 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante la noche. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 0-40%) para proporcionar **INT 41** en forma de un residuo incoloro.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  322,1,  $t_r = 1,17$  min.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) rotámeros 8,57 y 8,54 (s, total 1H), 4,35-3,91 (m, 4H), 3,58-3,46 (m, 2H), 3,42 (s, 3H), 2,24-1,97 (m, 2H), 1,46 (s, 9H).

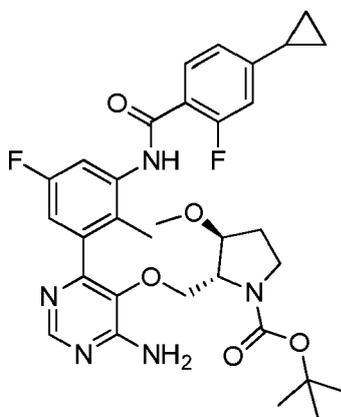
(6) 2-(((4-amino-6-cloropirimidin-5-il)oxi)metil)-3-metoxipirrolidina-1-carboxilato de (2*R*,3*S*)-*terc.*-butilo, **INT 42**



A una solución de **INT 41** (173 mg, 0,46 mmol) en 2-propanol (5,0 mL) se añadió una solución acuosa de hidróxido de amonio al 33% (2,7 mL, 22,63 mmol). La mezcla de reacción se agitó en un tubo sellado a 80 °C durante 5 h. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DMC/EtOAc, 0-50%) para proporcionar **INT 42** en forma de un aceite incoloro.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  359,2,  $t_r = 0,92$  min.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) rotámeros 8,08 (s, 1H), 6,22 y 5,78 (s, a, total 2H), 4,25-3,95 (m, a, 4H), 3,61-3,37 (m, 5H, incluyendo s, 3H, a  $\delta$  3,40), 2,18-1,95 (m, 2H), 1,46 (s, 9H).

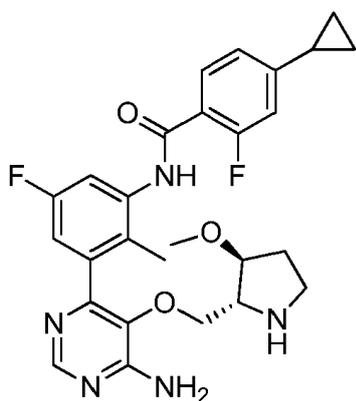
(7) *N*-(3-(5-(((2*R*,3*S*)-1-acriloil-3-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 43**



**INT 43** se preparó de acuerdo con el Esquema 3 siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 2 del **Ejemplo 6** reemplazando **INT 8** por **INT 42**.

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  610,5,  $t_r = 1,21$  min.:

(8) *N*-(3-(6-amino-5-(((2*R*,3*S*)-3-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 44**



5 **INT 44** se preparó de acuerdo con el **Esquema 3** siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 3 del **Ejemplo 6**, reemplazando **INT 9** por **INT 43** y purificando el producto bruto por cromatografía de resolución instantánea (sílice; DCM/MeOH con hidróxido de amonio acuoso al 2%) gradiente, 5-65%) para proporcionar **INT 44** en forma de la amina libre.

UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  510,3,  $rt = 0,77$  min.:

10 (9) *N*-(3-(5-(((2*R*,3*S*)-1-acriloil-3-metoxipirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

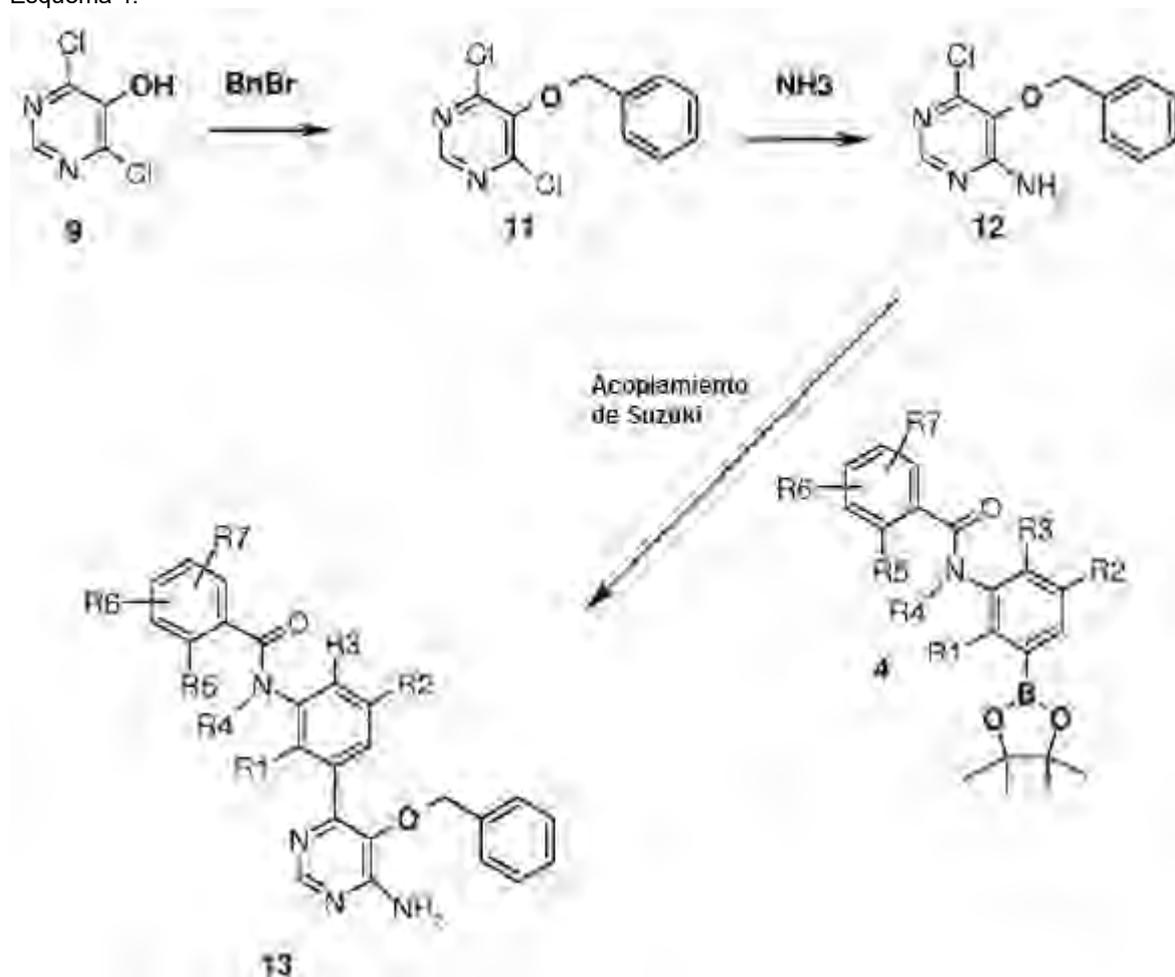
15 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 3** siguiendo un procedimiento análogo a la etapa 4 del **Ejemplo 6** reemplazando **INT 10** por **INT 44**.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  564,3,  $rt = 0,98$  min.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) rotámeros 8,60 y 8,55 (s, total 1H), 8,42 y 8,36 (s, total 1H), 8,20-8,13 (m, 1H), 8,13-8,04 (m, 1H), 7,07-7,01 (m, 1H), 6,96-6,83 (m, 2H), 6,47-6,32 (m, 2H), 5,79 (s, v a, 2H), 5,72-5,66 (m, 1H), 4,21-4,16 y 3,70-3,42 y 3,33-3,28 (m, total 6H), 3,26 y 3,20 (s, total 3H), 2,15 (s, 3H), 2,01-1,88 (m, 2H), 1,84-1,74 (m, 1H), 1,16-1,07 (m, 2H), 0,84-0,75 (m, 2H).

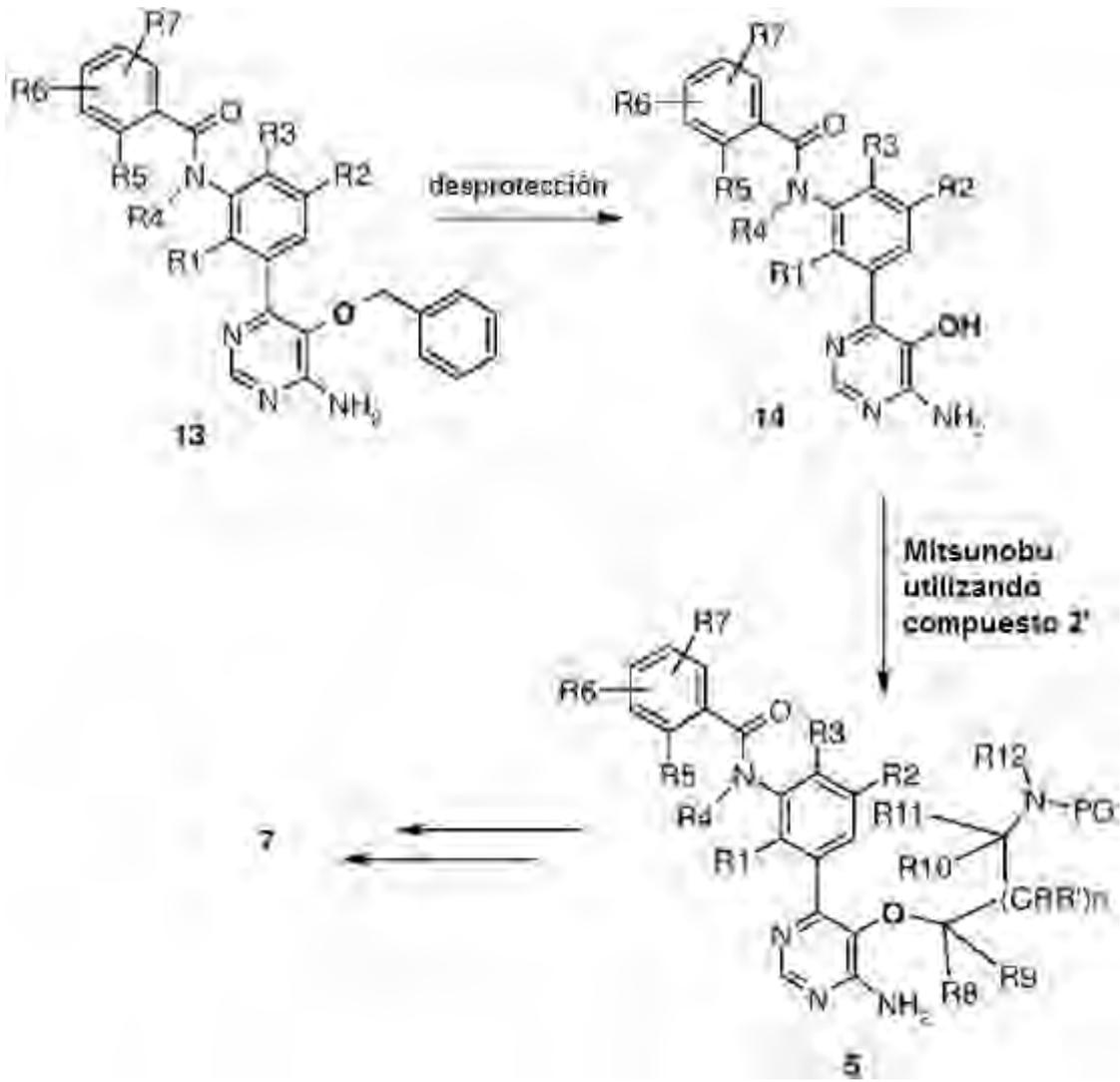
20

Alternativamente, los agentes de la divulgación se pueden preparar mediante una secuencia de reacción que implica la alquilación de 4,6-dicloro-5-hidroxi-pirimidina 9 con bromuro de bencilo utilizando una base apropiada, tal como carbonato de potasio, seguido de sustitución aromática nucleofílica con hidróxido de amonio para proporcionar la aminopirimidina 12, acoplamiento de Suzuki con un éster borónico 4 utilizando un catalizador apropiado, tal como dicloruro de bis(trifenilfosfina)-paladio(II) para proporcionar el compuesto intermedio 13 bencilado. Escisión del grupo bencilo, p. ej., por hidrogenación, seguido de una reacción de Mitsunobu del pirimidinol con un alcohol de fórmula 2' utilizando un azodicarboxilato apropiado, tal como DIAD, y Smopex-301 o trifenilfosfina, desprotección utilizando un ácido apropiado, tal como TFA o HCl, seguido de la formación de amida de la sal de amonio o la amina libre con un ácido utilizando un reactivo de acoplamiento apropiado, tal como T3P, y una base apropiada, tal como DIPEA, o con un cloruro de ácido utilizando una base apropiada, tal como DIPEA, para proporcionar un compuesto final de la divulgación, es decir, un compuesto de fórmula 7, tal como se muestra en el **Esquema 4** que figura a continuación:

Esquema 4:



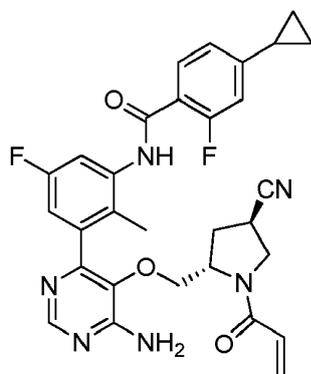
15



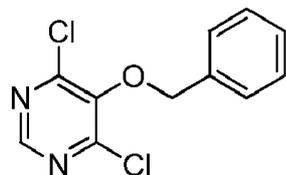
## Ejemplo 39

***N*-3-(5-(((2*S*,4*R*)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**

5

(1) 5-(benciloxi)-4,6-dicloropirimidina, **INT 45**

10



A una solución de **INT 37** (contenido 90%, 6,50 g, 35,50 mmol) en DMF (120 mL) se añadió bromuro de bencilo (8,42 mL, 70,90 mmol), seguido de carbonato de potasio (14,70 g, 106,36 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 1 h. La mezcla se concentró. El residuo se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 0-10%) para proporcionar **INT 45** en forma de un aceite incoloro.

15

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  255,1,  $rt = 1,15$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 8,72 (s, 1H), 7,57-7,50 (m, 2H), 7,48-7,37 (m, 3H), 5,19 (s, 2H).

20

(2) 5-(benciloxi)-6-cloropirimidin-4-amina, **INT 46**

25



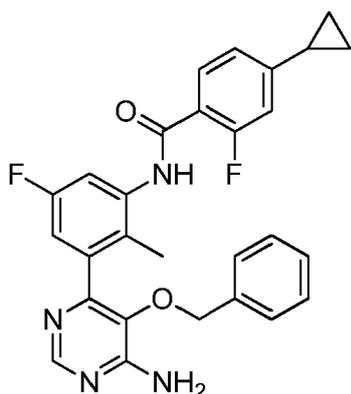
A una solución de **INT 45** (8,24 g, 32,30 mmol) en 2-propanol (100 mL) se añadió una solución acuosa de hidróxido de amonio al 26% (93 mL, 614 mmol) en un autoclave. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 12 h. La mezcla se concentró. El residuo se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró para proporcionar **INT 46** bruto en forma de un sólido blanco.

30

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  236,1,  $rt = 0,84$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7,98 (s, 1H), 7,58-7,51 (m, 2H), 7,43-7,32 (m, 3H), 7,25 (s, a, 2H), 4,95 (s, 2H).

35

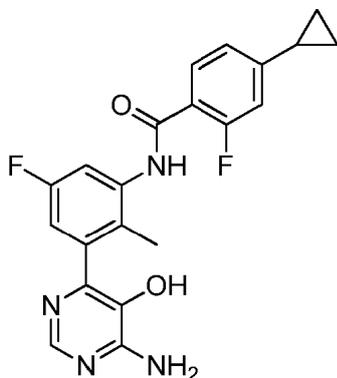
(3) *N*-(3-(6-amino-5-(benziloxy)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 47**



A una solución de **INT 46** (contenido 90%, 500 mg, 1,91 mmol) en DME (7,0 mL) y agua (1,0 mL) se añadió **INT 5** (947 mg, 2,29 mmol) seguido de una solución acuosa de carbonato de sodio (2 M, 2,86 mL, 5,73 mmol). La mezcla se desgasificó con argón durante 10 min y luego se añadió dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (67,0 mg, 0,095 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 120 °C durante 15 min en un reactor de microondas. La mezcla se repartió entre solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DCM/EtOAc, 0-100%) para proporcionar **INT 47** en forma de un sólido amarillo.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  487,4,  $r_t = 1,15$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 9,80 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,66 (t, 1H), 7,54 (d, 1H), 7,26-7,18 (m, 3H), 7,11-6,91 (m, 7H), 4,55 (s, 2H), 2,08-1,95 (solapamiento s y m, total 4H), 1,10-1,01 (m, 2H), 0,85-0,74 (m, 2H).

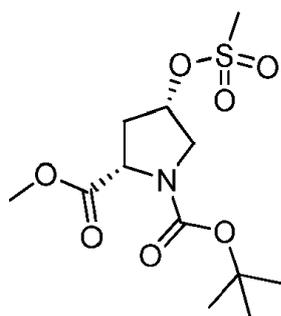
(4) *N*-(3-(6-amino-5-hidroxipirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 48**



A una solución de **INT 47** (1,16 g, 2,38 mmol) en THF (20 mL) se añadió Pd- C (116 mg). La mezcla de reacción se hidrogenó a TA y presión normal durante 48 h. La mezcla se diluyó con MeOH (10 mL) y se filtró sobre una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró. El residuo se suspendió en DCM (20 mL) y se añadió TFA (0,918 mL, 11,92 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 30 min y luego se vertió en una mezcla de solución acuosa saturada de hidrógeno-carbonato de sodio y EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró para proporcionar **INT 48** en forma de un sólido beige.

UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  397,2,  $r_t = 0,80$  min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 9,76 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,59-7,48 (m, 1H), 7,12-7,03 (m, 2H), 6,98-6,91 (m, 1H), 6,66 (s, a, 2H), 2,11-1,94 (solapamiento s y m, total 4H), 1,14-0,98 (m, 2H), 0,87-0,71 (m, 2H).

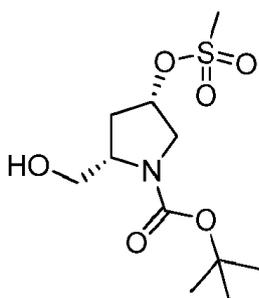
(5) *N*-Boc-4-((metilsulfonil)oxi)pirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*S*)-2-metilo, **INT 49**



5 A una solución de *N*-Boc-4-hidroxipirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*S*)-metilo (11,50 g, 46,88 mmol) en DCM (100 mL) se añadió DIPEA (9,70 mL, 55,54 mmol) seguido de cloruro de metanosulfonilo (4,30 mL, 55,18 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. Se añadieron más DIPEA (1,50 mL, 8,59 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (0,60 mL, 7,70 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a TA durante una hora adicional. La mezcla se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice, gradiente de DCM/EtOAc, 5-15%) seguido de una segunda purificación mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano / EtOAc, 0-100%) para proporcionar **INT 49** en forma de un aceite amarillo.

10 MS (ESI): [M+H]<sup>+</sup> 324,2. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) rotámeros 5,24 (m, a, 1H), 4,55-4,48 y 4,44-4,37 (m, total 1H), 3,84-3,70 (solapamiento s y m, total 5H), 3,02 (s, 3H), 2,58-2,47 (m, a, 2H), 1,48 y 1,43 (s, total 9 H).

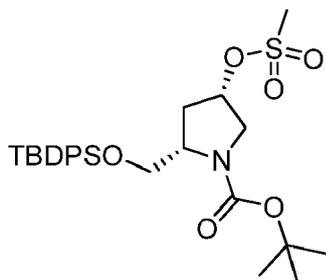
15 (6) (2*S*,4*S*)-*N*-Boc-2-(hidroximetil)-4-((metilsulfonil)oxi)pirrolidina, **INT 50**



20 A una solución de **INT 49** (12,52 g, 38,72 mmol) en THF (100 mL) a 0 °C se añadió gota a gota una solución de borohidruro de litio (2 M en THF, 67,6 mL, 135,00 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche y se dejó calentar a TA. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió lentamente agua. La mezcla se extrajo con EtOAc, la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. La capa acuosa se diluyó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y se volvió a extraer con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Los dos residuos se combinaron y purificaron mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente ciclohexano/EtOAc, 25-100%; seguido de gradiente EtOAc/MeOH, 0-10%) para proporcionar **INT 50** en forma de una resina incolora.

30 MS (ESI): [M+H-tBu]<sup>+</sup> 240,1. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) rotámeros 5,15-5,10 (m, a, 1H), 4,37-4,29 y 4,07-3,87 (m, total 2H), 3,81-3,62 (m, 2H), 3,59-3,47 (m, 2H), 3,00 (s, 3H), 2,37-2,25 y 2,11-2,02 (m, total 2H), 1,40 y 1,38 (s, total 9H).

(7) (2*S*,4*S*)-*N*-Boc-2-((*tert*-butildifenilsilil)oximetil)-4-((metilsulfonil)oxi)-pirrolidina, **INT 51**

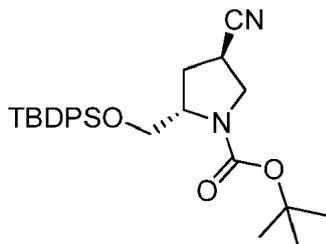


35

A una solución de **INT 50** (11,00 g, 37,24 mmol) en DCM (100 mL) se añadió imidazol (4,30 g, 63,16 mmol), seguido de *tert*-butilclorodifenilsilano (11,0 mL, 42,82 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h. La suspensión se filtró sobre una capa fina de Celite. El filtrado se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 0-50%) para proporcionar **INT 51** en forma de un aceite incoloro.

UPLC-MS: MS (ESI): [M+H-tBu]<sup>+</sup> 534,3, rt = 1,50 min. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) rotámeros 7,69-7,62 (m, 4H), 7,45-7,35 (m, 6H), 5,28-5,16 (m, a, 1H), 4,17-4,07 y 4,05-3,97 (m, total 1H), 3,94-3,87 (m, 1H), 3,87-3,80 (m, 1H), 3,64-3,50 (m, 2H), 2,91 (s, a, 3H), 2,71-2,61 y 2,40-2,30 (m, total 2H), 1,43 y 1,33 (s, total 9H), 1,06 (s, 9H).

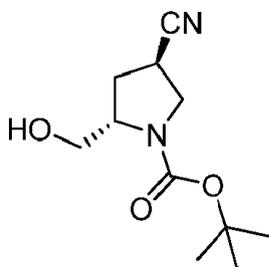
(8) (2*S*,4*R*)-*N*-Boc-2-((*tert*-butildifenilsilil)oximetil)-4-(ciano)pirrolidina, **INT 52**



A una solución de **INT 51** (5,06 g, 9,48 mmol) en DMF (75 mL) se añadió cianuro de sodio (1,39 g, 28,40 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 3 h. La mezcla se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 0-25%) para proporcionar **INT 52** en forma de una resina incolora.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) rotámeros 7,65-7,55 (m, 4H), 7,47-7,31 (m, 6H), 4,13-4,05 y 4,02-3,91 y 3,78-3,57 (m, total 5H), 3,39-3,29 (m, 1H), 2,52-2,21 (m, 2H), 1,48 y 1,34 (s, total 9H), 1,05 (s, 9H).

(9) (2*S*,4*R*)-*N*-Boc-2-(hidroximetil)-4-(ciano)pirrolidina, **INT 53**

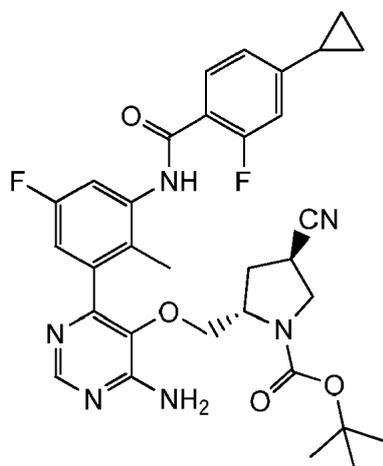


A una solución de **INT 52** (2,95 g, 6,35 mmol) en THF (30 mL) se añadió TBAF (1,0 M en THF, 7,5 mL, 7,50 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2,5 h. La mezcla se concentró y el residuo se recogió en EtOAc. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de ciclohexano/EtOAc, 0-100%) para proporcionar **INT 53** en forma de un residuo incoloro.

MS (ESI): [M+H-tBu]<sup>+</sup> 171,1. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 4,14-3,83 (m, a, 2H), 3,75-3,53 (m, 4H), 3,35-3,19 (m, a, 1H), 2,40-2,26 y 2,23-2,10 (m, total 2H), 1,47 (s, 9H).

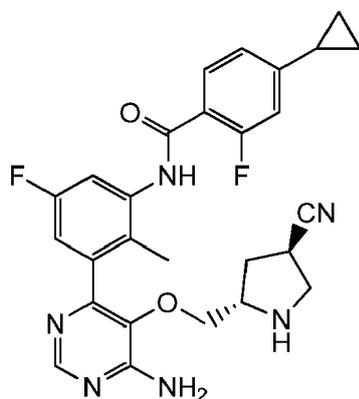
(10) 2-(((4-amino-6-(3-(4-ciclopropil-2-fluorobenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidin-5-il)oxi)metil)-4-cianopirrolidina-1-carboxilato de (2*S*,4*R*)-*tert*-butilo, **INT 54**

40



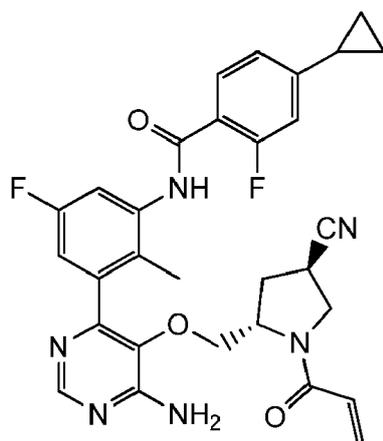
5 A una solución de **INT 48** (240 mg, 0,61 mmol) e **INT 53** (274 mg, 1,21 mmol) en THF (15 mL) se añadió SMOPEX-301 (1 mmol/g, 1,51 g, 1,51 mmol). La mezcla se calentó a 60 °C y se añadió DIAD gota a gota a esta temperatura. La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite y el filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de TBME/EtOAc, 0-100%) para proporcionar **INT 54** en forma de un aceite incoloro.  
UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  605,3,  $r_t = 1,14$  min.:

10 (11) *N*-(3-(6-amino-5-(((2S,4R)-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)pirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida, **INT 55**



15 A una solución de **INT 54** (contenido 83%, 313 mg, 0,43 mmol) en DCM (10 mL) se añadió TFA (1,0 mL, 12,98 mmol), seguido de una gota de agua. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1,5 h. La mezcla se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de DCM/(MeOH con hidróxido de amonio acuoso al 2%), 0-40%) para proporcionar **INT 55** en forma de la amina libre en forma de un residuo incoloro.  
20 UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  505,3,  $r_t = 0,75$  min.:

25 (12) *N*-(3-(5-(((2S,4R)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida

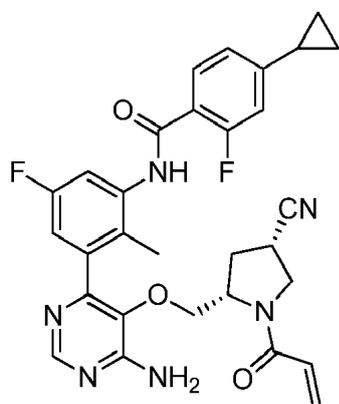


5 A una solución de **INT 55** (102 mg, 0,20 mmol) y DIPEA (0,200 mL, 1,15 mmol) en DCM (4,0 mL) a 0 °C se añadió lentamente gota a gota cloruro de acrililo (0,020 mL, 0,24 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. La mezcla se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (sílice; gradiente de EtOAc/MeOH, 0-20%), seguido de purificación por SFC para proporcionar **Ejemplo 39** en forma de un sólido blanco después de la liofilización.

10 UPLC-MS: MS (ESI):  $[M+H]^+$  559,4, rt = 0,96 min.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) rotámetros 9,81 (s, 1H), 8,21 (d, 1H), 7,72-7,63 (m, 1H), 7,57-7,47 (m, 1H), 7,17-6,91 (m, 5H), 6,48-6,39 y 6,32-6,21 (m, total 1H), 6,15-6,05 (m, 1H), 5,68-5,56 (m, 1H), 4,29-4,22 y 4,18-4,12 (m, total 1H), 3,73-3,62 y 3,53-3,45 (m, total 3H), 3,35-3,25 y 3,17-3,08 (m, total 2H), 2,26-1,95 (solapamiento m y s, total 6H), 1,10-1,01 (m, 2H), 0,85-0,75 (m, 2H).

15 Ejemplo 40

***N*-(3-(5-(((2*S*,4*S*)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida**



20 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el **Esquema 4** siguiendo un procedimiento análogo al **Ejemplo 39** reemplazando *N*-Boc-4-hidroxipirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*S*)-metilo por *N*-Boc-4-hidroxipirrolidina-2-carboxilato de (2*S*,4*R*)-metilo en la etapa 5.

25 UPLC-MS MS (ESI):  $[M+H]^+$  559,4, rt = 0,94 min.:

**Ejemplo 41: Terapia combinada de inhibidor de BTK/células T CAR19 para el linfoma de células del manto**

30 La terapia adoptiva de células T es muy prometedora para el tratamiento de las neoplasias linfoides. El linfoma de células del manto (MCL), tanto antes como después de la transformación de células grandes, probablemente también se beneficiará de la terapia adoptiva basada en CART19, en particular cuando se combina con inhibidores de BTK, tales como los que afectan directamente a las células MCL.

35 Para analizar adicionalmente la combinación de terapia adoptiva basada en CART19 en combinación con inhibidores de BTK, se utilizarán rastreos de alto rendimiento para evaluar los inhibidores de BTK descritos en esta memoria en

combinación con células CART19. Las combinaciones más prometedoras se evaluarán con mayor detalle, tanto in vitro como in vivo, en un modelo de ratón de xenotrasplante de MCL, que en última instancia puede guiar el desarrollo de un protocolo clínico para evaluar la combinación de inhibidor de BTK y la inmunoterapia de células CART en pacientes con MCL.

[001] En este estudio, se llevarán a cabo estudios preclínicos para determinar el potencial de la eficacia clínica de este enfoque en los diferentes subtipos de MCL y para evaluar la capacidad y para terapéuticamente las células diana MCL utilizando células CART19 ya sea solo o en combinación a voluntad con la pequeña molécula de inhibidores de BTK.

#### Plan de investigación

En un entorno preclínico, se evaluará la capacidad de fijar terapéuticamente a células MCL, tanto células cultivadas como de tipo primario, utilizando inhibidores de BTK. Se utilizará un ensayo de MTT de alto rendimiento para determinar el efecto de estos agentes para identificar potenciales combinaciones óptimas, dosificación y tiempo de aplicación del agente. Las 2-3 combinaciones más prometedoras se evaluarán con mayor detalle con respecto a la función celular, la señalización celular basada en la fosforilación y la expresión génica primero in vitro y luego in vivo en el modelo de xenotrasplante MCL.

#### Estudios in vitro para caracterizar la capacidad de las combinaciones de inhibidor de quinasa/células CART-19 de fijar eficazmente como objetivo las células MCL

En este objetivo, se examinarán ensayos funcionales, fenotípicos, bioquímicos y moleculares detallados enumerados anteriormente para estudiar in vitro el impacto de los inhibidores de BTK en las células MCL, así como para examinar las interacciones entre las células CART19 y las células MCL y el impacto de los inhibidores en estas interacciones.

Los puntos de referencia para lograr este objetivo serán generar un conjunto de datos completo para:

- i. documentar que las células CART19 son activadas y lisan las células MCL primarias y cultivadas;
- ii. demostrar que los inhibidores de BTK potencian la capacidad entre sí y/o las células CART19 para eliminar células MCL sin afectar negativamente la función de las células CART19 cuando se aplican apropiadamente con respecto a la dosis y, para algunos, el momento de la administración del inhibidor frente a las células CART19; y
- iii. establecer un régimen para el programa y la dosificación del inhibidor de BTK que se utilizará en los experimentos de xenotrasplante de MCL in vivo con ratones NSG.

Los objetivos de este estudio son, p. ej., evaluar si identificar las combinaciones terapéuticas óptimas de inhibidores de BTK junto con células CART19, monitorizar la actividad de CART19 y caracterizar los efectos funcionales, bioquímicos y moleculares de la terapia sobre MCL.

Estos estudios deben establecer un esquema racional de programación para el momento y la dosis del inhibidor de la quinasa del tratamiento con BTK junto con la terapia con CART19 a evaluar in vivo.

#### Estudios in vivo para evaluar la capacidad de las células CART19 para fijar como objetivo el linfoma folicular, solas y en combinación con el inhibidor de BTK

Con este objetivo, los autores de la invención someterán a ensayo en modelos animales la capacidad de la combinación o combinaciones de células inhibitoras/CART19 seleccionadas de afectar el crecimiento de células MCL establecidas y primarias.

Los puntos de referencia para lograr este objetivo serán generar un conjunto de datos para:

- i. demostrar que la combinación seleccionada de inhibidor/células CART19 potencia notablemente la supervivencia de los animales injertados con MCL en comparación con los controles (animales tratados con agente único y simulado);
- ii. establecer un régimen para el programa y dosificar la combinación seleccionada de inhibidor de quinasa/CART19 a utilizar como base para un ensayo clínico futuro.

Los objetivos de este estudio incluyen evaluar el tratamiento y el programa de dosis definidos en el objetivo 1 para la combinación de inhibidor de quinasa identificado/CART19 más inhibidor de BTK, y testar si el tratamiento de BTK tiene sinergia con CART19 para atacar el MCL en ratones NSG xenotrasplantados con células MCL, tanto cultivadas como primarias.

Se utilizarán los siguientes tipos de células, compuestos, animales y metodologías experimentales para lograr los objetivos propuestos:

#### Células MCL:

Cuatro líneas celulares de MCL (Jeko-1, Mino, SP-49 y SP-53) y muestras viables congeladas de 15 MCL primarios (12 típicos y 3 blastoides). Mientras que las líneas celulares crecen bien de forma espontánea, las células primarias se cultivarán solas así como en presencia de medio acondicionado recogido de células estromales de médula ósea HS5 para mejorar su viabilidad.

#### Células CART19:

Células T humanas primarias manipuladas para expresar CAR19 se generarán utilizando la transducción de lentivirus y utilizando los protocolos establecidos ((Kalos M, et al. (2011) Sci Transl Med. 3: 95ra73; y Porter DL, et al. (2011) N Engl J Med. 365: 725-733). Después de un evento de transducción único las células T expresan típicamente CAR19 a frecuencias superiores a 30%.

Estudios de los autores de la invención utilizarán poblaciones CART 19 de cinco pacientes con SLL/CLL (ya están disponibles 50-100 viales/paciente con  $1 \times 10^7$  células/vial). Las células CART19 se identificarán utilizando un anticuerpo de idiotipo específico anti-CAR19 (STM). La actividad de CART19 se controlará tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones NSG de manera estandarizada utilizando líneas celulares CD19 + NALM-6, K562 CD19 negativo y K562 transducidas con CD19. Aunque la función de la célula CART19 no está restringida por MHC, también se utilizarán células CART19 de al menos 5 pacientes con MCL.

#### Inhibidores de BTK

Los inhibidores de BTK descritos en esta memoria, p. ej., compuestos de fórmula (I), pueden ensayarse utilizando los métodos descritos en este Ejemplo.

Los compuestos se evaluarán primero en el espectro predeterminado de dosis efectivas, incluidas las concentraciones no tóxicas alcanzadas en el suero de los pacientes, para asegurar una inhibición óptima de BTK.

#### Animales

Los experimentos *in-vivo* se realizarán utilizando ratones NOD-SCID-IL-2Rgc null (NSG) que se crían y están disponibles de Stem Cell y Xenograft Core utilizando reproductores obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor). Los ratones serán alojados en condiciones estériles utilizando microaisladores con filtro HEPA y se alimentarán con alimentos irradiados y agua acidificada.

Los ratones trasplantados se tratan con antibióticos (neomicina y polimixina) durante la duración del experimento. Se utilizarán animales de seis a ocho semanas de edad, mezclas iguales de machos y hembras, para todos los estudios de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales.

Los autores de la invención han utilizado animales NSG en estudios previos de transferencia adoptiva de células T específicamente para evaluar la actividad diferencial de las células CART19 (Witzig TE, et al. (2010) Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010: 265-270, ensayo de MTT). El ensayo de MTT de alto rendimiento para evaluar el crecimiento de células MCL se realizará primero en respuesta a los inhibidores de BTK aplicados solos o en varias combinaciones. Este ensayo es capaz de determinar simultáneamente la tasa de proliferación celular y la viabilidad, lo que permite una evaluación eficiente de muchas combinaciones posibles de inhibidores de moléculas pequeñas en presencia o ausencia de células CART19. Los aspectos clave de este análisis serán caracterizar el efecto del fármaco con respecto al posible efecto sinérgico, aditivo o antagonista. Además, se evaluará el efecto de los inhibidores de BTK sobre las células CART19. Establecer el momento adecuado de la aplicación del fármaco para minimizar u optimizar su efecto potencial en las células CART19 será uno de los objetivos de estos experimentos.

Para realizar la prueba, células MCL se sembrarán en placas de 96 pocillos a razón de  $1 \times 10^4$  células/pocillo, por triplicado, y se expondrán a medio o inhibidores de BTK en diversas combinaciones y concentraciones de células CART-19. Después de 48 y 74 h, el número relativo de células metabólicamente activas se determinará mediante el uso del ensayo colorimétrico de reducción de MTT (Promega).

La significancia de la diferencia entre los valores medios (+/- DE) de los controles y diferentes condiciones de tratamiento se evaluó utilizando el test t de Student, considerándose el valor de  $P < 0,05$  estadísticamente significativo.

#### Ensayos de apoptosis y proliferación celular:

Las combinaciones de fármacos más prometedoras se evaluarán a continuación en los ensayos de marcaje CFSE y marcaje terminal dUTP terminal de corte (TUNEL) para determinar los componentes tanto citostáticos como citotóxicos de la inhibición del crecimiento celular MCL, respectivamente. En el primer ensayo, las células MCL se marcarán con la adición de CFSE del inhibidor de BTK y/o células CART-19 sin marcar. Después de 48 h, las células cultivadas

serán analizadas por FACS para el patrón de marcaje CFSE de las células de tipo MCL. El ensayo de TUNEL se realizará utilizando el kit de ensayo de fragmentación de ADN ApoAlert de BD Biosciences de acuerdo con el protocolo del fabricante.

- 5 En resumen, células MCL se cultivarán con los inhibidores y/o células CART19 durante 48 o 72 horas. Después de lavarse, las células se teñirán con anticuerpo anti-CD20 marcado y se permeabilizarán, lavarán e incubarán en tampón TdT durante 1 hora a 37°C. La reacción se detendrá, las células se lavarán, resuspenderán y analizarán mediante citometría de flujo utilizando el software CellQuest PRO.

10 Ensayos funcionales de CART19:

Los autores de la invención medirán la actividad efectora de células CART19 contra las líneas celulares de MCL utilizando ensayos de desgranulación de CD107, ensayos de secreción de citoquinas intracelulares (ICS), ensayos de citólisis de proliferación y ensayos de detección de citoquinas múltiples. Para los ensayos de desgranulación e ICS, el efector (células T) y la diana (células tumorales) se incubarán conjuntamente en presencia de anticuerpo anti-CD107 durante 4 horas a una E:T de 0,2:1, seguido de tinción para la superficie (CAR19, CD3, CD8, CD4) y marcadores de citoquinas intracelulares según protocolos establecidos. La citólisis de células MCL se evaluará utilizando ensayos de citólisis basados en citometría de flujo. Para los ensayos de proliferación, las células efectoras se precargarán con CFSE (carboxifluoresceína succinimidil estercarboxi-fluoroscceína-succinil esterasa), se mezclarán con las células diana a una E:T de 0,2:1, se incubarán conjuntamente a 37°C durante 4 días, se teñirán para marcadores de superficie (CAR19, CD3, CD8, CD4) y se analizarán para dilución de CFSE por citometría de flujo.

Ensayos de citoquinas multiplex.

25 Los autores de la invención medirán la producción de citoquinas por parte de las células CART19 en respuesta a dianas de MCL utilizando ensayos de perlas basados en Luminex. Para estos análisis emplearán el kit de Invitrogen 30-plex que mide simultáneamente, IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IP-10, MIG Eotaxina, RANTES, MCP-1, VEGF, G-CSF, EGF, FGF-básico y HGF en suero, plasma o sobrenadante de cultivo de tejidos.

30

Análisis de citometría de flujo multiparamétrico de células CART19T:

Los autores de la invención medirán la modulación de los marcadores de superficie asociados con la activación y supresión funcional en las células CART19 después de la incubación conjunta con células tumorales utilizando citometría de flujo de cuatro colores y un BD LSR II personalizado equipado con 4 láseres (azul (488 nM), violeta (405 nM), verde (532 nM) y rojo (633 nM) disponibles a través del núcleo de citometría de flujo de Abramson Cancer Center de la Universidad de Pensilvania. Todos los datos de citometría de flujo se analizarán con el software FlowJo (TreeStar, San Carlos, CA). Estos análisis pueden ser llevados a cabo utilizando un canal de volcado para excluir las células muertas y células diana (CD19 +), y un reactivo específico para el idiotipo de CAR19 para detectar células CART19. Los autores de la invención van a evaluar los siguientes marcadores en células CART19-positivas y.-negativas (CD3+/CD8+ y CD3+/CD4+) después de la incubación conjunta con células tumorales, en células intactas o permeabilizadas según sea necesario. Han establecido paneles multiparamétricos para estos marcadores:

- función de activación/efectora: CD25, CD154, CD134, CD137, CD69, CD57, CD28, T-bet

- inhibición: CD152 (CTLA4), PD1, LAG3, CD200

45 - supresión (Treg) CD4+/CD25+/CD127-, Fox-P3+

Simultáneamente, las células MCL identificadas por tinción de CD19 y CD5, serán examinadas para la expresión de las proteínas inmunosupresoras: CD174 (PD-L1) CD173 (PD-L2) y CD152.

50 Impacto del inhibidor en la señalización celular:

Esta parte del estudio se centrará únicamente en los compuestos seleccionados; los que resultaron ser los más efectivos en los ensayos funcionales (crecimiento celular, proliferación y apoptosis) arriba descritos. El efecto se estudiará por separado para cada uno de los fármacos y para las combinaciones seleccionadas y los estudios se ajustarán a los compuestos específicos. Por ejemplo, los ensayos relacionados con la inhibición de BTK se centrarán en las vías PI3K-AKT y MEK-ERK. Estos estudios se realizarán mediante transferencia Western utilizando anticuerpos fosfoespecíficos tal como se describe (Marzec M, et al. (2006) Blood. 108:1744-1750; Marzec M, et al. (2008) Blood 111: 2181-2189; Zhang Q, et al. (2011) Proc Natl Acad Sci USA 108: 11977-11982). En resumen, las células MCL se lisarán y los extractos de proteínas se analizarán utilizando el método Lowry (Bio-Rad) y se cargarán en el gel de poliacrilamida. Para examinar la fosforilación de proteínas, las membranas manchadas se incubarán con los anticuerpos específicos del fósforo. A continuación, las membranas se incubarán con los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con peroxidasa. Las transferencias se desarrollarán utilizando el sistema ECL Plus de Amersham.

Análisis de expresión génica a escala del genoma:

La inhibición de la señalización celular generalmente conduce a cambios en la transcripción de genes. Para determinar los efectos del inhibidor seleccionado, o algunos inhibidores sobre la transcripción génica en MCL, se realizará un análisis de expresión génica a escala genómica como se describe en (2008) Blood 111: 2181-2189; Zhang Q, et al. (2011) Proc Natl Acad Sci USA 108: 11977-11982. En resumen, las células se tratarán en cultivos por triplicado con el inhibidor seleccionado o su diluyente durante 0, 4 y 8 horas. El ARN total se purificará adicionalmente para enriquecerlo en ARNm que se transcribirá de manera inversa, se marcará y examinará mediante hibridación con el microchip Affimetrix contra todos los exones de genes conocidos. Los datos de la micromatriz se normalizarán y resumirán utilizando RMA como se implementa en el algoritmo GeneSpring y MAS5. Los valores de p resultantes se corregirán para pruebas múltiples utilizando la tasa de descubrimiento falso (FDR) mediante el método de aumento de Benjamini-Hochberg. Las pruebas de expresión diferencial se llevarán a cabo utilizando una diversidad de herramientas, incluidas SAM y PartekPro. Los genes emergentes de interés se agruparán en base a patrones de expresión (GeneSpring o Spotfire), y se analizarán grupos funcionales y vías en las bases de datos de KEGG, Ingenuity Pathway Analysis y Gene Ontology utilizando el NIH-David como herramienta de búsqueda. Para los genes identificados en base a los datos, la conformación de expresión independiente por el RTPCR cuantitativo se realizará en un grupo más grande de muestras (al menos 20) de diversos tipos de MCL (estándar frente a blastoide y SOX11 positivo frente a SOX11 negativo).

Análisis de la secuencia de ADN del exoma completo:

Para caracterizar mejor los casos de MCL con respecto a su patogénesis y, en la medida de lo posible, la respuesta a las terapias de combinación propuestas aquí, se examinará la secuencia de ADN exómico. La captura del exoma completo y la secuenciación de próxima generación del MCL y las muestras de ADN de sangre periférica normal se realizarán utilizando la matriz de exoma humano NimbleGen Sequence Capture 2.1M y el instrumento HiSeq 2000/1000 Illumina.

Evaluación del efecto del tratamiento en los tumores xenotrasplantados:

Los ratones NSG portarán los tumores de tumores MCL (derivados de ambas líneas celulares MCL: Jeko y Mino y células primarias implantadas como fragmentos de tejido o, menos preferiblemente, suspensiones celulares). Los tumores se propagarán mediante la implantación subcutánea de los pequeños fragmentos tumorales. La terapia se iniciará una vez que los tumores alcancen 0,2-0,3 cm de diámetro. El o los inhibidores de BTK se administrará por sonda a la dosis y el tiempo preseleccionados *in vitro* (p. ej., esperamos aplicar el inhibidor de BTK simultáneamente con las células CART19, dada su especificidad de células B y la falta esperada de cualquier efecto inhibitorio sobre las células CART19). Células de CART-19 se inyectan en la vena de la cola de los ratones con tumor a una dosis de  $1 \times 10^7$ /animal, el o los inhibidores de BTK se administrarán por sonda en dosis y el momento preseleccionado *in vitro*. una dosis que los autores de la invención han establecido es suficiente para erradicar de forma reproducible las células malignas y, al mismo tiempo, no inducir la enfermedad xenoinjerto frente a huésped. Se generará un gran stock maestro de células CART19 ( $1 \times 10^{10}$ ) y se congelará para minimizar la variabilidad asociada con las diferencias de células efectoras. La medida principal de estos experimentos será la supervivencia, que se evaluará utilizando curvas de Kaplan/Meier. Como medida secundaria, se evaluará la expansión diferencial de las células CART19 en animales después de la infusión de células T. Esto se hace posible por el hecho de que el producto de células T infundido se compone de células CART19-positivas y -negativas en una proporción definida. Para estos análisis, los animales serán sangrados semanalmente mediante sangrado en la vena de la cola (25 microlitros cada vez), seguido de lisis de glóbulos rojos y tinción para CD3, CD4, CD8 y CART19 humanos. Expansión preferencial de células CART19 (al menos un aumento de 2 veces en la relación CART19+/CART19- será evidencia de expansión celular CART19 selectiva impulsada por MCL. Para evaluar los resultados del tratamiento, los volúmenes de los tumores subcutáneos implantados se medirán determinados de la siguiente manera, de acuerdo con la fórmula:  $\text{volumen} = 0.4ab^2$ , en donde a y b designan respectivamente los diámetros largo y corto del tumor. Las diferencias de volumen del tumor entre los grupos de ratones tratados y no tratados se analizarán estadísticamente utilizando un test t estándar. Los ratones serán sacrificados en el punto final de los experimentos (> 30 días), o si los tumores alcanzan > 1,2 cm de diámetro, o cuando se observa cualquier evidencia de la angustia del animal. Las diferencias de volumen del tumor entre los grupos de ratones tratados y no tratados se analizarán estadísticamente utilizando un test t estándar. Los tumores, así como los órganos internos, serán recogidos, procesados y analizados por histología y, para tejidos seleccionados, por inmunohistoquímica utilizando la batería de anticuerpos contra células B (CD20, CD79a, Pax-5, CD10, BCL-6) y células T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, TIA-1) y el marcador de proliferación Ki-67.

Análisis estadístico:

En los estudios funcionales *in vitro*, la significación de la diferencia entre los valores medios (+/- DE) de los controles y diferentes condiciones de tratamiento se evaluarán utilizando test t de Student con el valor de  $P < 0,05$  que se considera que es estadísticamente significativo. En base a experiencias anteriores de los autores de la invención, se espera que sean grandes las diferencias entre los grupos de ratones experimentales. Por lo tanto, se utilizarán 10

ratones NSG para cada uno de los grupos de tratamiento, lo que garantizará al menos el 90% de potencia con un nivel de error de tipo 1 de 0,05 con un test / de dos muestras de dos lados, dada la relación entre la diferencia en las medias del tratamiento y la desviación estándar es de al menos 3, que es lo esperado. Los datos se presentarán como media  $\pm$  EMT. La comparación entre los grupos se realizará mediante el test t de dos muestras. Se considera significativo un valor de  $p < 0,05$ . Para los estudios de supervivencia sin tumor, se utilizarán grupos de 10 ratones para comparar la supervivencia, y se registrará el estado de la enfermedad (tumor frente a sin tumor) y el tiempo exento de tumor para cada uno de los ratones. Se trazará la curva de supervivencia de Kaplan-Meier y se realizará la prueba de rango logarítmico para comparar las curvas de supervivencia. El nivel de significancia se controla en 0,05

#### 10 Ejemplo 42: Terapia combinada de células T con ibrutinib/CAR19 para el linfoma de células del manto

Este ejemplo ilustra la eficacia de una terapia con CAR19 en combinación con el inhibidor de BTK ibrutinib. Los experimentos de este ejemplo proporcionan una guía para cuantificar la eficacia de otros inhibidores de BTK en combinación con terapias con CAR, y también proporcionan evidencia de la eficacia de un inhibidor de BTK descrito en esta memoria en combinación con una terapia con CAR.

Los experimentos descritos en este ejemplo caracterizan la actividad de CART19 en combinación con el tratamiento con ibrutinib para tratar el linfoma de células del manto *in vitro* e *in vivo*. Ibrutinib es un inhibidor de molécula pequeña de la BTK que se utiliza a menudo para el tratamiento de algunos cánceres hematológicos. Los experimentos *in vitro* descritos en esta memoria incluyen la evaluación de la proliferación, la producción de citoquinas, la desgranulación de CD107a y la citotoxicidad. Se utilizaron modelos de ratón de Xenoplant para investigar la eficacia y la dosificación óptima de CART19 con el tratamiento con ibrutinib *in vivo*. Aunque ibrutinib muestra una actividad considerable en el MCL, alrededor del 30% de los pacientes no responden, y entre los que responden, solo el 21% a aproximadamente un tercio experimentan una remisión completa (Wang et al. NEJM 369.6(2013):507-16). El logro de una remisión completa se asocia con una mejor supervivencia libre de progresión. Además, la terapia puede conducir a la farmacoresistencia con una duración de respuesta media de 17,5 meses. En algunos entornos, se han observado mutaciones en los sitios de unión de BTK o inmediatamente después de la terapia con ibrutinib, lo que destaca un mecanismo de resistencia a los medicamentos que puede volverse cada vez más frecuente. Véase, p. ej., Woyach et al. NEJM. 370.24(2014):2286-94. Además, el bloqueo de la función de BTK conduce a la inhibición de la señalización del receptor de células B (BCR) y no es directamente citotóxico. Véase, p. ej., Ponader et al. Blood. 119.5(2012):1182-89. La falta de citotoxicidad y la imposibilidad de erradicar los clones malignos predisponen a la evolución clonal bajo una presión de selección. Además, los hallazgos preliminares de una mayor transformación a enfermedad agresiva en pacientes tratados con ibrutinib para la CLL son preocupantes. Véase, p. ej., Bird et al. NEJM. 369.1(2013):32-42; y Parikh et al. Blood. 123.11(2014):1647-57.

La infusión de células T autólogas transducidas con receptores de antígeno quimérico (CAR) contra el antígeno CD19 específico para células B (CTL019, CART19) conduce a respuestas clínicas drásticas en la mayoría de los pacientes con diversas neoplasias de células B, principalmente leucemia linfoblástica aguda (ALL). Véase, p. ej., Maude et al. NEJM. 371.16(2014):1507-17; y Ruella et al. Expert Opin. Biol. Ther. (2015):1-6. La presencia de masas de ganglios linfáticos o enfermedad voluminosa puede conducir a una menor infiltración de células T y a la consiguiente reducción de la actividad antitumoral. La linfadenopatía voluminosa no parece afectar la respuesta a ibrutinib. Wang et al. NEJM. 369.6(2013):507-16. Además, ibrutinib ha demostrado una eficacia particular para reducir las masas tumorales y movilizar las células B neoplásicas en la sangre periférica

#### 45 Métodos

*Líneas celulares y muestras primarias.* Líneas celulares de MCL se obtuvieron de ATCC (Mino, Jeko-1, SP-49) mientras que MCL-RL se generó a partir de un derrame pleural progresivo de un paciente con MCL. Para experimentos *in vitro*, las líneas celulares se mantuvieron en cultivo con medio RPMI complementado con suero de ternero fetal al 10%, penicilina y estreptomina. Para algunos experimentos, las células MCL-RL y Jeko-1 se transdujeron con luciferasa de escarabajo verde/eGFP y luego se clasificaron para obtener una población positiva > 99%. Las líneas celulares de leucemia aguda MOLM-14, K562 o NALM-6 y la línea celular T-ALL JURKAT se utilizaron como controles. Estas líneas celulares se obtuvieron originalmente de la ATCC. Se obtuvieron muestras de médula ósea (BM) y sangre periférica (PB) de MCL humano primario anónimo de las prácticas clínicas de la Universidad de Pensilvania. Para todos los estudios funcionales, las células primarias se descongelaron al menos 12 horas antes del experimento y se dejaron reposar a 37 °C.

*Generación de construcciones CAR y células T CAR.* El receptor de antígeno quimérico anti-CD19 murino (que contiene una bisagra de CD8, un dominio coestimulador de 41BB y un dominio de señalización de CD3 zeta) se generó tal como se describió previamente. Véase, p. ej., Milone et al. Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy. 17.8(2009):1453-64. La producción de células T que expresan CAR se realizó como se describió previamente. Véase, p. ej., Gill et al. Blood. 123.15(2014):2343-54. Se obtuvieron células T CD4 y CD8 de donantes normales o células mononucleares PB (PBMC) del Núcleo de Inmunología Humana de la Universidad de Pensilvania. Las células T se cultivaron en placa a razón de  $1 \times 10^6$ /ml, con una relación CD4:CD8 de 1:1 y se expandieron en medio

X-Vivo 15 (Lonza, 04-418Q), suero humano AB al 5% (Gemini, 100-512), penicilina/estreptomicina (Gibco, 15070063) y Glutamax (Gibco, 35050061) utilizando Dynabeads anti-CD3/CD28 (Life Technologies, 11161D) añadidos el día 1 de cultivo y retirados el día 6. Las células T se transdujeron con lentivirus el día 2. Las células T se expandieron en cultivo durante 8-15 días y se recolectaron cuando el volumen medio de células estaba por debajo de 300 fl. A continuación, las células T se crioconservaron en FBS DMSO al 10% para experimentos futuros. Antes de todos los experimentos, las células T se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche a 37 °C.

*Ibrutinib.* Ibrutinib (PCI-32765) se adquirió de MedKoo (n° 202171) o Selleck Biochemicals (n° S2680) en forma de polvo o solución DMSO. Para experimentos in vitro, ibrutinib se diluyó a concentraciones de 10, 100 y 1000 nM. Para los experimentos in vivo, ibrutinib se disolvió en polvo en una solución de HP-beta-ciclodextrina al 10% (1,6 mg/ml) y se administró a ratones en el agua de bebida.

*Análisis de citometría de flujo multiparamétrico.* Los anticuerpos anti-humanos se adquirieron de Biolegend, eBioscience o Becton Dickinson. Las células se aislaron de cultivos in vitro o de animales, se lavaron una vez en PBS complementado con suero de ternero fetal al 2% y se tiñeron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para la cuantificación del número de células se utilizaron perlas Countbright (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los análisis, la población de interés se seleccionó en función de las características de dispersión hacia adelante frente a las laterales seguidas de la compuerta singlete, y las células vivas se bloquearon utilizando Live Dead Aqua (Invitrogen). Se incluyó el control de tiempo para el control de calidad. La expresión en superficie de CAR19 se detectó como se describió previamente. Véase, p. ej., Kalos et al. Science Translational Medicine. 3.95(2011):95ra73. La citometría de flujo se realizó en un citómetro Fortessa-LSR de cuatro láseres (Becton-Dickinson) y se analizó con FlowJo X 10.0.7r2 (Tree Star).

*Ensayo de desgranulación.* El ensayo de desgranulación se realizó como se describió previamente. Véase, p. ej., Kalos et al. Science Translational Medicine. 3.95(2011):95ra73. Células T se incubaron con células diana en una relación de 1:5 en medio de células T. Se añadieron al co-cultivo anticuerpos anti-CD107a-PECY7 (Biolegend), anti-CD28 (BD Biosciences), anti-CD49d (BD Biosciences) y monensina (BD Biosciences). Después de 4 horas, las células se recogieron y se tiñeron para expresión de CAR, tinción de CD3, CD8 y Live Dead aqua (Invitrogen). Las células se fijaron y permeabilizaron (tampones Invitrogen Fix/Perm) y luego se realizó la tinción intracelular para detectar múltiples citoquinas (IFN, TNF $\alpha$ , IL-2, GM-CSF, MIP1b).

*Ensayo de proliferación.* Células T se lavaron y se resuspendieron a razón de  $1 \times 10^7$ /ml en 100  $\mu$ l de PBS y se tiñeron con 100  $\mu$ l de CFSE 2,5  $\mu$ M (Invitrogen) durante 5 minutos a 37 °C. La reacción se extinguió después con medios fríos, y las células se lavaron tres veces. Las dianas se irradiaron a una dosis de 100 Gy. Células T se incubaron en una relación de 1:1 con células diana irradiadas durante 120 horas, añadiendo medio a las 24 horas. A continuación, se recogieron las células, se tiñeron para CD3, CAR y Live Dead aqua (Invitrogen), y se añadieron perlas Countbright (Invitrogen) antes del análisis de citometría de flujo para la cuantificación absoluta.

*Ensayos de citotoxicidad.* Se utilizaron luciferasa/eGFP + NALM-6 o células RL para el ensayo de citotoxicidad como se describió previamente. Véase, p. ej., Gill et al. Blood. 123,15(2014):2343-54. Las dianas se incubaron en las relaciones indicadas con células T efectoras durante 4 o 16 horas. La muerte se calculó mediante imágenes de bioluminiscencia en una cámara Xenogen IVIS-200 Spectrum

*Mediciones de citoquinas.* Las células efectoras y diana se incubaron conjuntamente en una relación de 1:1 en medio de células T durante 24 h. El sobrenadante se recogió y se analizó por 30-plex array Luminex (Luminex Corp, FLEXMAP 3D) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen). Véase, p. ej., Kalos et al. Science Translational Medicine. 3.95(2011):95ra73.

*Experimentos in vivo.* Se adquirieron ratones NOD-SCID- $\gamma$  cadena - / - (NSG) obtenidos originalmente de Jackson Laboratories de Stem Cell and Xenograft Core de la Universidad de Pennsylvania. Todos los experimentos se realizaron con protocolos aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC). Los esquemas de los modelos de xenoinjerto utilizados se comentan en esta memoria. Se inyectaron células (líneas celulares MCL o células T) en 200  $\mu$ l de PBS a la concentración indicada en las venas de la cola de los ratones. Se realizaron imágenes bioluminiscentes utilizando una cámara Xenogen IVIS-200 Spectrum y se analizaron con el software LivingImage v. 4.3.1 (Caliper LifeSciences). Los animales se sacrificaron al final del experimento o cuando cumplieron los puntos finales pre-especificados de acuerdo con los protocolos de IACUC.

*Inmunohistoquímica.* La tinción inmunohistoquímica (IHC) de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina se realizó en un instrumento Leica Bond-III utilizando el sistema de detección de refinamiento de polímeros Bond. Los anticuerpos contra CD3, CD4, CD8, Pax5 y CyclinD1 se utilizaron sin diluir. La recuperación de epítomos inducida por calor se realizó durante 20 minutos con solución ER2 (Leica Microsystems AR9640). Las imágenes se adquirieron digitalmente utilizando el Aperio ScanScope™.

*Análisis Estadístico.* Todas las estadísticas se realizaron utilizando GraphPad Prism 6 para Windows, versión 6.04.

Líneas celulares de linfoma de células del manto

5 La mayoría de las líneas de linfoma de células del manto (MCL) que existen se han immortalizado y propagado durante muchas generaciones in vitro, perdiendo así su dependencia de la señalización del receptor de células B. En consecuencia, son poco sensibles a ibrutinib. Se realizaron experimentos in vitro para determinar la sensibilidad de las líneas celulares de MCL en el tratamiento con ibrutinib. Estas líneas celulares también se utilizaron para evaluar la eficacia del tratamiento de combinación de ibrutinib/CART19 en los experimentos que se describen más adelante en este ejemplo. Células de MCL se recolectaron del derrame pleural de un paciente con MCL en recaída múltiple. 10 Tanto las células originales (RL primaria) como una línea celular derivada de ellas (RL) tenían una morfología blastoide, un inmunofenotipo típico de MCL y eran positivas para la translocación clásica t(11;14) por hibridación in situ por fluorescencia (FISH) (FIG. 16A, 16B, 16C).

15 Se cultivaron células RL y JEKO-1 con diferentes dosis de ibrutinib (0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM y 10 μM) y se determinó la sensibilidad a ibrutinib midiendo la reducción de bioluminiscencia (BLI). Como se muestra en la FIG. 14, las células RL fueron sensibles al tratamiento con ibrutinib de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, las células JEKO-1 fueron resistentes al tratamiento con ibrutinib (no se demostró una bioluminiscencia reducida en función del aumento de la dosificación con ibrutinib).

20 También se analizó la sensibilidad de las células RL, Jeko-1 y Mino a ibrutinib utilizando un ensayo MTT. La exposición de RL a concentraciones crecientes de ibrutinib in vitro condujo a una inhibición de la proliferación dependiente de la dosis y de la fosforilación del mediador aguas abajo, lo que indica un efecto sobre el objetivo de ibrutinib, con una CI50 de 10 nM. Por el contrario, las líneas celulares de MCL establecidas Jeko-1 y Mino eran relativamente resistentes a ibrutinib, con resultados de CI50 de hasta 10 μM (FIG. 16D). Para confirmar RL como un modelo viable para experimentos in vivo, a ratones NOD-SCID-cadena y inactivados (NSG) inmunodeficientes se les injertaron 1x10<sup>6</sup> células RL que expresan luciferasa- (FIG. 16E). Se evaluó su carga tumoral y la supervivencia. Después de la inyección intravenosa, MCL se injertó en todos los ratones y se localizó en el bazo y el hígado, seguido de diseminación a la médula ósea, la sangre y los ganglios linfáticos (FIG. 15F). La histología del bazo y el hígado afectados es compatible con infiltración parenquimatosa de MCL. FIG. 16G).

30 Estos resultados demostraron que estas diferentes líneas celulares podrían, por lo tanto, utilizarse para modelar tanto MCL sensible a ibrutinib como resistente a ibrutinib.

Células del linfoma de células del manto son sensibles a la muerte por CART19

35 La mayor parte del trabajo preclínico que muestra la eficacia de CART19 se ha realizado utilizando líneas de células B-ALL, que no son sensibles a ibrutinib. Además, las mejores respuestas clínicas hasta la fecha se han informado en pacientes con LLA-B, mientras que los pacientes con neoplasias malignas de células B indolentes tienen respuestas más bajas según se informa.

40 Para demostrar que el MCL es sensible a la destrucción por CART19 en este modelo, se transdujeron células T de donantes sanos con una construcción CAR anti-CD19 que se ha utilizado en ensayos clínicos. Véase, p. ej., Porter, NEJM 2011. Se realizó una serie de experimentos in vitro para demostrar que la línea celular RL sensible a ibrutinib y la línea celular Jeko-1 resistente a ibrutinib conducen a una desgranulación, producción, destrucción y proliferación de citoquinas CART-19 equivalentes (FIG. 17A, 17B, 17C, 17D). Además, se obtuvo sangre periférica o médula ósea de dos pacientes con MCL en fase leucémica, lo que permitió la expansión y transducción de linfocitos T autólogos con CAR anti-CD19. Las células CART19 autólogas derivadas de pacientes fueron reactivas a MCL mientras que las células T no transducidas no reaccionaron a sus respectivas MCL autólogas (FIG. 17E, 17F). Estos resultados indican que los MCL son sensibles a las funciones efectoras de CART19.

Evaluación del tratamiento con ibrutinib/CART19 in vitro

55 Un efecto de ibrutinib sobre las células T se descartó previamente en base a ensayos de actividad a corto plazo, como se describe en Honigberg et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107(2010):13075-80. Más tarde, se informó que un análisis del efecto de ibrutinib sobre la quinasa de células T ITK respaldaba un papel inmunomodulador de ibrutinib en las células T CD4 al inhibir la polarización de tipo Th2. Véase Dubovsky et al. Blood 122,15(2013):2539-49. El análisis de citoquinas de pacientes tratados con CART19 por varios grupos indica que la terapia CART19 está asociada tanto con Th1 (IL2, IFNγ, TNF), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) como con otras citoquinas (véase, p. ej., Kalos et al. Science Translational Medicine 3.95(2011):95ra73). En este ejemplo, se evaluó el efecto de la función CART19 con ibrutinib a, por encima y por debajo de las concentraciones de ibrutinib que se esperarían en los pacientes (concentración máxima media en suero 100-150 ng/ml). Véase Advani et al. J. Clin. Oncol. 2013;31:88.

60 Se encontró que células CART19 contenían ITK. La estimulación no específica de las células CART19 a través del TCR en presencia de ibrutinib condujo a una reducción de la ITK fosforilada (pITK-Y 180) como se informó

anteriormente para las células T CD4+. Véase Dubovsky et al. Blood 122,15(2013):2539-49. Por el contrario, la estimulación específica para las células CART19 a través del CAR no condujo a una activación de ITK disminuida (FIG. 18A). Esta observación indicó que la función de CART19 probablemente no se vería afectada negativamente por la exposición a ibrutinib.

Además, se determinó la función in vitro a corto y largo plazo de las células CART19 en presencia de ibrutinib. Ibrutinib en concentraciones clínicamente relevantes no afectó a la proliferación, desgranulación o producción de citoquinas de las células CART19; aunque a concentraciones supra-fisiológicas, hubo una inhibición de las funciones de las células CART19, lo que probablemente representa una toxicidad no específica (FIG. 18B, 18C, 3B).

En particular, PBMCs aisladas de un donante sano normal se transdujeron con una construcción CAR anti-CD19 lentiviral como se describió anteriormente. Las células T que expresan CAR19 resultantes (CART19) se cultivaron y pasaron para determinar la capacidad de proliferación y expansión. Se cultivó una relación 1:1 de células T que expresan CD4:CD8 con o sin diferentes concentraciones de ibrutinib (ibrutinib 10 nM, 100 nM y 1000 nM). Se añadió ibrutinib en cada pase celular. Se contó el número de células el día 0, el día 5, el día 6, el día 7, el día 9 y el día 10 (FIG. 2A). También se controló el volumen celular (FIG. 2B).

También se utilizó el análisis de citometría de flujo y tinción con CFSE para evaluar la proliferación de las células CART19 en presencia de ibrutinib después de la estimulación por las líneas celulares tumorales MOLM14, JEKO-1 y RL. MOLM14 es una línea celular de AML y JEKO-1 y RL son líneas celulares de linfoma de células del manto. Específicamente, las células RL son una línea celular MCL novedosa derivada de células B neoplásicas obtenidas de un derrame pleural de un paciente con recaída de MCL. Las células CART19 y las células tumorales se mezclaron en una relación de 1:1 y se evaluó la proliferación durante 5 días. El porcentaje de células en proliferación se designa en cada histograma de la FIG. 3A. La cuantificación de la proliferación como se muestra en la FIG. 3B demuestra que altas dosis de ibrutinib podrían inhibir la proliferación de células CART 19 durante el co-cultivo con líneas celulares MCL.

La desgranulación de las células T indica la activación de las células T citolíticas y la capacidad de iniciar la citotoxicidad específica para el antígeno. CD107a es un marcador funcional de la desgranulación de las células T expresado transitoriamente en la superficie celular después de la estimulación de células T. El análisis de citometría de flujo se utilizó para cuantificar las células T CART19 que expresan CD107a después de la estimulación con las líneas de células tumorales MOLM14, JEKO-1 y RL. Las células que expresan CD107a estaban presentes en Q2 (cuadrante 2) de los perfiles celulares mostrados en la FIG. 4A. La cuantificación de los resultados obtenidos a partir de los perfiles de la FIG. 4A se muestra en la FIG. 4B. Estos resultados indican que el co-cultivo de células CART19 con MCL-RL o JEKO-1 condujo a una desgranulación masiva de CD107a específica para CAR.

La producción de citoquinas por parte de las células T CART19 en presencia de ibrutinib también se cuantificó después de la estimulación por diferentes líneas de células tumorales. La producción de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  se evaluó mediante citometría de flujo. Las células que producen las citoquinas están presentes en el cuadrante 2 de los perfiles mostrados en la FIG. 5, FIG. 6 y FIG. 7. Células T CART19 estimuladas por JEKO-1 y RL mostraron un aumento en la expresión de citoquinas. Además, el aumento de las concentraciones del tratamiento con ibrutinib no afectó el porcentaje de células productoras de citoquinas CART19.

La secreción de citoquinas de las células CART19 después de la estimulación por células tumorales y en presencia de concentraciones variables de ibrutinib se analizó mediante el ensayo LUMINEX de 30 plex. Se ensayaron las citoquinas secretadas por células T<sub>H1</sub>, tales como IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Se ensayaron las citoquinas secretadas por células T<sub>H2</sub>, incluyendo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, MIP1a, GM-CSF, MIP-1b, CP-1, IL-1Ra, IL-7, IP-10, IL-1b, VEGF, G-CSF, EGF, HGF, IFN $\alpha$ , IL-12, RANTES, Eotaxina, IL-2R, MIG e IL-8 Como se muestra en la FIG. 8, las citoquinas T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub> fueron secretadas por las células T CART19.

Además, experimentos que utilizan dos técnicas diferentes indicaron que no había diferencias en la polarización Th1/Th2 entre las células CART19 expuestas a ibrutinib y las no expuestas a ibrutinib (FIG. 18).

La destrucción de células MCL por células CART19 aumentó en presencia de ibrutinib, lo que sugiere un efecto al menos aditivo de la combinación (FIG. 18E). Sin embargo, la función citotóxica intrínseca de las células CART19 no aumentó en presencia de ibrutinib. FIG. 18F).

Se realizaron ensayos de bioluminiscencia adicionales para evaluar la destrucción de células tumorales por parte de células CART19. Las células CART19 se sembraron en placas con células tumorales MOLM14, JEKO-1 y RL que portaban un indicador de luciferasa en relaciones variables, tales como 1:1; 1:0,5; 1: 0,25; y 1: 0 en una placa de 96 pocillos, por duplicado. Después de 24 horas, se detectó y cuantificó la bioluminiscencia. Los resultados indicaron que la bioluminiscencia en las muestras de MOLM14 no disminuyó después de la incubación con células CART19. Sin embargo, para las células JEKO-1 y RL, la bioluminiscencia disminuyó en presencia de células CART19, lo que indica que las células CART19 mediaban en la muerte de células JEKO-1 y RL (FIG. 9A, 9B, 9C, 9D, 9E y 9F). Hubo

una disminución adicional de la bioluminiscencia cuando se trató con ibrutinib, lo que indica que la combinación de ibrutinib y CART19 provocó un aumento de la muerte de células JEKO-1 y RL que con el tratamiento con CART19 solo. De acuerdo con estos resultados, el cálculo de las células totales después de cada tratamiento mostró que el tratamiento con CART19 de las células JEKO-1 y RL provocó una reducción en el número de células y una reducción adicional cuando se trató con CART19 e ibrutinib (FIG. 10B y 10C), lo que sugiere que la terapia de combinación no solo fue eficaz para matar las células MCL, sino que también condujo a la eliminación eficaz de las líneas celulares del MCL.

#### Evaluación del tratamiento con ibrutinib/CART19 *in vivo*

En estos experimentos se utilizaron modelos de ratón de linfoma de células del manto para evaluar la terapia de combinación de CART19 e ibrutinib *in vivo*.

Esquemas como los que se muestran en la FIG 13, 19 y 20 se utilizaron en este ejemplo. La FIG. 13 muestra un esquema de ensayo de la terapia de combinación con CART19/ibrutinib en los modelos de ratón *in vivo* de MCL.  $1 \times 10^6$  células de las líneas celulares RL (MCL-3), JEKO-1 (MCL-4) y NALM6 (MCL-5) se inyectan en ratones NSG (20 ratones para cada experimento). Después de 1 semana para permitir el injerto, el tratamiento se inicia el día 0, en el que el tratamiento es:  $0.5 \times 10^6$  células CART19 (mediante inyección), 25 mg/kg/día de ibrutinib (sonda oral) o tratamiento con CART19 + ibrutinib. En el Día 7, el Día 14, el Día 21 y el Día 28 se obtienen imágenes de la bioluminiscencia para controlar el tamaño del tumor. Los ratones que reciben tratamiento con ibrutinib se tratan continuamente con ibrutinib. También se controla la supervivencia de los ratones. Las FIGs. 19 y 20 muestran esquemas adicionales de ensayo de la terapia de combinación con CART19/ibrutinib en los modelos de ratón *in vivo* de MCL. Se inyectan  $2 \times 10^6$  células MCL-RL en ratones NSG. Después de una semana para permitir el injerto (injerto confirmado por imágenes de bioluminiscencia), el tratamiento se inicia en el Día 7 (después de la inyección de células MCL-RL), en el que el tratamiento es: control de vehículo, células CART19 ( $2 \times 10^6$  células) y/o ibrutinib (125 mg/kg/día). En los días 14, 21, 28 y 35 (después de la inyección de células MCL-RL), se obtienen imágenes de la bioluminiscencia para controlar el tamaño del tumor.

Se examinó el efecto del tratamiento con ibrutinib solo en un modelo de ratón *in vivo* de MCL. Las células RL transfectadas con el gen de GFP/luciferasa se inyectaron por vía intravenosa en ratones NSG inmunodeficientes, lo que resultó en un injerto de MCL del 100% en el hígado y el bazo, con diseminación final a los ganglios linfáticos y la médula ósea. Los ratones fueron tratados con dosis variables de ibrutinib, 25 mg/kg/día y 250 mg/kg/día. La bioluminiscencia media, que representa el crecimiento tumoral, se evaluó en diversos momentos. Como se muestra en la FIG. 15, los tumores derivados de RL demostraron sensibilidad relacionada con la dosis. Se realizaron experimentos adicionales que titulan dosis de ibrutinib en ratones que contienen células RL y se muestran en la FIG. 21. Una dosis más alta condujo a una mejor actividad antitumoral sin aumentar la toxicidad, en línea con la dosis más alta de ibrutinib utilizada en la clínica para el MCL (Wang et al. NEJM 369.6(2013):507-16).

También se realizó el hallazgo de dosis de CART19. Se inyectaron dos líneas celulares MCL, RL (MCL-1) y JEKO-1 (MCL-2), que portaban un informador de GFP-luciferasa en ratones NSG el día 0. Se inyectaron células T CART19 el día 7 en dosificaciones variables, p. ej., a  $0.5 \times 10^6$  células,  $1 \times 10^6$  células o  $2 \times 10^6$  células. Los ratones se controlaron, por ejemplo, durante 100 días. En diversos puntos de tiempo, se monitorizó el tamaño del tumor de los ratones (p. ej., formación de imágenes de bioluminiscencia) (FIG. 11A y 11B y FIG. 12A) y para la supervivencia global (p. ej., curva de supervivencia de Kaplan-Meier) (FIG. 11C y FIG. 12B). Diferentes dosis de células CART19 que muestran una eficacia antitumoral dependiente de la dosis, siendo  $2 \times 10^6$  células CART19/ratón la dosis más eficaz (FIG. 12A).

Estos estudios proporcionaron una oportunidad para realizar una comparación directa de las dos terapias para el MCL. Como se muestra en la FIG. 22, la supervivencia a largo plazo se logró solo en ratones tratados con células CART-19. No hubo diferencia en el efecto antitumoral al comparar las células T no transducidas más ibrutinib con ibrutinib solo. Por lo tanto, en todos los experimentos posteriores, los grupos de control fueron vehículo e ibrutinib solo (FIG. 23).

También se testó la adición de CART19 a ibrutinib, como se detalla en el esquema de la FIG. 20. La evaluación del efecto de ibrutinib sobre la carga tumoral indicó un crecimiento del tumor moderadamente retrasado en los primeros momentos. Por el contrario, la terapia con células CART19 condujo a una clara disminución de la carga tumoral durante varias semanas. En ratones que recibieron células CART19 solas, esto fue seguido por una recaída indolente que comenzó en el Día 40, mientras que los ratones que fueron tratados con células CART19 así como con ibrutinib no tuvieron enfermedad detectable hasta el Día 80 (FIG. 24). La histopatología de los órganos extraídos al final del experimento mostró la persistencia de la enfermedad en todos los ratones de control y tratados con ibrutinib con focos de necrosis tumoral en los tratados con ibrutinib. La mayoría de los ratones tratados con CART19 solo mostraron una recaída indolente a largo plazo acompañada de la persistencia de las células CART19, mientras que los ratones tratados con CART19-ibrutinib mostraron un aclaramiento del tumor y la desaparición de CART19 de los órganos afectados (datos no mostrados).

Mecanismo de efecto combinado de CART19 e ibrutinib

Los experimentos in vitro en esta memoria indicaron que ibrutinib no alteraba ni aumentaba claramente las funciones efectoras de CART19 a corto plazo. Los estudios in vivo demostraron que la monoterapia con ibrutinib tuvo un efecto antitumoral modesto. Los resultados indicaron que ibrutinib podría mejorar significativamente la función antitumoral de las células CART19 (FIG. 24). Por lo tanto, se realizaron experimentos para determinar el mecanismo de este efecto.

Se ha demostrado que la inhibición de ITK inhibe la polarización Th2 y se inclina hacia un fenotipo Th1 (Dubovsky et al. Blood 122,15(2013):2539-49). En ratones tratados con células CART19 e ibrutinib, no se observó un aumento en las células Th1 en comparación con la monoterapia con células CART19 utilizando este ensayo (FIG. 25A, 25B). Sin embargo, la exposición de ratones a ibrutinib condujo a un aumento de las células CART19 periféricas. No hubo diferencia en el marcador de proliferación Ki67 entre el grupo de tratamiento y el grupo de control (FIG. 25C), por lo que este ensayo no detectó una diferencia en la proliferación. De manera similar, no hubo diferencia en el marcador antiapoptótico Bcl2 o el marcador de apoptosis fosfotidil serina, lo que sugiere que la diferencia en el número de células CART no estaba relacionada con un deterioro de la apoptosis (FIG. 25D). Dado que ibrutinib se ha asociado con linfocitosis periférica en pacientes, se realizaron experimentos para determinar si esto también se encontró en ratones tratados con ibrutinib solo. Una semana después de comenzar con ibrutinib, había más células MCL circulantes y menos células MCL nodales/de órganos en ratones tratados con ibrutinib. Curiosamente, se observó este aumento en el modelo tanto ibrutinib-sensible como -resistente in vivo, ya que también se observó en ratones NSG injertados con la línea celular de leucemia aguda NALM-6 (datos no mostrados).

Con el fin de comprender el papel de ibrutinib en la expansión de células T in vivo, los autores de la invención injertaron a ratones NSG células MCL-RL WT y los trataron con células T luciferasas positivas. Los ratones tratados tanto con CTL019 como con CTL019-ibrutinib mostraron una intensa expansión de células T en comparación con UTD o UTD-ibrutinib (datos no mostrados). Luego, los autores de la invención investigaron la frecuencia de diferentes subconjuntos de células T in vivo y no vieron diferencias en las células T PB 1 semana después de la infusión de células T. (datos no mostrados). Dado que CXCR4 está implicado en la movilización de células B impulsada por ibrutinib en seres humanos, los autores de la invención verificaron la expresión de CXCR4 in vivo en células T PB de ratones tratados con CTL019 o CTL019-ibrutinib: el nivel de CXCR4 fue similar en los 2 grupos (datos no mostrados). Por último, se analizó la expresión del receptor inhibitor/coestimulador en PB de células T de ratones tratados con CART19 y CART19-ibrutinib. No fue evidente diferencia alguna en la expresión de TIM3, LAG3, CD137 o CTLA4; sin embargo, se observó una tendencia a una expresión reducida de PD-1 en ratones tratados con CTL019 y UTD combinados con ibrutinib.

Conclusiones

Las terapias para las neoplasias malignas de células B incluyen inhibidores de moléculas pequeñas de señalización de BCR y terapias basadas en células T dirigidas por CD19. En el contexto del MCL recidivante, el inhibidor de BTK ibrutinib está ahora aprobado por la FDA y engendra altas tasas de respuesta inicial. Desafortunadamente, estas respuestas tienden a ser transitorias y requieren dosis de fármaco más altas que las que se utilizan para la CLL. CART-19 conduce a respuestas duraderas en pacientes con alto riesgo B-ALL, y puede ser asimismo eficaz en otros tumores malignos de células B. Los datos preliminares sugieren que las respuestas de los tumores malignos de células B maduras a CART-19 pueden ser más bajas que las de B-ALL, pero aún no se ha determinado el mecanismo de esta disparidad. Este ejemplo investigó el impacto de añadir ibrutinib a CART19 en el tratamiento del MCL.

Se utilizaron diferentes líneas celulares de MCL con sensibilidades variables a ibrutinib (CI50 en el intervalo de 10 nM a 10 µM) para experimentos in vitro. Estas diferentes líneas celulares se utilizaron para modelar tanto el MCL sensible a ibrutinib como el resistente a ibrutinib. En todas las dosis de ibrutinib, excepto las más altas, la función de las células CART19 no se vio afectada, con la cinética de expansión de las células T intactas, el reconocimiento y destrucción de tumores y la producción de citoquinas. Además, los resultados no revelaron una polarización de T auxiliares tras la exposición a ibrutinib. Este hallazgo puede deberse a una combinación de factores, incluido el uso de un cultivo mixto de células CD4 y CD8, en contraste con el modelo de experimentación solo con CD4 realizado por Dubovksy et al. Blood 122,15(2013):2539-49. Tanto las líneas celulares sensibles a ibrutinib como las resistentes a ibrutinib activaron fuertemente las células CART19 e indujeron la muerte, producción y proliferación de citoquinas. La combinación de CART19 e ibrutinib in vitro condujo al menos a una destrucción aditiva del tumor. Los resultados de este ejemplo demuestran una superioridad de CART19 sobre ibrutinib cuando cada uno se utilizó como monoterapia en dosis y programas de administración clínicamente relevantes (dosis única para CART19, administración continua de ibrutinib).

También se generó un modelo de MCL de xenoinjerto sistémico en este ejemplo, utilizando la línea celular MCL-RL generada en un laboratorio. El tratamiento de estos ratones con diferentes dosis de células T CAR19 alogénicas condujo a un efecto antitumoral dependiente de la dosis. También se observó una respuesta a la dosis similar a CART-19 en la línea celular JEKO-1 resistente a ibrutinib. MCL-RL se trató in vivo con diferentes dosis (p. ej., 0, 25 y 125 mg/kg/día) de ibrutinib, lo que dio lugar a una mediana de supervivencia global, respectivamente, de 70, 81 y 100

días ( $p < 0,001$ ). Una comparación directa in vivo de ibrutinib 125 mg/kg y CART19 mostró un control del tumor significativamente mejorado para los ratones tratados con CART19. Además, los ratones injertados con MCL-RL fueron tratados con vehículo, ibrutinib, CART19 o la combinación de CART19 e ibrutinib (iCART19). A dosis clínicamente relevantes, la monoterapia de MCL con CART19 fue superior a la monoterapia con ibrutinib y la combinación de ibrutinib con CART19 produjo un efecto antitumoral aumentado. En particular, la combinación de iCART19 in vivo condujo a niveles circulantes inicialmente mayores de células CART19, seguido de respuestas tumorales profundas, y las recaídas se retrasaron significativamente cuando ibrutinib se añadió a CART19. La combinación iCART19 dio como resultado un mejor control del tumor, alcanzando el 80% de los ratones la remisión completa y la supervivencia sin enfermedad a largo plazo. Mecánicamente, los ratones tratados con ibrutinib tenían un mayor número de células CART19 circulantes sin cambios en Th1/Th2 o fenotipo de memoria. Por lo tanto, los resultados de esta memoria demuestran que ibrutinib se puede combinar con CART19 de una manera racional y sugieren que las propiedades de cada una de estas terapias pueden compensar las deficiencias de la otra, lo que conduce a un efecto antitumoral a largo plazo mejorado. Los experimentos y los resultados de la combinación de la inhibición de la señalización de BCR con la terapia de células T dirigida anti-CD19 allanan el camino hacia combinaciones racionales de terapias sin resistencia cruzada para las neoplasias de células B

La cinética de la respuesta tumoral y la recaída sugiere que ibrutinib sirve para profundizar la respuesta inicial lograda por CART19 solo o para mejorar la capacidad de inmunovigilancia a largo plazo de las células CART19.

#### 20 Ejemplo 43: Terapia combinada de células T con ibrutinib/CAR19 para cánceres hematológicos

Este Ejemplo describe protocolos ejemplares para la cuantificación de la eficacia de los inhibidores de BTK tal como se describe en esta memoria, p. ej., los compuestos de fórmula (I), en combinación con la terapia de CAR.

25 Las terapias se pueden testar, p. ej., en un sistema de cultivo celular o en un modelo animal. Se encuentran disponibles numerosos sistemas y modelos de este tipo. Por ejemplo, con respecto a la CLL, se puede utilizar un sistema de cultivo celular tal como células CLL primarias o una línea celular establecida tal como Hs 505.T (ATCC CRL-7306). También se conocen modelos animales para CLL, incluido el modelo de ratón transgénico  $E\mu$ -TCL1 descrito en Iacovelli et al., Blood. 5 de marzo de 2015; 125(10):1578-88. Con respecto a los sistemas de cultivo celular para B-ALL, se puede utilizar una línea celular primaria, al igual que una línea celular tal como RCH-ACV. Un modelo animal ejemplar para B-ALL se describe en Perova et al., Sci Transl Med 14 de mayo de 2014, vol. 6, Número 236, pág. 236Ra62. Con respecto al DLBCL, se puede utilizar una línea celular primaria, o una línea establecida como las descritas en Thompson et al. PLoS One. 7 de mayo de 2013;8(5):e62822. Los modelos animales de DLBCL se describen en, p. ej., Donnou et al., Advances in Hematology, Volumen 2012 (2012), Artículo ID 701704, 13 páginas. Con respecto al mieloma múltiple, se puede utilizar una línea celular primaria o una línea descrita en Greenstein et al., Exp Hematol. abril 2003;31(4):271-82. Los modelos animales para mieloma múltiple incluyen el modelo de ratón transgénico  $Vk^*$  MYC descrito en Chesni et al., Blood. 12 de julio de 2012;120(2):376-85.

40 Cuando se utiliza un sistema de cultivo celular, las células que expresan CAR y el inhibidor de BTK se pueden añadir a las células de ensayo juntas o secuencialmente. Se pueden testar múltiples dosis. Las células cancerosas tratadas con vehículo se pueden utilizar como control, al igual que las células cancerosas tratadas con las células que expresan CAR como monoterapia o el inhibidor de BTK como monoterapia. La muerte de las células cancerosas puede ensayarse, p. ej., mediante recuentos de células. Por ejemplo, si las células cancerosas se manipulan para expresar luciferasa de renilla, se puede detectar y cuantificar la bioluminiscencia. La función de CART19 puede ensayarse determinando, p. ej., la proliferación celular, la desgranulación o la producción de citoquinas.

50 Cuando se utiliza un modelo animal, las células que expresan CAR y el inhibidor de BTK se pueden administrar al animal juntos o secuencialmente. Se pueden testar múltiples dosis. Los controles pueden incluir ratones tratados con vehículo, así como ratones tratados con la célula que expresa CAR como monoterapia y ratones tratados con el inhibidor de BTK como monoterapia. La eficacia se puede cuantificar, p. ej., midiendo la supervivencia de los animales o la proliferación de células cancerosas. La proliferación puede ensayarse, p. ej., utilizando bioluminiscencia si las células cancerosas están diseñadas para expresar un marcador bioluminiscente.

#### 55 Ejemplo 44: Inhibición de la actividad enzimática de Btk

60 La actividad inhibitoria de los presentes compuestos contra BTK se evaluó en un ensayo enzimático bioquímico. Se prepararon placas de ensayo en formato de 384 pocillos con diluciones en serie de 8 puntos para los compuestos de ensayo en una estación de trabajo Thermo CatX equipada con un Innovadyne Nanodrop Express. Las placas de ensayo se prepararon mediante la adición de 50 nl por pocillo de solución de compuesto en DMSO al 90%. Las reacciones de quinasa se iniciaron mediante la adición gradual de 4,5  $\mu$ l por pocillo de solución de péptido/ATP (4  $\mu$ M de FITC-Ahx-TSELKKVVALYDYMPMNAND-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 133), 164  $\mu$ M de ATP) en tampón de quinasa (HEPES 50 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, Tween20 al 0,02%, BSA al 0,02%, DMSO al 0,6%, beta-glicerofosfato 10 mM y ortovanadato de sodio 10  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 18 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM) y 4,5  $\mu$ l por pocillo de solución enzimática (6,4 nM de BTK recombinante humana de longitud completa) en tampón quinasa. Las reacciones de quinasa se incubaron a 30°C

5 durante 60 minutos y posteriormente se terminaron mediante la adición de 16 µl por pocillo de solución de parada (HEPES 100 mM pH 7,5, DMSO al 5%, reactivo de recubrimiento Caliper al 0,1%, EDTA 10 mM y Brij35 al 0,015%). Las reacciones de quinasa se analizaron en una estación de trabajo Caliper LC3000 separando péptidos fosforilados y no fosforilados y se calcularon las actividades de quinasa a partir de las cantidades de fosfopéptido recién formado. Los datos de inhibición se calcularon por comparación con las reacciones de control sin enzima (100% de inhibición) y sin inhibidores (0% de inhibición). La concentración de inhibidor requerida para una inhibición del 50% (CI50) se calculó a partir de la inhibición en respuesta a las concentraciones de inhibidor.

Tabla 8 Inhibición de la actividad enzimática de BTK.

Ejemplo	Inhibición de la actividad enzimática de BTK CI <sub>50</sub> [uM]
Ejemplo 1	0,002
Ejemplo 2	0,038
Ejemplo 3	0,001
Ejemplo 4	0,009
Ejemplo 5	0,004
Ejemplo 6	0,001
Ejemplo 7	0,042
Ejemplo 8	0,002
Ejemplo 9	0,01
Ejemplo 10	0,004
Ejemplo 11	0,01
Ejemplo 12	0,012
Ejemplo 13	0,007
Ejemplo 14	0,001
Ejemplo 15	0,001
Ejemplo 16	0,015
Ejemplo 17	0,005
Ejemplo 18	0,001
Ejemplo 19	0,016
Ejemplo 20	0,005
Ejemplo 21	0,002
Ejemplo 22	<0,0001
Ejemplo 23	0,001
Ejemplo 24	0,0005
Ejemplo 25	0,001
Ejemplo 26	0,0004
Ejemplo 27	0,003
Ejemplo 28	0,001
Ejemplo 29	0,004
Ejemplo 30	0,006
Ejemplo 31	0,002
Ejemplo 32	0,004
Ejemplo 33	0,001
Ejemplo 34	0,002
Ejemplo 35	0,002

Ejemplo 36	0,017
Ejemplo 37	0,032
Ejemplo 38	0,002
Ejemplo 39	0,001
Ejemplo 40	0,002

Ejemplo 45: Inhibición de la actividad de BTK en sangre

5 La actividad inhibidora de los presentes compuestos en sangre humana se evaluó en el siguiente ensayo de activación de células B in vitro. Se extrajo sangre completa con el consentimiento por escrito de voluntarios sanos mediante punción venosa en viales de heparina sódica. Luego, 90 µl de sangre se mezclaron en placas de microtitulación con fondo en U de 96 pocillos (El Thermo Scientific # 163320) con 0,5 µl de diluciones en serie de compuestos de ensayo en DMSO. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora. A continuación, se estimularon las células B añadiendo 10 µl de una dilución que contenía anticuerpo IgM antihumano de ratón (clon CW11) e IL-4 humana recombinante (Immunotools) hasta concentraciones finales de 30 µg/ml y 5 ng/ml, respectivamente. Los cultivos se incubaron durante 20 horas y la activación de las células B se midió mediante citometría de flujo después de teñir el subconjunto de células B con anti-CD19 humano marcado con APC (Beckton-Dickinson) y con el marcador de activación CD69 (anti-humano marcado con PE). CD69, Beckton-Dickinson). Todos los procedimientos de tinción se realizaron a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad en placas de microtitulación con fondo en V de 96 pocillos profundos (Eppendorf) con solución de lisis FACS (Beckton-Dickinson). Los datos citométricos se adquirieron en un Citómetro CyAn (Beckman Coulter) y la subpoblación de linfocitos fue ligada de acuerdo con el tamaño y la granularidad, luego se analizó adicionalmente para determinar la expresión de CD19 y el marcador de activación. Los datos para la inhibición de la activación de las células B se calcularon a partir del porcentaje de células teñidas positivamente para marcadores de activación dentro de la población CD19 positiva. Los datos de inhibición se calcularon por comparación con cultivos de control sin anti-IgM/IL-4 (100% de inhibición) y sin inhibidores (0% de inhibición). La concentración de inhibidor requerida para una inhibición del 50% (CI<sub>50</sub>) se calculó a partir de la inhibición en respuesta a las concentraciones de inhibidor.

Tabla 9 Inhibición de la actividad de BTK en sangre.

Ejemplo	Inhibición de la actividad de BTK en sangre CI <sub>50</sub> [µM]
1	0,112
2	1,111
3	0,124
4	0,376
5	0,201
6	0,023
7	0,983
8	0,048
9	0,240
10	0,161
11	0,323
12	0,459
13	0,105
14	0,028
15	0,029
16	0,558
17	0,246
18	0,419
19	0,136
20	0,330
21	0,090

ES 2 876 974 T3

22	0,057
23	0,057
24	0,032
25	0,065
26	0,051
27	0,076
28	0,033
29	0,134
30	0,222
31	0,025
32	0,055
33	0,050
34	0,208
35	0,072
36	0,354
37	0,968
38	0,070
39	0,176
40	0,080

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> NOVARTIS AG  
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA  
5
- <120> COMBINACIÓN DE TERAPIA CON RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO Y DERIVADOS DE AMINO  
PIRIMIDINA
- <130> N2067-7092WO  
10
- <140>  
<141>
- <150> 62/144.188  
15 <151> 07-04-2015
- <160> 142
- <170> PatentIn versión 3.5  
20
- <210> 1  
<211> 242  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
- 30 <400> 1

ES 2 876 974 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu  
 115 120 125  
 Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 130 135 140  
 Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser  
 165 170 175  
 Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser  
 180 185 190  
 Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr  
 195 200 205  
 Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly  
 210 215 220  
 Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 225 230 235 240  
 Ser Ser

<210> 2

<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 2

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

ES 2 876 974 T3

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu  
115 120 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg  
145 150 155 160

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser  
165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser  
180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr  
195 200 205

Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly  
210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
225 230 235 240

Ser Ser

<210> 3

<211> 242

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 3

ES 2 876 974 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
20 25 30  
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala  
130 135 140

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala  
145 150 155 160

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
165 170 175

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly  
180 185 190

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu  
195 200 205

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln  
210 215 220

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
225 230 235 240

Ile Lys

<210> 4

<211> 242

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 4

ES 2 876 974 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala  
130 135 140

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala  
145 150 155 160

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
165 170 175

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly  
180 185 190

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu  
195 200 205

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln  
210 215 220

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
225 230 235 240

Ile Lys

<210> 5

<211> 247

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 5

ES 2 876 974 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 115 120 125  
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr  
 130 135 140  
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 145 150 155 160  
 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 165 170 175  
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser  
 180 185 190

ES 2 876 974 T3

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys  
195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
245

<210> 6

<211> 247

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 6

ES 2 876 974 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 115 120 125  
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr  
 130 135 140

ES 2 876 974 T3

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 145 150 155 160

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 165 170 175

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser  
 180 185 190

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys  
 195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210> 7

<211> 247

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 7

ES 2 876 974 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
 20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

ES 2 876 974 T3

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met  
 130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
 145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr  
 165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser  
 180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 195 200 205

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
 225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 245

<210> 8

<211> 247

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 8

ES 2 876 974 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1                                5                                10                                15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
                              20                                25                                30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                              35                                40                                45

ES 2 876 974 T3

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met  
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr  
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser  
180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
195 200 205

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
245

<210> 9

<211> 247

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

5 <400> 9

ES 2 876 974 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 115 120 125

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr  
 130 135 140

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 145 150 155 160

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 165 170 175

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser  
 180 185 190

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys  
 195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 210 215 220

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210> 10

<211> 247

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 10

ES 2 876 974 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met  
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr  
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser  
180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
195 200 205

ES 2 876 974 T3

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
210 215 220

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
245

<210> 11

<211> 242

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 11

ES 2 876 974 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu  
 115 120 125  
 Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys  
 130 135 140  
 Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg  
 145 150 155 160

ES 2 876 974 T3

Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser  
165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser  
180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr  
195 200 205

Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly  
210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
225 230 235 240

Ser Ser

<210> 12

<211> 242

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

ES 2 876 974 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
 20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

ES 2 876 974 T3

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala  
 130 135 140

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala  
 145 150 155 160

Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 165 170 175

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly  
 180 185 190

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu  
 195 200 205

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln  
 210 215 220

Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu  
 225 230 235 240

Ile Lys

<210> 13

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 13

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro  
 20

15 <210> 14

<211> 45

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
 1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp  
 35 40 45

10

<210> 15  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

20 <400> 15

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys  
 20

<210> 16  
 <211> 42

25 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente  
 30 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16

ES 2 876 974 T3

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
 20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 35 40

<210> 17

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 17

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly  
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
 50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
 85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 100 105 110

15 <210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
 5  
 <400> 18  
**Gly Gly Gly Gly Ser**  
**1 5**

<210> 19  
 10 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 15 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
 <400> 19  
**Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser**  
**1 5 10**

20  
 <210> 20  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

30 <400> 20  
**Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser**  
**1 5 10 15**

<210> 21  
 <211> 16  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 40 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

ES 2 876 974 T3

<400> 21

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 22

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 22

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

15

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

25 <400> 23

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 24

<211> 12

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

35 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 24

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

40 <210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 25

10 **Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn**  
**1 5 10**

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

20

<400> 26

**His Thr Ser Arg Leu His Ser**  
**1 5**

<210> 27

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 27

35 **Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr**  
**1 5**

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40



ES 2 876 974 T3

<400> 31

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1                   5                   10                   15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
                  20                   25                   30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
          35                   40                   45

ES 2 876 974 T3

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 130 135 140

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr  
 145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser  
 195 200 205

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys  
 210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
 260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
 275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
 290 295 300

ES 2 876 974 T3

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg  
325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln  
340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu  
355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
370 375 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485

<210> 32

<211> 486

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"



ES 2 876 974 T3

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 130 135 140

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr  
 145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser  
 195 200 205

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys  
 210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro



<210> 33

<211> 486

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 33

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
65 70 75 80

Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met  
145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr  
180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser  
195 200 205

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
210 215 220

ES 2 876 974 T3

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
225 230 235 240

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg  
325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln  
340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu  
355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
370 375 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485

<210> 34

<211> 486

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 34

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
65 70 75 80

Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met  
145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr  
180 185 190

ES 2 876 974 T3

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser  
 195 200 205

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 210 215 220

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 225 230 235 240

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
 245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
 260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
 275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
 290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
 305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg  
 325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln  
 340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu  
 355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
 370 375 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
 385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
 405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
 420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
 435 440 445

ES 2 876 974 T3

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485

<210> 35

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 35

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
 145 150 155 160

ES 2 876 974 T3

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser  
 165 170 175

Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
 180 185 190

Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser  
 195 200 205

Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
 210 215 220

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp  
 245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro  
 260 265 270

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu  
 275 280 285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His  
 290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu  
 305 310 315 320

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr  
 325 330 335

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe  
 340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg  
 355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser  
 370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr  
 385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys

ES 2 876 974 T3

405

410

415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn  
 420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu  
 435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly  
 450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr  
 465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 485 490

<210> 36

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 36

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

ES 2 876 974 T3

	115		120		125											
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
	130					135						140				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	
145					150					155					160	
Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	
				165					170					175		
Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	
			180					185					190			
Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Gln	
		195					200					205				
Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	
	210					215					220					
Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	
225					230					235					240	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	
				245					250					255		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	
			260					265					270			
Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	
		275					280					285				
Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	
	290					295					300					
Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	
305					310					315					320	
Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	
				325					330					335		
Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	
			340				345						350			
Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	
		355					360					365				
									260							

ES 2 876 974 T3

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser  
 370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr  
 385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys  
 405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn  
 420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu  
 435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly  
 450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr  
 465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 485 490

<210> 37

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 37

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
65 70 75 80

ES 2 876 974 T3

Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
145 150 155 160

Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
165 170 175

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys  
180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
195 200 205

Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser  
210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
225 230 235 240

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro  
245 250 255

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro  
260 265 270

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu  
275 280 285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His  
290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu  
305 310 315 320

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr  
325 330 335

ES 2 876 974 T3

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe  
 340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg  
 355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser  
 370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr  
 385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys  
 405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn  
 420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu  
 435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly  
 450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr  
 465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 485 490

<210> 38

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 38

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
35 40 45

ES 2 876 974 T3

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
65 70 75 80

Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
145 150 155 160

Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
165 170 175

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys  
180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
195 200 205

Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser  
210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
225 230 235 240

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro  
245 250 255

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro  
260 265 270

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu  
275 280 285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His  
290 295 300

ES 2 876 974 T3

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu  
305 310 315 320

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr  
325 330 335

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe  
340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg  
355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser  
370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr  
385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys  
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn  
420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu  
435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly  
450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr  
465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485 490

<210> 39

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 876 974 T3

<400> 39

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1                   5                                   10                                   15

ES 2 876 974 T3

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
 145 150 155 160

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser  
 165 170 175

Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
 180 185 190

Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn  
 195 200 205

Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
 210 215 220

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp  
 245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro

ES 2 876 974 T3

	260		265		270										
Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu
		275					280					285			
Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His
	290					295					300				
Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu
305					310					315					320
Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr
				325					330					335	
Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe
			340						345				350		
Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg
		355					360					365			
Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser
	370					375					380				
Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr
385					390					395					400
Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys
				405						410				415	
Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn
			420					425						430	
Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu
		435					440					445			
Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly
	450					455					460				
His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr
465					470					475					480
Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg					
				485					490						

<210> 40

<211> 491

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 40

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
 145 150 155 160

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser  
 165 170 175

Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
 180 185 190

Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn  
 195 200 205

Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
 210 215 220

ES 2 876 974 T3

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp  
 245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro  
 260 265 270

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu  
 275 280 285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His  
 290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu  
 305 310 315 320

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr  
 325 330 335

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe  
 340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg  
 355 360 365

Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser  
 370 375 380

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr  
 385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys  
 405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn  
 420 425 430

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu  
 435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly  
 450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr  
 465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485 490

<210> 41

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 41

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
 20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
 35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
 85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 145 150 155 160

Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
 165 170 175

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys  
 180 185 190

ES 2 876 974 T3

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 195 200 205  
 Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser  
 210 215 220  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 225 230 235 240  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro  
 245 250 255  
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro  
 260 265 270  
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu  
 275 280 285  
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His  
 290 295 300  
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr  
 325 330 335  
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe  
 340 345 350  
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg  
 355 360 365  
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser  
 370 375 380  
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr  
 385 390 395 400  
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys  
 405 410 415  
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn  
 420 425 430  
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu  
 435 440 445

ES 2 876 974 T3

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly  
450 455 460

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr  
465 470 475 480

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485 490

<210> 42

<211> 486

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 42

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 130 135 140

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr  
 145 150 155 160

ES 2 876 974 T3

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 165 170 175  
 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 180 185 190  
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser  
 195 200 205  
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys  
 210 215 220  
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 225 230 235 240  
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 245 250 255  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
 260 265 270  
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
 275 280 285  
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
 290 295 300  
 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
 305 310 315 320  
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg  
 325 330 335  
 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln  
 340 345 350  
 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu  
 355 360 365  
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
 370 375 380  
 Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
 385 390 395 400  
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp

ES 2 876 974 T3

405

410

415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
 420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
 435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
 450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
 465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 485

<210> 43

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
 50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
 85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 100 105 110

10

<210> 44

ES 2 876 974 T3

<211> 336

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 44

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc	60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc	120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat	180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctctca gtacagccac caaggacacc	300
tacgacgcc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc	336

<210> 45

<211> 230

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 45

ES 2 876 974 T3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 35 40 45  
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 50 55 60  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 85 90 95  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 115 120 125  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 165 170 175  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 195 200 205  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Ser Leu Gly Lys Met  
 225 230

ES 2 876 974 T3

<211> 690  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 46  
gagagcaagt acggcctcc ctgccccct tgcctgccc cggagttcct gggcggaccc 60  
agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag 120  
gtgacctgtg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac 180  
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240  
acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300  
tacaagtgta aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360  
gccaagggcc agcctcggga gccccaggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg 420  
accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggtt tctaccccag cgacatcgcc 480  
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 540  
gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 600  
gagggcaacg tcttttagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag 660  
10 aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 690

<210> 47  
<211> 282  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 47

ES 2 876 974 T3

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala  
1 5 10 15

Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala  
20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys  
35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro  
50 55 60

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln  
65 70 75 80

Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly  
85 90 95

Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val  
100 105 110

Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly  
115 120 125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn  
130 135 140

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro  
145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys  
165 170 175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser  
180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu  
195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro  
210 215 220

Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser  
225 230 235 240

ES 2 876 974 T3

Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr  
 245 250 255

Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg  
 260 265 270

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His  
 275 280

<210> 48

<211> 847

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 48

```

aggtggcccg aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gccccaggca      60
gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc      120
ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagagggg gaccaagacc      180
cctgaatgtc catcccatac ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag      240
gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag      300
gatgcccatt tgacttggga ggttgccgga aaggtacca cagggggggg tgaggaaggg      360
ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac cttccgaga      420
tccctgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcctag cctgccccca      480
cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccaggcac cagttaagct tagcctgaat      540
ctgctcgcca gtagtgatcc cccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc      600
tttagcccgc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc      660
ggcttcgctc cagcccggcc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg ggcctggagt      720
gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttgtgtcc      780
catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggaggtttc ctacgtgact      840
gaccatt                                           847
    
```

15 <210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10

10 <210> 50

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 50

20 ggtggcggag gttctggagg tggaggtcc 30

<210> 51

<211> 48

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

30

<400> 51

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro  
 1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr  
 20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro  
 35 40 45

<210> 52

35 <211> 123

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 52

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60

gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

10 <210> 53

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>

20 <221> característica\_miscelánea

<222> (1) . (30)

<223> /nota="Esta secuencia puede englobar 1-6 unidades de repetición de 'Gly Gly Gly Gly Ser'"

<220>

25 <221> fuente

<223> /note="Véase la Descripción presentada por una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 53

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
1 5 10 15

30 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
20 25 30

<210> 54

<211> 63

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 876 974 T3

<221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 54  
 atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga 60  
 5 ccc 63

<210> 55  
 <211> 135  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"  
 15

<400> 55  
 accacgacgc cagcgcgcgc accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg 60  
 tccttgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120  
 gacttcgcct gtgat 135

<210> 56  
 20 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 25 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 56  
 atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc 60  
 accctttact gc 72  
 30

<210> 57  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35

<220>  
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 57

Tyr Asn Ser Ala Leu  
1 5

5

<210> 58

<211> 486

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15

<400> 58

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

ES 2 876 974 T3

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg  
325 330 335

ES 2 876 974 T3

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln  
340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu  
355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
370 375 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485

<210> 59

<211> 242

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 59

ES 2 876 974 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu  
 115 120 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys  
 130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg  
 145 150 155 160

Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser  
 165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile  
 180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln  
 195 200 205

Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly  
 210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val  
 225 230 235 240

Ser Ser

<210> 60  
 <211> 126  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético  
 10  
 <400> 60  
 aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60  
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120  
 gaactg 126  
  
 <210> 61  
 15 <211> 813  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético  
  
 <400> 61

ES 2 876 974 T3

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60  
 cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actottagcc tttcaccogg tgagcgcgca 120  
 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180  
 cccggacagg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggtccattc tggaatccct 240  
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag 300  
 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggggaaca ccctgcccta cacctttgga 360  
 cagggcacca agctcgagat taaagggtgga ggtggcagcg gaggagggtg gtccggcggg 420  
 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggctc ttgtgaagcc atcagaaact 480  
 ctttcaactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggg gtcttggatc 540  
 agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600  
 tactactctt catccctcaa gtcacgcgctc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660  
 gtgtcaactga aactgtcacc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720  
 cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacaggggtac tctggtcacc 780  
 gtgtccagcc accacatca tcacatcac cat 813

<210> 62

<211> 813

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 62

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60  
 cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcaccogg tgagcgcgca 120

ES 2 876 974 T3

accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180  
cccggacagg ctccctcgct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240  
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300  
ccagaggact tgcgtgtcta tttctgtcag caaggaaca ccctgcccta cacctttgga 360  
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggt 420  
ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480  
ctttcactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttgatc 540  
agacagccac cggggaagg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600  
tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660  
gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720  
cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780  
gtgtccagcc accacatca tcacatcac cat 813

<210> 63

<211> 813

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 63

ES 2 876 974 T3

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc	60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc	120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag	180
cctcccggaa agggactgga gtggatcggg gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat	240
tcatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc	300
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac	360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca	420
tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcggtgagg gtggctccga aatcgtgatg	480
accagagacc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgcgg	540
gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acagggccct	600
aggtttotta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg	660
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc	720
gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt	780
gagatcaaac atcaccacca tcatcacat cac	813

<210> 64

5 <211> 813

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 64

ES 2 876 974 T3

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60  
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120  
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180  
cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240  
caatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300  
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360  
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420  
tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480  
accagagacc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgtcgg 540  
gcatcacaag atatctcaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggcccct 600  
aggcttctta tctaccacac ctctcgcctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg 660  
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720  
gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780  
gagatcaaac atcaccacca tcatcaccat cac 813

<210> 65

<211> 828

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 65

atggccctcc cagtgaccgc tctgctgctg cctctcgcac ttattctcca tgccgctcgg 60  
cctgagatcg tcatgaccca aagccccgct accctgtccc tgtcaccocgg cgagagggca 120  
accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180  
ccagggcagg ctccctcgcct gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggatcccc 240  
gccagatfff ccgggagcgg gtctggaacc gactacaccc tcaccatctc ttctctgcag 300

ES 2 876 974 T3

cccgaggatt tgcgctcta tttctgccag caggggaata ctctgccgta caccttcggt 360  
 caaggtacca agctggaaat caagggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420  
 ggtggctccg gaggaggagg ttccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480  
 aagccatcag aaaccctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540  
 ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggcttg aatggattgg ggtgatttgg 600  
 ggatcagaga ctacttacta ctcttcatca cttaagtcac gggtcacat cagcaaagat 660  
 aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcatctgtga ccgccgctga caccgccgtg 720  
 tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggctttatg ctatggacta ctggggacag 780  
 gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

<210> 66

<211> 828

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 66

atggccctcc cagtgaccgc tctgctgctg cctctgcac ttcttctcca tgccgctcgg 60  
 cctgagatcg tcatgaccca aagccccgct accctgtccc tgtcaccgg cgagagggca 120  
 accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180  
 ccagggcagg ctctctgcct gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggtatcccc 240  
 gccagatddd ccgggagcgg gtctggaacc gactacacc tcaccatctc ttctctgcag 300  
 cccgaggatt tgcgctcta tttctgccag caggggaata ctctgccgta caccttcggt 360  
 caaggtacca agctggaaat caagggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420  
 ggtggctccg gaggaggagg ttccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480  
 aagccatcag aaaccctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540  
 ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggcttg aatggattgg ggtgatttgg 600  
 ggatcagaga ctacttacta ccagtcatca cttaagtcac gggtcacat cagcaaagat 660  
 aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcatctgtga ccgccgctga caccgccgtg 720  
 tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggctttatg ctatggacta ctggggacag 780  
 gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

ES 2 876 974 T3

<210> 67  
 <211> 828  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

10

<400> 67  
 atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg 60  
 ccccaagtcc agctgcaaga gtcaggaccg ggactggtga agccgtctga gactctctca 120  
 ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcaa 180  
 cctcccggga aagggcttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac 240  
 tcatcttccc tgaagtccag ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc 300  
 cttaaagctgt catctgtgac cgctgctgac accgccgtgt attactgcgc caagcactac 360  
 tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc 420  
 agcggcgggtg gagggctctgg aggtggagga tccgggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg 480  
 agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcaccogg cgagagagca 540  
 accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcaaaaa 600  
 ccggggcagg cccctcgcct cctgatctac catacctcac gccttctctc tgggatcccc 660  
 gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag 720  
 ccagaagatt tcgcagtgta tttctgccag cagggcaata cccttcctta caccttcggt 780  
 cagggaacca agctcgaaat caagcaccat caccatcacc accaccat 828

<210> 68  
 <211> 828  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

20

<400> 68

ES 2 876 974 T3

atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg 60  
 cccaagtcc agctgcaaga gtcaggacct ggactggtga agccgtctga gactctctca 120  
 ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcca 180  
 cctcccggga aagggcttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac 240  
 cagtcttccc tgaagtccag ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc 300  
 cttaaagctgt catctgtgac cgctgctgac accgccgtgt attactgcgc caagcactac 360  
 tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc 420  
 agcggcggtg gagggctctgg aggtggagga tccgggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg 480  
 agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcaccgg cgagagagca 540  
 accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcaaaaa 600  
 ccggggcagg cccctcgcct cctgatctac catacctcac gccttcactc tggatatccc 660  
 gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag 720  
 ccagaagatt tcgcagtgta tttctgccag cagggcaata cccttcctta caccttcggt 780  
 cagggaaacca agctcgaaat caagcaccat caccatcctc atcaccac 828

<210> 69

5 <211> 828

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 69

ES 2 876 974 T3

atggccctcc cagtgaccgc tctgctgctg cctctcgcac ttcttctcca tgccgctcgg 60  
 cctgagatcg tcatgaccca aagccccgct accctgtccc tgtcaccggy cgagagggca 120  
 accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180  
 ccagggcagg ctccctgcct gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggtatcccc 240  
 gccagatfff ccgggagcgg gtctggaacc gactacaccc tcaccatctc ttctctgcag 300  
 cccgaggatt tcgccgtcta tttctgccag caggggaata ctctgccgta caccttcggt 360  
 caaggtacca agctggaaat caagggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420  
 ggtggctccg gaggaggagg ttcccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480  
 aagccatcag aaaccctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540  
 ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggcttg aatggattgg ggtgatttgg 600  
 ggatcagaga ctacttacta caattcatca cttaagtac gggtcacat cagcaaagat 660  
 aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcatctgtga ccgccgctga caccgccgtg 720  
 tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggctttatg ctatggacta ctggggacag 780  
 gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

<210> 70

<211> 828

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 70

ES 2 876 974 T3

atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg 60  
 ccccaagtcc agctgcaaga gtcaggaccc ggactggtga agccgtctga gactctctca 120  
 ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcaa 180  
 cctcccggga aagggcttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac 240  
 aactcttccc tgaagtccag ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc 300  
 cttaaagctgt catctgtgac cgctgctgac accgccgtgt attactgcgc caagcactac 360  
 tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc 420  
 agcggcggtg gagggctctgg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg 480  
 agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcaccggg cgagagagca 540  
 accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcaaaaa 600  
 ccggggcagg cccctcgct cctgatctac catacctcac gccttctc tggtatcccc 660  
 gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag 720  
 ccagaagatt tcgcagtgta tttctgccag cagggcaata cccttcctta caccttcggt 780  
 cagggaaacca agctcgaaat caagcaccat caccatcatc accaccat 828

<210> 71

<211> 813

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 71

ES 2 876 974 T3

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60  
cccgaattg tgatgacca gtcaccgcg cc actcttagcc tttcaccgg tgagcgcgca 120  
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180  
cccggacagg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240  
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacce tcaactatcag ctcaactgcag 300  
ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggaaca ccctgccta cacctttgga 360  
cagggcacca agctcgagat taaagggtga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcgg 420  
ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggctc ttgtgaagcc atcagaaact 480  
ctttcaactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggatc 540  
agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600  
tactacaatt catccctcaa gtcacgcgct accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660  
gtgtcaactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720  
cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780  
gtgtccagcc accacatca tcacatcac cat 813

<210> 72

5 <211> 813

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 72

ES 2 876 974 T3

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60  
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120  
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180  
cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240  
aactcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300  
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360  
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420  
tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcggtgag gtggctccga aatcgtgatg 480  
accagagacc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgtcgg 540  
gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggcccct 600  
aggcttctta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg 660  
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720  
gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780  
gagatcaaac atcaccacca tcatcaccat cac 813

<210> 73

<211> 271

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 73

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

ES 2 876 974 T3

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30  
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45  
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80  
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110  
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 130 135 140  
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 165 170 175  
 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 180 185 190  
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser  
 195 200 205  
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys  
 210 215 220  
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
 225 230 235 240  
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 245 250 255  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His  
 260 265 270

<210> 74

<211> 271

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 74

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 130 135 140

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr  
 145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser  
 195 200 205

ES 2 876 974 T3

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys  
210 215 220

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys  
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His  
260 265 270

<210> 75

<211> 271

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 75

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
 20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
 35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
 85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140

ES 2 876 974 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met  
145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr  
180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser  
195 200 205

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
210 215 220

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
225 230 235 240

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His His His His  
260 265 270

<210> 76

<211> 271

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 76

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
65 70 75 80

ES 2 876 974 T3

Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met  
145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr  
180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser  
195 200 205

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
210 215 220

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
225 230 235 240

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His His His His  
260 265 270

<210> 77

<211> 276

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 876 974 T3

<400> 77

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1                   5                           10                           15

ES 2 876 974 T3

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30  
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45  
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80  
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110  
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser  
 165 170 175  
 Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
 180 185 190  
 Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser  
 195 200 205  
 Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
 210 215 220  
 Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
 225 230 235 240  
 Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp  
 245 250 255  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His  
 260 265 270

His His His His  
275

<210> 78

<211> 276

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 78

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30  
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45  
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80  
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110  
 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser  
 165 170 175  
 Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
 180 185 190

ES 2 876 974 T3

Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln  
195 200 205

Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
210 215 220

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp  
245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His  
260 265 270

His His His His  
275

<210> 79

<211> 276

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 79

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
 20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
 35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
 85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
 100 105 110

ES 2 876 974 T3

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
145 150 155 160

Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
165 170 175

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys  
180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
195 200 205

Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser  
210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
225 230 235 240

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro  
245 250 255

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His  
260 265 270

His His His His  
275

<210> 80

<211> 276

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 80

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
20 25 30

ES 2 876 974 T3

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
 35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
 85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 145 150 155 160

Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
 165 170 175

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys  
 180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 195 200 205

Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser  
 210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 225 230 235 240

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro  
 245 250 255

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His  
 260 265 270

His His His His

275

<210> 81

<211> 276

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 81

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
 20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
 35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val  
 145 150 155 160

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser  
 165 170 175

Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly  
 180 185 190

Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn

ES 2 876 974 T3

195

200

205

Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn  
210 215 220

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp  
245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His  
260 265 270

His His His His  
275

<210> 82

<211> 276

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 82

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
 20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
 35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
 85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met

ES 2 876 974 T3

115	120	125																
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly			
130						135					140							
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly			
145					150					155					160			
Ser	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			
				165					170					175				
Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys			
			180					185					190					
Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu			
		195					200					205						
Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser			
	210					215					220							
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln			
225					230					235					240			
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro			
				245					250					255				
Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	His	His	His	His			
			260					265					270					
His	His	His	His															
			275															

<210> 83

<211> 271

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 83

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu  
20 25 30

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln

ES 2 876 974 T3

	35		40		45												
Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala		
	50					55					60						
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Ile	Pro		
	65				70					75					80		
Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile		
				85					90					95			
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly		
			100					105					110				
Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
		115					120					125					
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln		
	130					135					140						
Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr		
	145				150					155					160		
Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly		
				165					170					175			
Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly		
			180					185					190				
Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser		
		195					200					205					
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Lys		
	210					215					220						
Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys		
	225				230					235					240		
His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly		
				245					250					255			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	His										
			260					265						270			

<210> 84

<211> 271

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 84

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu  
 20 25 30

Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val  
 35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80

Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys  
 85 90 95

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met  
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met  
 145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr  
 165 170 175

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr  
 180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser  
 195 200 205

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 210 215 220

ES 2 876 974 T3

Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
225 230 235 240

Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His His His His  
260 265 270

<210> 85

<211> 1458

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 85

ES 2 876 974 T3

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60  
 cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcaccggg tgagcgcgca 120  
 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180  
 cccggacagg ctccctcgct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240  
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag 300  
 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggggaaca ccctgcccta cacctttgga 360  
 cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420  
 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaaact 480  
 ctttcaactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggg gtcttggatc 540  
 agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600  
 tactactctt catccctcaa gtcacgcgctc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660  
 gtgtcaactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720  
 cattaactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtag tctggtcacc 780  
 gtgtccagca ccaactaccc agcaccgagg ccaccaccc cggctcctac catcgcctcc 840  
 cagcctctgt ccctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcgag ctggtggggc cgtgcatacc 900  
 cggggctctt acttcgcctg cgatatctac atttggggccc ctctggctgg tacttgcggg 960  
 gtccctgctgc tttcaactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020  
 tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080  
 tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140  
 agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200  
 ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260  
 gggaaagccgc gcagaaagaa tccccaaagag ggctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320  
 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac 1380  
 gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440  
 caggccctgc cgcctcgg 1458

<210> 86

5 <211> 1458

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

ES 2 876 974 T3

<400> 86

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgaattg tgatgacctca gtcacccgcc actccttagcc tttcaccggg tgagcgcgca	120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
cccggacagg ctccctcgctt tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag	300
ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caagggaaaca ccctgcccta cacctttgga	360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg	420
ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact	480
ctttcactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggg gtcttggatc	540
agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact	600
tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag	660
gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgctgtaag	720
cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtag tctggtcacc	780
gtgtccagca ccaactaccc agcaccgagg ccacccaccc cggctcctac catcgcctcc	840
cagcctctgt ccctgcgtcc ggaggcatgt agacccgcag ctggtggggc cgtgcatacc	900
cggggctctg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgccggg	960
gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg	1020
tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt	1080
tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc	1140
agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt	1200
ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc	1260
gggaagccgc gcagaaagaa tccccaaagag ggcctgtaca acgagctcca aaaggataag	1320
atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaagccac	1380
gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg	1440
caggccctgc cgctcgg	1458

5

<210> 87

<211> 1458

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

ES 2 876 974 T3

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

5 <400> 87

```

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg cactggctc tgctgcttca cgccgctcgc      60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc      120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag      180
cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat      240
tcatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc      300
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac      360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca      420
tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcggtggag gtggctccga aatcgtgatg      480
accagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgcgg      540
gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggcccct      600
aggcttctta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg      660
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc      720
gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt      780
gagatcaaaa cactactcc cgctccaagg ccaccaccc ctgccccgac catcgcctct      840
cagccgcttt ccctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc      900
cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg      960
gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg     1020
tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt     1080
tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc     1140
agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt     1200
ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggacc agaaatgggc     1260
gggaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggcctgtaca acgagctcca aaaggataag     1320
atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac     1380
gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg     1440
caggccctgc cgcctcgg
    
```

<210> 88

10 <211> 1458

<212> ADN

ES 2 876 974 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 88

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc	60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctgggga agccatctga gactctgtcc	120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag	180
cctcccggaa agggactgga gtggatcggg gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat	240
caatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc	300
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac	360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca	420
tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg	480
accagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgcg	540
gcatcacaag atatctcaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggcccct	600
aggcttctta tctaccacac ctctcgcctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg	660
tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc	720
gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt	780
gagatcaaaa ccactactcc cgctccaagg ccacccaccc ctgccccgac catcgcctct	840
cagccgcttt ccctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc	900
cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcg	960
gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg	1020
tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt	1080
tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc	1140
agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt	1200
ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaatgggc	1260
gggaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaagataag	1320
atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac	1380
gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcatatg	1440
caggccctgc cgcctcgg	1458

10

<210> 89

<211> 1473

ES 2 876 974 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 89

atggccctcc	ctgtcaccgc	cctgctgctt	ccgctggctc	ttctgctcca	cgccgctcgg	60
cccgaaattg	tgatgacca	gtcaccgcc	actcttagcc	ttcaccgg	tgagcgcgca	120
accctgtctt	gcagagcctc	ccaagacatc	tcaaaatacc	ttaattggta	tcaacagaag	180
cccggacagg	ctcctcgcct	tctgatctac	cacaccagcc	ggctccattc	tggaatccct	240
gccaggttca	gcggtagcgg	atctgggacc	gactacaccc	tcactatcag	ctcactgcag	300
ccagaggact	tcgctgtcta	tttctgtcag	caaggaaca	ccctgcccta	cacctttgga	360
cagggcacca	agctcgagat	taaaggtgga	ggtggcagcg	gaggaggtgg	gtccggcggg	420
ggaggaagcg	gcgaggcgg	gagccaggtc	caactccaag	aaagcggacc	gggtcttctg	480
aagccatcag	aaactctttc	actgacttgt	actgtgagcg	gagtgtctct	ccccgattac	540
ggggtgtctt	ggatcagaca	gccaccgggg	aaggtctgg	aatggattgg	agtgatttgg	600
ggctctgaga	ctacttacta	ctcttcatcc	ctcaagtcac	gcgtcaccat	ctcaaaggac	660
aactctaaga	atcaggtgtc	actgaaactg	tcatctgtga	ccgcagccga	caccgccgtg	720
tactattgcg	ctaagcatta	ctattatggc	gggagctacg	caatggatta	ctggggacag	780
ggtactctgg	tcaccgtgtc	cagcaccact	acccagcac	cgaggccacc	caccccggt	840
cctaccatcg	cctcccagcc	tctgtccctg	cgccggagg	catgtagacc	cgcagctggt	900
ggggccgtgc	ataccgggg	tcttgacttc	gcctgcgata	tctacatttg	ggcccctctg	960
gctggtactt	gcggggtcct	gctgctttca	ctcgtgatca	ctctttactg	taagcgcgg	1020
cggaagaagc	tgctgtacat	ctttaagcaa	cccttcatga	ggcctgtgca	gactactcaa	1080
gaggaggacg	gctgttcatg	ccggttccca	gaggaggagg	aaggcggctg	cgaactgcgc	1140
gtgaaattca	gccgcagcgc	agatgctcca	gcctacaagc	aggggcagaa	ccagctctac	1200
aacgaactca	atcttgggtcg	gagagaggag	tacgacgtgc	tggacaagcg	gagaggacgg	1260
gaccagaaa	tgggcgggaa	gccgcgcaga	aagaatcccc	aagaggcct	gtacaacgag	1320
ctccaaaagg	ataagatggc	agaagcctat	agcgagattg	gtatgaaagg	ggaacgcaga	1380
agaggcaaag	gccacgacgg	actgtaccag	ggactcagca	ccgccaccaa	ggacacctat	1440
gacgctcttc	acatgcaggc	cctgccgcct	cgg			1473

10

ES 2 876 974 T3

<210> 90  
 <211> 1473  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

10

<400> 90  
 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60  
 cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actccttagcc tttcaccggg tgagcgcgca 120  
 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180  
 cccggacagg ctccctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240  
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300  
 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga 360  
 cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420  
 ggaggaagcg gaggcggagg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctctgtg 480  
 aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac 540  
 ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtctgg aatggattgg agtgatttgg 600  
 ggctctgaga ctacttacta ccaatcatcc ctcaagtac gcgtcaccat ctcaaaggac 660  
 aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcatctgtga ccgcagccga caccgccgtg 720  
 tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag 780  
 ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccggt 840  
 cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900  
 ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg 960  
 gctgggtactt gcggggctct gctgctttca ctcgtgatca ctctttactg taagcgcggg 1020  
 cggagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa 1080  
 gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140  
 gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200  
 aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260  
 gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320  
 ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380

ES 2 876 974 T3

agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440

gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 91

<211> 1473

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 91

ES 2 876 974 T3

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60  
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120  
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180  
cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240  
tcattctccc tgaagtacac ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300  
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360  
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420  
tctggtggag gaggtagcgg aggagggcgg agcgggtggag gtggctccgg aggtggcggg 480  
agcgaaatcg tgatgaccga gagccctgca accctgtccc tttctccggg ggaacgggct 540  
accctttctt gtcgggcac cacaagatc tcaaaatacc tcaattggta tcaacagaag 600  
ccgggacagg cccttaggct tcttatctac cacacctc gcctgcatag cgggattccc 660  
gcacgcttta gcgggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag 720  
cccgaggact tcgccgtcta cttctgccag cagggtaaca ccctgcgta caccttcggc 780  
cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccgtc caaggccacc caccctgcc 840  
ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900  
ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg 960  
gctggtactt gcggggtcct gctgctttca ctctgatca ctctttactg taagcgcggt 1020  
cggaagaagc tgctgtacat cttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa 1080  
gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140  
gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200  
aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260  
gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320  
ctccaaaagg ataagatgac agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380  
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440  
gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 92

5 <211> 1473

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

ES 2 876 974 T3

<400> 92

atggctctgc	ccgtgaccgc	actcctcctg	ccactggctc	tgctgcttca	cgccgctcgc	60
ccacaagtcc	agcttcaaga	atcagggcct	ggtctggtga	agccatctga	gactctgtcc	120
ctcaacttgca	ccgtgagcgg	agtgtccctc	ccagactacg	gagtgagctg	gattagacag	180
cctcccggaa	agggactgga	gtggatcgga	gtgatttggg	gtagcгааac	cacttactat	240
caatcttccc	tgaagtcacg	ggtcaccatt	tcaaaggata	actcaaagaa	tcaagtgagc	300
ctcaagctct	catcagtcac	cgccgctgac	accgccgtgt	attactgtgc	caagcattac	360
tactatggag	ggtcctacgc	catggactac	tggggccagg	gaactctggt	cactgtgtca	420
tctggtggag	gaggtagcgg	aggaggcggg	agcggtgagg	gtggctccgg	aggcggggg	480
tcagaaatcg	tgatgaccca	gagccctgca	accctgtccc	tttctcccgg	ggaacgggct	540
accctttctt	gtcgggcatc	acaagatata	tcaaaatacc	tcaattggta	tcaacagaag	600
ccgggacagg	cccctaggct	tcttatctac	cacacctctc	gcctgcatag	cgggattccc	660
gcacgcttta	gcgggtctgg	aagcgggacc	gactacactc	tgaccatctc	atctctccag	720
cccgaggact	tcgccgtcta	cttctgccag	cagggtaaca	ccctgccgta	caccttcggc	780
cagggcacca	agcttgagat	caaaaccact	actcccgtc	caaggccacc	cacccctgcc	840
ccgaccatcg	cctctcagcc	gctttccctg	cgcccgagg	catgtagacc	cgcagctggt	900
ggggccgtgc	ataccggggg	tcttgacttc	gcctgcgata	tctacatttg	ggcccctctg	960
gctggtactt	gcggggctct	gctgctttca	ctcgtgatca	ctctttactg	taagcgcggt	1020
cggaagaagc	tgctgtacat	ctttaagcaa	cccttcatga	ggcctgtgca	gactactcaa	1080
gaggaggacg	gctgttcatg	ccggttccca	gaggaggagg	aaggcggctg	cgaactgcgc	1140
gtgaaattca	gccgcagcgc	agatgctcca	gcctacaagc	aggggcagaa	ccagctctac	1200
aacgaactca	atcttggtcg	gagagaggag	tacgacgtgc	tggacaagcg	gagaggacgg	1260
gaccagaaa	tgggcgggaa	gccgcgcaga	aagaatcccc	aagagggcct	gtacaacgag	1320
ctccaaaagg	ataagatggc	agaagcctat	agcgagattg	gtatgaaagg	ggaacgcaga	1380
agaggcaaag	gccacgacgg	actgtaccag	ggactcagca	ccgccaccaa	ggacacctat	1440
gacgctcttc	acatgcaggc	cctgccgcct	cgg			1473

- 5 <210> 93
- <211> 1473
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <221> fuente

ES 2 876 974 T3

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 93

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actccttagcc tttcaccggg tgagcgcgca	120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
cccggacagc ctccctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag	300
ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga	360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg	420
ggaggaagcg gaggcgggtg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctctgtg	480
aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac	540
ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggtctgg aatggattgg agtgatttgg	600
ggctctgaga ctacttacta caactcatcc ctcaagtac gcgtcaccat ctcaaaggac	660
aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcatctgtga ccgcagccga caccgccgtg	720
tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag	780
ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccocggct	840
cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt	900
ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg	960
gctggtactt gcggggctct gctgctttca ctcgtgatca ctctttactg taagcgcggg	1020
cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggccctgtgca gactactcaa	1080
gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc	1140
gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac	1200
aacgaactca atcttggctg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg	1260
gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatccc aagagggcct gtacaacgag	1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga	1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat	1440
5 gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg	1473

<210> 94

<211> 1473

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

ES 2 876 974 T3

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

5 <400> 94

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcaccggy tgagcgcgca      120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag      180
cccgacaggg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct      240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag      300
ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggaaca ccctgcccta cacctttgga      360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg      420
ggaggaagcg gaggcggggy gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctcttgty      480
aagccatcag aaactctttc actgacttgy actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac      540
ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggy aagggtctgy aatggattgy agtgatttgy      600
ggctctgaga ctacttacta caactcatcc ctcaagtcac gcgtcaccat ctcaaaggac      660
aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcatctgtga ccgcagccga caccgccgtg      720
tactattgcy ctaagcatta ctattatggc gggagctacy caatggatta ctggggacag      780
ggtactctgy tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccgct      840
cctaccatcy cctcccagcc tctgtccctg cgtccggaggy catgtagacc cgcagctggy      900
ggggccgtyc ataccgggyy tcttgacttc gcctgcgata tctacattty ggcccctctg      960
gctggtactt gcggggtcct gctgctttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcggy      1020
cggaagaagc tgctgtacat cttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa      1080
gaggaggacy gctgttcatg ccggttccca gaggaggaggy aaggcggctg cgaactgcgc      1140
gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac      1200
aacgaactca atcttggtcy gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcy gagaggacyg      1260
gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag      1320
ctccaaaaggy ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaaggy ggaacgcaga      1380
agaggcaaggy gccacgacyg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat      1440
gacgctcttc acatgcaggy cctgccgcct cgg      1473

```

<210> 95

<211> 1473

10 <212> ADN

ES 2 876 974 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 95

```

atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgctcgc      60
ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctgggtga agccatctga gactctgtcc      120
ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag      180
cctcccggaa agggactgga gtggatcggg gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat      240
aactcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc      300
ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac      360
tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca      420
tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcggtgag gtggctccgg aggtggcggg      480
agcgaatcg tgatgacca gagccctgca accctgtccc tttctcccgg ggaacgggct      540
accctttctt gtcgggcatc acaagatata tcaaaaatacc tcaattggta tcaacagaag      600
ccgggacagg ccctaggct tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc      660
gcacgcttta gcgggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag      720
cccgaggact tcgccgtcta cttctgccag cagggttaaca ccctgccgta caccttcggc      780
cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccgtc caaggccacc caccctgcc      840
ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt      900
ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg      960
gctggtactt gcggggtcct gctgcttca ctcgtgatca ctctttactg taagcgcggt     1020
cggaagaagc tgctgtacat cttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa     1080
gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc     1140
gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac     1200
aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg     1260
gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag     1320
ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga     1380
agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat     1440
gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg                                     1473

```

10 <210> 96

ES 2 876 974 T3

<211> 1458  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 96

```

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg      60
cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actccttagcc tttcacccgg tgagcgcgca      120
accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag      180
cccggacagg ctocctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct      240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag      300
ccagaggact togctgtcta tttctgtcag caaggggaaca ccctgcccta cacctttgga      360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtcgggcggg      420
ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccggggtc ttgtgaagcc atcagaaact      480
ctttcaactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggg gtcttggatc      540
agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttgggggctc tgagactact      600
tactacaact catccctcaa gtcacgcgctc accatctcaa aggacaactc taagaatcag      660
gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag      720
cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtag tctggtcacc      780
gtgtccagca ccaactaccc agcaccgagg ccacccaccc cggctcctac catcgcctcc      840
cagcctctgt ccctgcgtcc ggagggcatg agacccgcag ctggtggggc cgtgcataacc      900
cggggctctg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgccgg      960
gtcctgctgc tttcaactgt gatcaactct tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg     1020
tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt     1080
tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgccgctgaa attcagccgc     1140
agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt     1200
ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc     1260
gggaagccgc gcagaaagaa tccccaaagag ggcctgtaca acgagctcca aaaggataag     1320
atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac     1380
gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg     1440
caggccctgc cgccctcgg
    
```

10

ES 2 876 974 T3

<210> 97

<211> 813

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

10

<400> 97

atggccctgc ccgtcaccgc tctgctgctg cccttgctc tgcttcttca tgcagcaagg	60
ccggacatcc agatgaccca aaccacctca tccctctctg cctctcttgg agacagggtg	120
accatttctt gtcgcgccag ccaggacatc agcaagtatc tgaactggta tcagcagaag	180
ccggacggaa ccgtgaagct cctgatctac catacctctc gcctgcatag cggcgtgccc	240
tcacgcttct ctggaagcgg atcaggaacc gattattctc tcaactattc aaatcttgag	300
caggaagata ttgccaccta tttctgccag cagggttaata ccctgcccta caccttcgga	360
ggagggacca agctcgaaat caccgggtgga ggaggcagcg gcggtggagg gtctggtgga	420
ggtggttctg aggtgaagct gcaagaatca ggccctggac ttgtggcccc ttcacagtcc	480
ctgagcgtga cttgcaccgt gtccggagtc tccctgcccg actacggagt gtcatggatc	540
agacaacctc cacggaaagg actggaatgg ctcggtgtca tctggggtag cgaaactact	600
tactacaatt cagccctcaa aagcaggctg actattatca aggacaacag caagtcccaa	660
gtctttctta agatgaactc actccagact gacgacaccg caatctacta ttgtgctaag	720
cactactact acggaggatc ctacgctatg gattactggg gacaaggtag ttccgtcact	780
gtctcttcac accatcatca ccatcacat cac	813

<210> 98

15 <211> 271

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 98

ES 2 876 974 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

ES 2 876 974 T3

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu  
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His  
260 265 270

<210> 99

<211> 1458

5 <212> ADN

ES 2 876 974 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 99

atggccttac	cagtgaccgc	cttgctcctg	ccgctggcct	tgctgctcca	cgccgccagg	60
ccggacatcc	agatgacaca	gactacatcc	tcctgtctg	cctctctggg	agacagagtc	120
accatcagtt	gcagggcaag	tcaggacatt	agtaaatt	taaattggta	tcagcagaaa	180
ccagatggaa	ctgttaaact	cctgatctac	catacatcaa	gattacactc	aggagtccca	240
tcaaggttca	gtggcagtgg	gtctggaaca	gattattctc	tcaccattag	caacctggag	300
caagaagata	ttgccactta	cttttgccaa	cagggtaata	cgcttccgta	cacgttcgga	360
ggggggacca	agctggagat	cacaggtggc	ggtggctcgg	gcgggtgggg	gtcgggtggc	420
ggcggatctg	aggtgaaact	gcaggagtca	ggacctggcc	tggtggcgcc	ctcacagagc	480
ctgtccgtca	catgcactgt	ctcaggggtc	tcattaccog	actatggtgt	aagctggatt	540
cgccagcctc	cacgaaaggg	tctggagtgg	ctgggagtaa	tatgggtag	tgaaaccaca	600
tactataatt	cagctctcaa	atccagactg	accatcatca	aggacaactc	caagagccaa	660
gttttcttaa	aaatgaacag	tctgcaaact	gatgacacag	ccatttacta	ctgtgccaaa	720
cattattact	acggtggtag	ctatgctatg	gactactggg	gccaaggaac	ctcagtcacc	780
gtctcctcaa	ccacgacgcc	agcgcgcgca	ccaccaacac	cggcgcccac	catcgcgtcg	840
cagcccctgt	ccctgcgccc	agaggcgtgc	cggccagcgg	cggggggcgc	agtgcacacg	900
agggggctgg	acttcgcctg	tgatatctac	atctgggcgc	ccttggccgg	gacttgtggg	960
gtccttctcc	tgctactggt	tatcaccctt	tactgcaaac	ggggcagaaa	gaaactcctg	1020
tatatattca	aacaaccatt	tatgagacca	gtacaaacta	ctcaagagga	agatggctgt	1080
agctgccgat	ttccagaaga	agaagaagga	ggatgtgaac	tgagagtgaa	gttcagcagg	1140
agcgcagacg	cccccgcgta	caagcagggc	cagaaccagc	tctataacga	gctcaatcta	1200
ggacgaagag	aggagtacga	tgttttggac	aagagacgtg	gccgggaccc	tgagatgggg	1260
ggaaagccga	gaaggaagaa	ccctcaggaa	ggcctgtaca	atgaactgca	gaaagataag	1320
atggcggagg	cctacagtga	gattgggatg	aaagggcagc	gccggagggg	caagggggcac	1380
gatggccttt	accaggtct	cagtacagcc	accaaggaca	cctacgacgc	ccttcacatg	1440
caggccctgc	cccctcgc					1458

ES 2 876 974 T3

<210> 100  
 <211> 1184  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

10

<400> 100  
 cgtgaggctc cggtgcccggt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt 60  
 tggggggagg ggtcggcaat tgaaccgggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120  
 aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggtg tgggggagaa ccgtatataa 180  
 gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240  
 gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300  
 gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360  
 ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420  
 cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480  
 ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt 540  
 tctggcaaga tagtcttgta aatgcggggc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600  
 gggccgcggg cggcgacggg gcccgctgct cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660  
 tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720  
 tgcctggcct cgcgcccggc tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780  
 caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840  
 ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct 900  
 ttccgtcctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc 960  
 tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020  
 cgatggagtt tccccacact gagtgggtg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080  
 tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttgatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140  
 agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgct gtga 1184

<210> 101  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

5

<400> 101

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc	60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc	120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat	180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc	240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctcca gtacagccac caaggacacc	300
tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc	336

10

<210> 102

<211> 230

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 102

ES 2 876 974 T3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys Met  
 225 230

<210> 103

ES 2 876 974 T3

<211> 690  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 103  
 gagagcaagt acggccctcc ctgccccctt tgcctgccc ccgagttcct gggcggacct 60  
 agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag 120  
 gtgacctgtg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac 180  
 gtggacggcg tggaggtgca caacgccaa accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240  
 acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300  
 tacaagtgta aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360  
 gccaaagggc agcctcggga gcccaggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg 420  
 accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggtt tctaccccag cgacatcgcc 480  
 gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 540  
 gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 600  
 gagggcaacg tcttttagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag 660  
 10 aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 690

<210> 104  
 <211> 150  
 <212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

20 <400> 104  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 150

25 <210> 105  
 <211> 40

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>

<221> característica\_miscelánea

10 <222> (1)..(40)

<223> /nota="Esta secuencia puede englobar 1-10 unidades de repetición de 'Gly Gly Gly Gly Ser'"

<220>

<221> fuente

15 <223> /note="Véase la Descripción presentada por una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 105

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 35 40

20

<210> 106  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

30 <400> 106

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser  
 20

<210> 107

<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 107

10 **Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser**  
**1 5 10 15**

<210> 108

<211> 4

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

20

<400> 108

**Gly Gly Gly Ser**  
**1**

<210> 109

25 <211> 5000

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<220>

<221> característica\_miscelánea

35 <222> (1)..(5000)

<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar 50-5000 nucleótidos"

<220>

<221> fuente

40 <223> /note="Véase la Descripción presentada por una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 109

aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	300
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	360
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	420
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	480





ES 2 876 974 T3

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4320
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4380
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4440
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4500
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4560
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5000

<210> 110

<211> 100

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 110

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	60
---	----

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	100
---	-----

15 <210> 111

<211> 5000

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<220>

25 <221> característica\_miscelánea

<222> (1)..(5000)

<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar 50-5000 nucleótidos"

<220>

5 <221> fuente

<223> /note="Véase la Descripción presentada por una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 111





ES 2 876 974 T3

tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3780
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3840
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3900
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3960
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4020
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4080
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4140
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4200
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4260
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4320
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4380
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4440
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4500
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4560
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4620
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4680
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4740
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4800
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4860
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4920
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4980
tttttttttt	tttttttttt					5000

<210> 112

<211> 5000

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<220>

<221> característica\_miscelánea

<222> (1)..(5000)

<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar 100-5000 nucleótidos"

<220>

<221> fuente

5 <223> /note="Véase la Descripción presentada por una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 112





ES 2 876 974 T3

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3720  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3780  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3840  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3900  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3960  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4020  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4080  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4140  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4200  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4260  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4320  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4380  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4500  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4560  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4620  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4680  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4740  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4800  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4860  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4920  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4980  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5000

<210> 113

<211> 400

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<220>

<221> característica\_misclánea

<222> (1)..(400)

<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar 100-400 nucleótidos"

<220>

5 <221> fuente

<223> /note="Véase la Descripción presentada por una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 113

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	400

10

<210> 114

<211> 120

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20

<400> 114

ES 2 876 974 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
 20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 115

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 115

ES 2 876 974 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 116

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 116

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
20 25 30

ES 2 876 974 T3

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 117

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 117

ES 2 876 974 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 118

<211> 1132

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

ES 2 876 974 T3

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser  
1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly  
20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg  
35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro  
50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu  
65 70 75 80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val  
85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro  
100 105 110

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr  
115 120 125

Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val  
130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val  
145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr  
165 170 175

Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly  
180 185 190

Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg  
195 200 205

Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg  
210 215 220

Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg



ES 2 876 974 T3

Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser  
485 490 495

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met  
500 505 510

Ser Val Arg Gly Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys  
515 520 525

Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe  
530 535 540

Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe  
545 550 555 560

Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr  
565 570 575

Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His  
580 585 590

Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln  
595 600 605

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile  
610 615 620

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val  
625 630 635 640

Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser  
645 650 655

Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg  
660 665 670

Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg  
675 680 685

Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro  
690 695 700

Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile  
705 710 715 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln  
725 730 735

ES 2 876 974 T3

Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His  
 740 745 750

Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp  
 755 760 765

Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser  
 770 775 780

Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu  
 785 790 795 800

Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His  
 805 810 815

Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro  
 820 825 830

Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp  
 835 840 845

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu  
 850 855 860

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala  
 865 870 875 880

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys  
 885 890 895

Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu  
 900 905 910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe  
 915 920 925

Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser  
 930 935 940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe  
 945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly  
 965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn  
 980 985 990

ES 2 876 974 T3

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln  
 995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln  
 1010 1015 1020

Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp  
 1025 1030 1035

Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly  
 1040 1045 1050

Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu  
 1055 1060 1065

Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr  
 1070 1075 1080

Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr  
 1085 1090 1095

Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr  
 1100 1105 1110

Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys  
 1115 1120 1125

Thr Ile Leu Asp  
 1130

<210> 119

<211> 4027

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 119

ES 2 876 974 T3

caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc	60
cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct cctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc	120
tgccgctggc cacgttcgtg cggcgcctgg gggcccaggg ctggcggctg gtgcagcgcg	180
gggaccaggc ggctttccgc gcgctggtgg ccagtgctt ggtgtgcgtg ccctgggacg	240
cacggccgcc ccccgccgcc cctccttcc gccaggtgtc ctgcctgaag gagctggtgg	300
cccgagtgct gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg	360
cgctgctgga cggggcccg cggggccccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct	420
acctgcccaa cacggtgacc gacgcactgc gggggagcgg gccgtggggg ctgctggtgc	480

ES 2 876 974 T3

gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgcgcgctc tttgtgctgg 540  
 tggctcccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgcccgt gtaccagctc ggcgctgcc 600  
 ctcaggcccc gcccccgcca cacgctagtg gaccccgaaag gcgtctggga tgcgaacggg 660  
 cctggaacca tagcgtcagg gaggcggggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcga 720  
 ggaggcgcgg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc aggcgtggcg 780  
 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgttg ggcaggggtc ctgggcccac ccgggcagga 840  
 cgcgtggacc gagtgaccgt ggtttctgtg tggtgtcacc tgccagacct gccgaagaag 900  
 ccacctcttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacccatcc gtgggcccgc 960  
 agcaccacgc gggcccccca tccacatcgc ggccaccacg tccctgggac acgccttgtc 1020  
 ccccggtgta cgccgagacc aagcacttcc tctactcctc aggcgacaag gagcagctgc 1080  
 ggccctcctt cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgctcgg aggctcgtgg 1140  
 agaccatctt tctgggttcc aggcctgga tgccagggac tccccgcagg ttgccccgcc 1200  
 tgccccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgtttctgga gctgcttggg aaccacgcgc 1260  
 agtgccccta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgtc gcgagctgcg gtcaccccag 1320  
 cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggccggcccc gagggaggagg 1380  
 acacagacct ccgtcgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt 1440  
 acggcttctg gcgggcctgc ctgcgccggc tggtgcccc aggcctctgg ggctccaggc 1500  
 acaacgaacg ccgcttcctc aggaacacca agaagttcat ctccctgggg aagcatgcc 1560  
 agctctcgtc gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgct tggctgcgca 1620  
 ggagcccagg ggttggctgt gttccggccg cagagcaccg tctgcgtgag gagatcctgg 1680  
 ccaagttcct gcaactggctg atgagtgtgt acgtcgtcga gctgctcagg tctttctttt 1740  
 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctcttttt ctaccggaag agtgtctgga 1800  
 gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt 1860  
 cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggccccg cctgctgacg tccagactcc 1920  
 gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag 1980  
 ccagaacggt ccgcagagaa aagagggccg agcgtctcac ctcgagggtg aaggcactgt 2040  
 tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctgggcgcc tctgtgctgg 2100  
 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttcgtgct gcgtgtgagg gccaggacc 2160  
 cgccgcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatcccc 2220  
 aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg tactgcgtgc 2280  
 gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgcc atgggcacgt ccgcaaggcc ttcaagagcc 2340

ES 2 876 974 T3

acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg 2400  
 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctccctccctg aatgaggcca 2460  
 gcagtggcct cttcgacgtc ttcttacgct tcatgtgcca ccacgccgtg cgcacaggg 2520  
 gcaagtcccta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggctc catcctctcc acgctgctct 2580  
 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc 2640  
 tgctcctgcg tttggtggat gatttcttgt tggtgacacc tcacctcacc cacgcgaaaa 2700  
 ccttcctcag gaccctgggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgctggtg aacttgcgga 2760  
 agacagtggg gaacttccct gtagaagacg aggccctggg tggcacggct tttgttcaga 2820  
 tgccggccca cggcctattc ccctggtgcg gcctgctgct ggatacccg accctggagg 2880  
 tgcagagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc accttcaacc 2940  
 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggggtcttg cggctgaagt 3000  
 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct 3060  
 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctcccatttc 3120  
 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tcctgcgct catctctgac acggcctccc 3180  
 tctgctactc catcctgaaa gccaaagaacg cagggatgtc gctgggggccc aagggcgccg 3240  
 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc 3300  
 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctggggctc actcaggaca gccagacgc 3360  
 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg 3420  
 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgcccac agccaggccg 3480  
 agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccc ggctctacgt cccagggagg gagggcgcc 3540  
 ccacaccag gcccgaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgttg gccgaggcct 3600  
 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc 3660  
 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcaact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc 3720  
 agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga atagtccatc 3780  
 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgcctcctt tgccttcac cccaccatc 3840  
 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctggga tttggagtga ccaaaggtgt 3900  
 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg 3960  
 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa 4020  
 aaaaaaa 4027

<210> 120

<211> 1182

ES 2 876 974 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

<400> 120

atggccctcc ctgtcactgc cctgcttctc cccctcgcac tcctgctcca cgccgctaga	60
ccacccggat ggtttctgga ctctccggat cgcccggtgga atcccccaac cttctcaccg	120
gcaactcttg ttgtgactga gggcgataat ggcaccttca cgtgctcgtt ctccaacacc	180
tccgaatcat tcgtgctgaa ctggtaccgc atgagcccgt caaaccagac cgacaagctc	240
gccgcgtttc cggaagatcg gtcgcaaccg ggacaggatt gtcggttccg cgtgactcaa	300
ctgccgaatg gcagagactt ccacatgagc gtggtccgcg ctaggcgaaa cgactccggg	360
acctacctgt gcggagccat ctcgctggcg cctaaggccc aatcaaaga gagcttgagg	420
gccgaactga gactgaccga gcgcagagct gaggtgcaa ctgcacatcc atccccatcg	480
cctcggcctg cggggcagtt tcagaccctg gtcacgacca ctccggcgcc gcgcccaccg	540
actccggccc caactatcgc gagccagccc ctgtcgtgga ggccggaagc atgccgccct	600
gccgccggag gtgctgtgca taccggggga ttggacttgc catgcgacat ctacatttgg	660
gctcctctcg ccggaacttg tggcgtgctc cttctgtccc tggatcac cctgtactgc	720
aagcggggtc ggaaaaagct tctgtacatt ttcaagcagc cttcatgag gcccggtgcaa	780
accaccagagc aggaggacgg ttgctcctgc cggttccccg aagaggaaga aggaggtgc	840
gagctgcgcg tgaagttctc ccggagcgcc gacgcccccg cctataagca gggccagaac	900
cagctgtaca acgaactgaa cctgggacgg cgggaagagt acgatgtgct ggacaagcgg	960
cgcgccgggg accccgaaat gggcgggaag cctagaagaa agaaccctca ggaaggcctg	1020
tataacgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctact ccgaaattgg gatgaagga	1080
gagcggcgga ggggaaaggg gcacgacggc ctgtaccaag gactgtccac cgccaccaag	1140
gacacatacg atgccctgca catgcaggcc cttccccctc gc	1182

10

<210> 121  
<211> 394  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15

<220>  
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 121

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1                   5                   10                   15

ES 2 876 974 T3

His Ala Ala Arg Pro Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro  
 20 25 30

Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly  
 35 40 45

Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe  
 50 55 60

Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu  
 65 70 75 80

Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe  
 85 90 95

Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val  
 100 105 110

Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser  
 115 120 125

Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg  
 130 135 140

Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser  
 145 150 155 160

Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Thr Thr Thr Pro Ala  
 165 170 175

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser  
 180 185 190

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr  
 195 200 205

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala  
 210 215 220

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys  
 225 230 235 240

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 245 250 255

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
 260 265 270

ES 2 876 974 T3

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg  
 275 280 285

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn  
 290 295 300

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
 305 310 315 320

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro  
 325 330 335

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala  
 340 345 350

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His  
 355 360 365

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp  
 370 375 380

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 385 390

<210> 122

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 122

ES 2 876 974 T3

Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Gly Pro Ser Ser Pro Lys Lys  
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Val Ser Arg Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly  
 20 25 30

Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr  
 35 40 45

Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg  
 50 55 60

Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly  
 65 70 75 80

Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu  
 85 90 95

Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile  
 100 105 110

Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu  
 115 120 125

Glu Thr Ser Tyr  
 130

<210> 123

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 123

ES 2 876 974 T3

Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys  
 1 5 10 15

Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly  
 20 25 30

Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met  
 35 40 45

Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln  
 50 55 60

Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala  
 65 70 75 80

Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu  
 85 90 95

Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Thr Ser  
 100 105

<210> 124

<211> 93

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 124

ES 2 876 974 T3

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu  
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr  
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp  
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala  
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys  
85 90

<210> 125

<211> 95

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 125

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Ile Glu Ala Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu  
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr  
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp  
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala  
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser  
85 90 95

<210> 126

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 126

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu  
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr  
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp  
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala  
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser  
85 90 95

<210> 127

15 <211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 127

ES 2 876 974 T3

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg  
 1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu  
 20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr  
 35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp  
 50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala  
 65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser  
 85 90 95

<210> 128

5 <211> 95

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>

<221> MOD\_RES

15 <222> (12)..(12)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD\_RES

20 <222> (78)..(78)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 128

ES 2 876 974 T3

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Xaa Glu Ala Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu  
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr  
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp  
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Xaa Gln Ala  
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser  
85 90 95

<210> 129

<211> 95

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 129

Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Ile Glu Ala Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu  
20 25 30

Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr  
35 40 45

Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp  
50 55 60

Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser  
85 90 95

<210> 130  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 130  
 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Leu Glu Ala Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu  
 20 25 30  
 Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr  
 35 40 45  
 Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp  
 50 55 60  
 Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Thr Ser  
 85 90 95

<210> 131  
 <211> 2000  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

20

<220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(2000)

25

<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar 50-2000 nucleótidos"

<220>  
 <221> fuente

<223> /note="Véase la Descripción presentada por una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 131

aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	420
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	480
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	540
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	600
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	660
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	720
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	780
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	840
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	900
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	960
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1020
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1080
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1140
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1200
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1260
5 aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1320

ES 2 876 974 T3

aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1380
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1440
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1500
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1560
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1620
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1680
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1740
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1800
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1860
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1920
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1980
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa					2000

<210> 132

<211> 373

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 132

ES 2 876 974 T3

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr  
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe  
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr  
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu  
 50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu  
 65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn  
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala  
 100 105 110

ES 2 876 974 T3

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg  
 115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly  
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr  
 145 150 155 160

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala  
 165 170 175

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe  
 180 185 190

Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val  
 195 200 205

Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys  
 210 215 220

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr  
 225 230 235 240

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu  
 245 250 255

Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro  
 260 265 270

Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly  
 275 280 285

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro  
 290 295 300

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr  
 305 310 315 320

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly  
 325 330 335

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln  
 340 345 350

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln  
 355 360 365

**Ala Leu Pro Pro Arg**  
370

<210> 133

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

15 <223> Ahx

<400> 133

<b>Xaa</b>	<b>Thr</b>	<b>Ser</b>	<b>Glu</b>	<b>Leu</b>	<b>Lys</b>	<b>Lys</b>	<b>Val</b>	<b>Val</b>	<b>Ala</b>	<b>Leu</b>	<b>Tyr</b>	<b>Asp</b>	<b>Tyr</b>	<b>Met</b>	<b>Pro</b>
1				5					10					15	

**Met Asn Ala Asn Asp**  
20

20 <210> 134

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 134

**Arg Gly Asp Ser**

30 1

<210> 135

<211> 35

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

ES 2 876 974 T3

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 135

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr  
1 5 10 15

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp  
20 25 30

Val Thr Leu  
35

5

<210> 136

<211> 105

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

15

<400> 136

acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat gttcatgaga 60  
gcagtgaaca cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta 105

<210> 137

20 <211> 521

<212> ADN

<213> Desconocido

<220>

25 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de lo Desconocido: Polinucleótido promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK)"

<400> 137

ES 2 876 974 T3

acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60  
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgctcc ggggtgtgatg gcgggggtgtg 120  
 gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180  
 gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240  
 cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300  
 ttcttggaa gggctgaatc cccgcctcgt ccttcgcagc ggccccccgg gtgttcccat 360  
 cgccgcttct aggccactg cgacgcttgc ctgcacttct tacacgctct gggcccagc 420  
 cgcggcgacg caaagggcct tgggtcgggt ctcgctggcg cagggacgcg tttgggtccc 480  
 gacggaacct tttccgcgtt ggggttgggg caccataagc t 521

<210> 138

<211> 118

5 <212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de lo Desconocido: Polinucleótido promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK"

<400> 138

acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60  
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgctcc ggggtgtgatg gcgggggtg 118

15 <210> 139

<211> 221

<212> ADN

<213> Desconocido

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota= "Descripción de lo Desconocido: Polinucleótido promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK"

<400> 139

acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60  
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgctcc ggggtgtgatg gcgggggtgtg 120  
 gggcggaggg cgtggcgggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180  
 25 gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac g 221

ES 2 876 974 T3

<210> 140  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido

5

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de lo Desconocido: Polinucleótido promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK)"

10

<400> 140  
 acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60  
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgccc ggggtgatg gcgggggtgtg 120  
 gggcggaggg cgtggcggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180  
 gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240  
 cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300  
 ttccttggaagg gggctgaatc cccg 324

<210> 141  
 <211> 422  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido

15

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota= "Descripción de lo Desconocido: Polinucleótido promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK)"

20

<400> 141  
 acccctctct ccagccacta agccagttgc tccctcggct gacggctgca cgcgaggcct 60  
 ccgaacgtct tacgccttgt ggcgcgcccg tccttgccc ggggtgatg gcgggggtgtg 120  
 gggcggaggg cgtggcggg aagggccggc gacgagagcc gcgcgggacg actcgtcggc 180  
 gataaccggt gtcgggtagc gccagccgcg cgacggtaac gagggaccgc gacaggcaga 240  
 cgctcccatg atcactctgc acgccgaagg caaatagtgc aggccgtgcg gcgcttggcg 300  
 ttccttggaagg gggctgaatc cccgcctcgt ccttcgcagc ggcccccccg gtgttcccat 360  
 cgccgcttct aggccactg cgacgcttgc ctgcacttct tacacgtct ggggtcccagc 420  
 cg 422

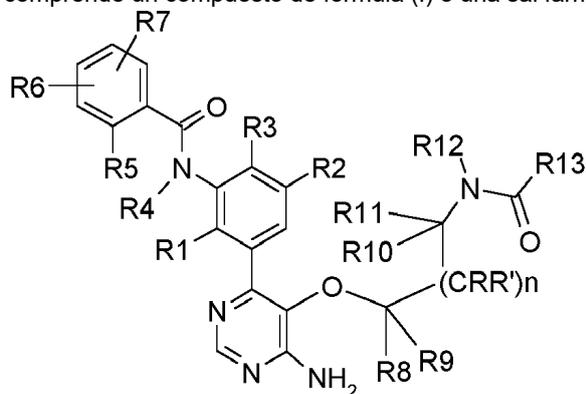
25

<210> 142  
 <211> 18



## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una célula o una población de células que expresa una molécula de CAR que se une a CD19 (una "célula que expresa CAR19") para uso, en combinación con un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), en el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de CD19 en un mamífero, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio o un cáncer, en donde el inhibidor de BTK comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;



(I)

en donde

- 10 R1 es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo;  
 R2 es hidrógeno o halógeno;  
 R3 es hidrógeno o halógeno;  
 R4 es hidrógeno;  
 R5 es hidrógeno o halógeno;  
 15 o R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-;  
 o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;  
 R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo  
 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;  
 R8, R9, R, R', R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con  
 20 alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; o cualesquiera dos de R8, R9, R, R', R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos,  
 pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;  
 R12 es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 o R12 y uno cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un  
 25 anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano,  
 hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 n es 0 o 1; y  
 R13 es alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o N,N-di-alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> amino; alquino  
 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; u óxido de alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido  
 30 con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.
2. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde  
 R1 es hidrógeno, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo;  
 R2 es halógeno;  
 R3 es hidrógeno;  
 35 R4 es hidrógeno;  
 R5 es halógeno;  
 o R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-;  
 ; o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;  
 R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo  
 40 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;  
 R8, R9, R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; o cualesquiera dos de R8, R9, R10  
 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6  
 miembros;  
 R y R' son hidrógeno;  
 45 R12 es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno;  
 o R12 y uno cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un  
 anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano,  
 hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 n es 0 o 1; y

R13 es alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; u óxido de alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

3. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto de fórmula (I) se elige de:

- 5 N-(3-(5-((1-acriloilazetidín-3-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (E)-N-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-enil)azetidín-3-il)oxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-((1-propioilazetidín-3-il)oxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-inil)azetidín-3-il)oxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 10 N-(3-(5-((1-acriloilpiperidín-4-il)oxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-etilacrilamido)etoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (E)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilpropiolamido)etoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 15 (E)-N-(3-(6-amino-5-(2-(4-metoxi-N-metilbut-2-enamido)etoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-inamido)etoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(2-((4-amino-6-(3-(4-ciclopropil-2-fluorobenzamido)-5-fluoro-2-metilfenil)pirimidín-5-il)oxi)etil)-N-metiloxirano-2-carboxamida;  
 20 N-(2-((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-8-fluoro-1-oxoisoquinolin-2(1H)-il)fenil)pirimidín-5-il)oxi)etil)-N-metilacrilamida;  
 N-(3-(5-(2-acrilamidoetoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-etilacrilamido)etoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(2-(N-(2-fluoroetil)acrilamido)etoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 25 N-(3-(5-((1-acrilamidociclopropil)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(5-(2-acrilamidopropoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(but-2-inamido)propoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilacrilamido)propoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(6-amino-5-(2-(N-metilbut-2-inamido)propoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 30 N-(3-(6-amino-5-(3-(N-metilacrilamido)propoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(5-((1-acriloilpirrolidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-N-(3-(6-amino-5-((1-(but-2-inil)pirrolidín-2-il)metoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 35 (S)-2-(3-(5-((1-acriloilpirrolidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona;  
 N-(2-((4-amino-6-(3-(6-ciclopropil-1-oxo-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)pirimidín-5-il)oxi)etil)-N-metilacrilamida;  
 40 N-(3-(5-((2S,4R)-1-acriloil-4-metoxipirrolidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(((2S,4R)-1-(but-2-inil)-4-metoxipirrolidín-2-il)metoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 2-(3-(5-(((2S,4R)-1-acriloil-4-metoxipirrolidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona;  
 45 N-(3-(5-(((2S,4S)-1-acriloil-4-metoxipirrolidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(((2S,4S)-1-(but-2-inil)-4-metoxipirrolidín-2-il)metoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 50 N-(3-(5-(((2S,4R)-1-acriloil-4-fluoropirrolidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(6-amino-5-(((2S,4R)-1-(but-2-inil)-4-fluoropirrolidín-2-il)metoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 S)-N-(3-(5-((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 55 (S)-N-(3-(6-amino-5-((1-propioilazetidín-2-il)metoxi)pirimidín-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 (S)-2-(3-(5-((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-(hidroximetil)fenil)-6-ciclopropil-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-ona;  
 (R)-N-(3-(5-((1-acriloilazetidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 60 (R)-N-(3-(5-((1-acriloilpiperidín-3-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;  
 N-(3-(5-(((2R,3S)-1-acriloil-3-metoxipirrolidín-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;

*N*-(3-(5-(((2*S*,4*R*)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida;

o

*N*-(3-(5-(((2*S*,4*S*)-1-acriloil-4-cianopirrolidin-2-il)metoxi)-6-aminopirimidin-4-il)-5-fluoro-2-metilfenil)-4-ciclopropil-2-fluorobenzamida.

4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el mamífero es, o se identifica que es un respondedor completo o parcial al inhibidor de BTK, p. ej., un compuesto de fórmula (I), o un respondedor completo o parcial a la célula que expresa CAR19.

5. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la célula expresa una molécula de CAR que comprende un dominio de unión anti-CD19, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, en donde opcionalmente el dominio de señalización intracelular comprende un dominio coestimulador y un dominio de señalización primario.

6. La composición para uso de la reivindicación 5, en donde:

(a) la molécula de CAR comprende un dominio de unión anti-CD19 que comprende:

(i) una región determinante de la complementariedad 1 de la cadena ligera (LC CDR1), una región determinante de la complementariedad 2 de la cadena ligera (LC CDR2), una región determinante de la complementariedad 3 de la cadena ligera (LC CDR3), una región determinante de la complementariedad 1 de la cadena pesada (HC CDR1), una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 2 (HC CDR2) y una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19; o

(ii) una LC CDR1 de SEQ ID NO: 25, una LC CDR2 de SEQ ID NO: 26 y una LC CDR3 de SEQ ID NO: 27; y una HC CDR1 de SEQ ID NO: 19, una HC CDR2 de cualquiera de SEQ ID NOS: 20- 23 y una HC CDR3 de SEQ ID NO: 24; y/o

(b) el dominio de unión anti-CD19:

(i) comprende una región variable de la cadena ligera murina de SEQ ID NO: 59, una región variable de la cadena pesada murina de SEQ ID NO: 59, o ambas;

(ii) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, o una secuencia de aminoácidos con un 95-99% de identidad con la misma;

(iii) es un dominio de unión anti-CD19 humanizado, en donde opcionalmente el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una secuencia de aminoácidos elegida de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, o una secuencia de aminoácidos con un 95-99% de identidad con la misma;

(iv) es un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos con un 95-99% de identidad con la misma; o

(v) es un dominio de unión anti-CD19 humanizado que es un scFv que comprende una región variable de la cadena ligera unida a una región variable de la cadena pesada mediante un enlazador, p. ej., en donde el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53.

7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula de CAR comprende un dominio transmembrana de una proteína elegida de: la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 o CD154 en donde opcionalmente:

(i) el dominio transmembrana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y/o

(ii) el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana mediante una región de bisagra, p. ej., en donde la región de bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45.

8. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula de CAR comprende:

(a) un dominio coestimulador, en donde el dominio coestimulador comprende:

(i) un dominio de señalización funcional de una proteína elegida de: OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) o 4-1BB (CD137);

(ii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos con 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o

(iii) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 51, o una secuencia con 95-99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; y/o

(b) un dominio de señalización intracelular, en donde el dominio de señalización intracelular comprende:

(i) un dominio de señalización funcional de 4-1BB, un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, o ambos;

(ii) un dominio de señalización funcional de CD27, un dominio de señalización funcional de CD3 zeta, o ambos;

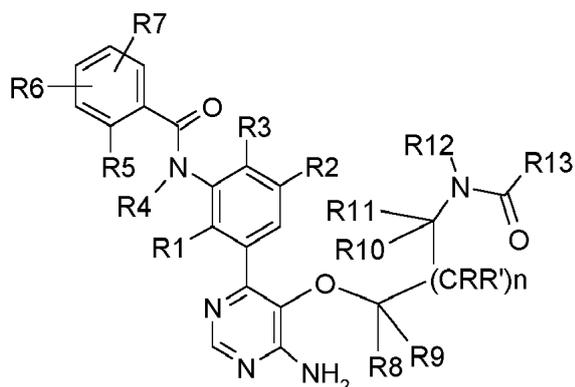
(iii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, o ambas;

(iv) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, o ambas;

(v) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, o ambas; o

(vi) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, o ambas.

9. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula de CAR comprende:
- 5 (i) comprende, además, una secuencia conductora que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y/o
- (ii) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, o SEQ ID NO:42.
10. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
- 10 (i) la composición es para uso en combinación con un agente que inhibe una molécula inmune inhibidora elegida de: PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (e.g., CEACAM-1, CEACAM-3 and/or CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, o 2B4; y/o
- 15 (ii) la composición comprende de  $1-5 \times 10^8$  células que expresan CAR.
11. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enfermedad asociada con la expresión de CD19 es un cáncer, p. ej., un cáncer hematológico, p. ej., un cáncer hematológico elegido de una leucemia o un linfoma, opcionalmente en donde el cáncer se elige de: leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de células del manto (MCL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica aguda (ALL), linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda de células B (BALL), leucemia linfocítica aguda de células T (TALL), linfoma linfocítico (SLL), leucemia prolinfocítica de células B, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), DLBCL asociado con inflamación crónica, linfoma folicular, linfoma folicular pediátrico, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o de células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT (linfoma extraganglionar de la zona marginal del tejido linfocítico asociado a las mucosas), linfoma de la zona marginal, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablasto, neoplasia de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de zona marginal esplénica, linfoma/leucemia esplénica, linfoma de células B pequeñas de pulpa roja difusa esplénica, variante de leucemia de células pilosas, linfoma linfoplasmocítico, una enfermedad de la cadena pesada, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma solitario de hueso, plasmocitoma extraóseo, linfoma ganglionar de la zona marginal, linfoma pediátrico de la zona marginal del ganglio, linfoma del centro del folículo cutáneo primario, granulomatosis linfomatosa, linfoma de células B grandes mediastínico primario (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes ALK+, linfoma de células B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de derrame primario, linfoma de células B o linfoma no clasificable.
- 35 12. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
- (a) el mamífero tiene, o se identifica que tiene una mutación BTK;
- (b) la enfermedad asociada con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico y en donde:
- 40 (i) la resistencia al inhibidor de BTK, la célula que expresa una molécula de CAR, o ambos, se retrasa o disminuye; o
- (ii) se prolonga la remisión del cáncer hematológico o se retrasa la recaída del cáncer hematológico;
- (c) el mamífero es, o se identifica como no respondedor o reincidente a un inhibidor de BTK, p. ej., ibrutinib, GDC-0834, RN-486, CGI-560, CGI-1764, HM-71224, CC-292, ONO-4059, CNX-774, o LFM-A13; y/o
- (d) el mamífero es, o se identifica que es
- 45 (i) un respondedor parcial al inhibidor de BTK, y al mamífero se le administra la célula que expresa CAR19, sola o en combinación con el inhibidor de BTK, durante el período de respuesta parcial; o
- (ii) un no respondedor que tiene enfermedad progresiva o estable después del tratamiento con ibrutinib, y al mamífero se le administra la célula que expresa CAR19, sola o en combinación con el inhibidor de BTK, durante el período de enfermedad progresiva o estable.
13. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
- 50 (i) dicho uso comprende realizar una infusión de linfocitos con al menos una célula que expresa CAR CD19;
- (ii) la célula y el inhibidor de BTK se formulan para administración simultánea o en donde la célula y el inhibidor de BTK se formulan para el suministro secuencial; y/o
- (iii) el mamífero ha sufrido un agotamiento de linfocitos, en donde opcionalmente el agotamiento de linfocitos comprende la administración de uno o más de melfalan, citoxano, ciclofosfamida y fludarabina.
- 55 14. Una composición, que comprende una célula que expresa una molécula de CAR que se une a CD19 (una "célula que expresa CAR19") y un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), en donde el inhibidor de BTK comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;



(I)

en donde

R1 es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo;

R2 es hidrógeno o halógeno;

5 R3 es hidrógeno o halógeno;

R4 es hidrógeno;

R5 es hidrógeno o halógeno;

o R4 y R5 están unidos entre sí y representan un enlace, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-;

o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;

10 R6 y R7 representan, independientemente entre sí, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con hidroxilo, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno o hidroxilo, o halógeno;

R8, R9, R, R', R10 y R11, independientemente entre sí, representan H, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; o cualesquiera dos de R8, R9, R, R', R10 y R11, junto con el átomo de carbono al que están unidos, pueden formar un anillo carbocíclico saturado de 3 - 6 miembros;

15 R12 es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con halógeno o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

o R12 y uno cualquiera de R8, R9, R, R', R10 o R11, junto con los átomos a los que están unidos, pueden formar un anillo azacíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, cuyo anillo puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, ciano, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

n es 0 o 1; y

20 R13 es alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o N,N-di-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> amino; alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; u óxido de alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

opcionalmente, en donde la célula que expresa CAR19 y el inhibidor de BTK pueden estar presentes en una forma de dosis única, o como dos o más formas de dosis.

25 15. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde:

(a) el inhibidor de BTK y la célula que expresa CAR19 se administran al mamífero como una primera línea de terapia;

o

30 (b) la célula que expresa CAR19 se administra al mamífero después de la administración del inhibidor de BTK,

opcionalmente, en donde:

(i) la célula que expresa CAR19 se administra después de cesar la administración del inhibidor de BTK; o

(ii) la administración del inhibidor de BTK se inicia antes de la administración de la célula que expresa CAR19, y la célula que expresa CAR19 se administra en combinación con la administración continuada del inhibidor de BTK.

35 16. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o la composición de la reivindicación 14, en donde la célula que expresa CAR19 es una célula efectora inmunitaria humana, p. ej., una célula T humana o una célula NK humana, o una población de células efectoras inmunitarias humanas.

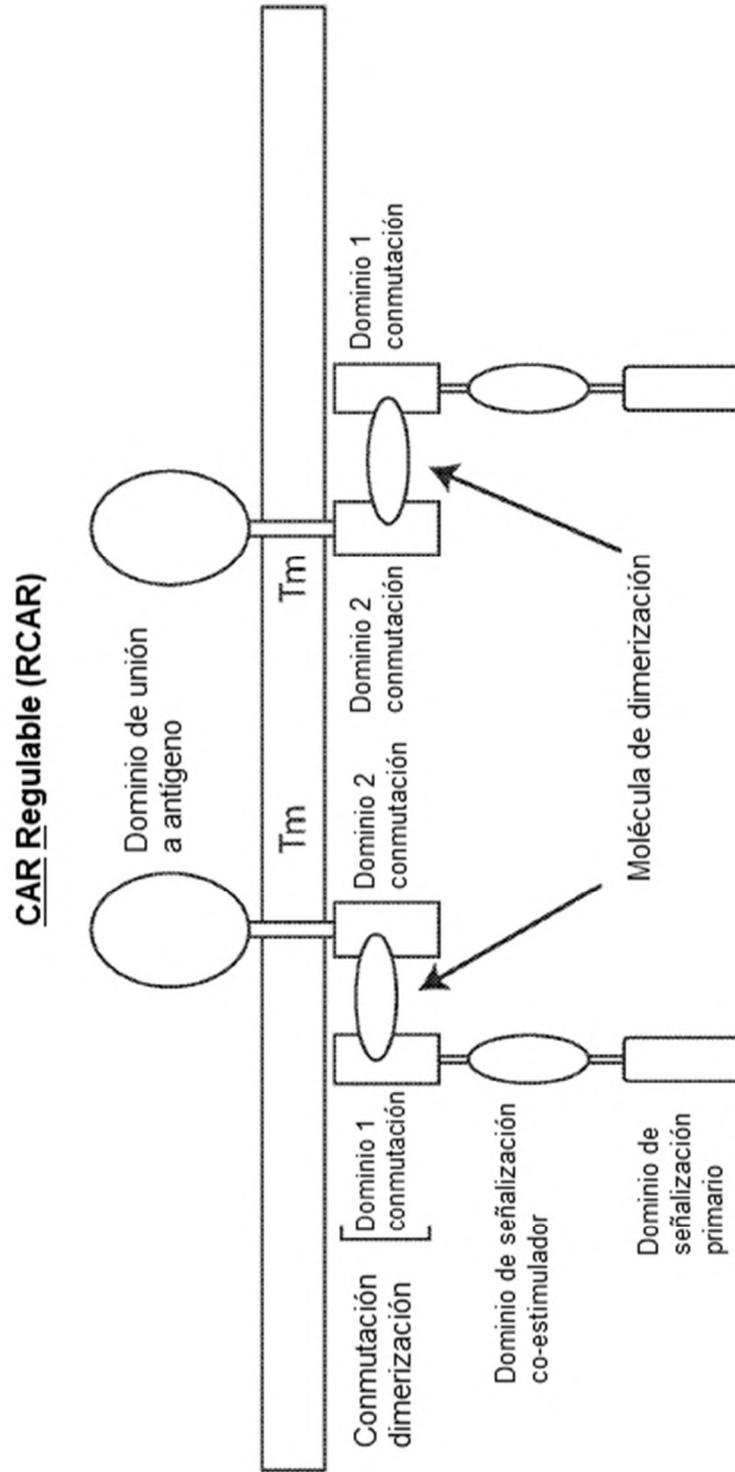
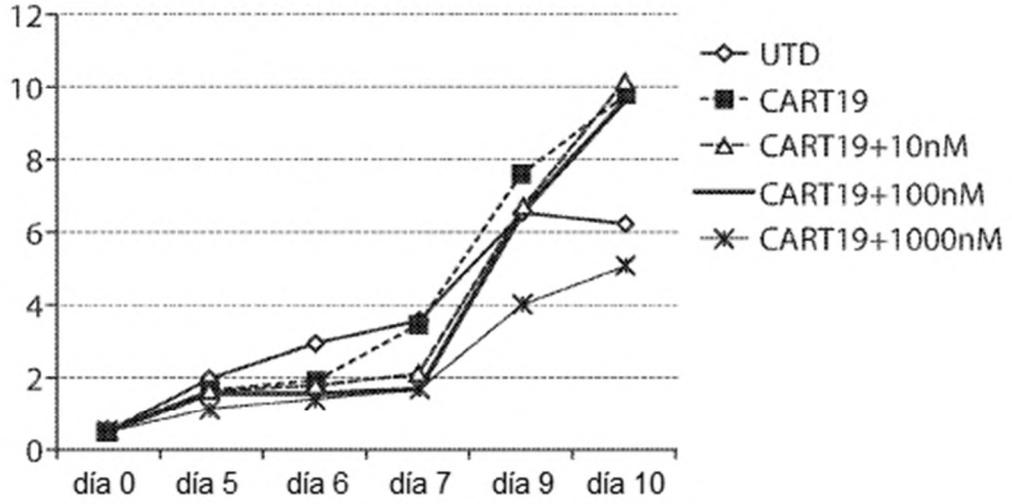


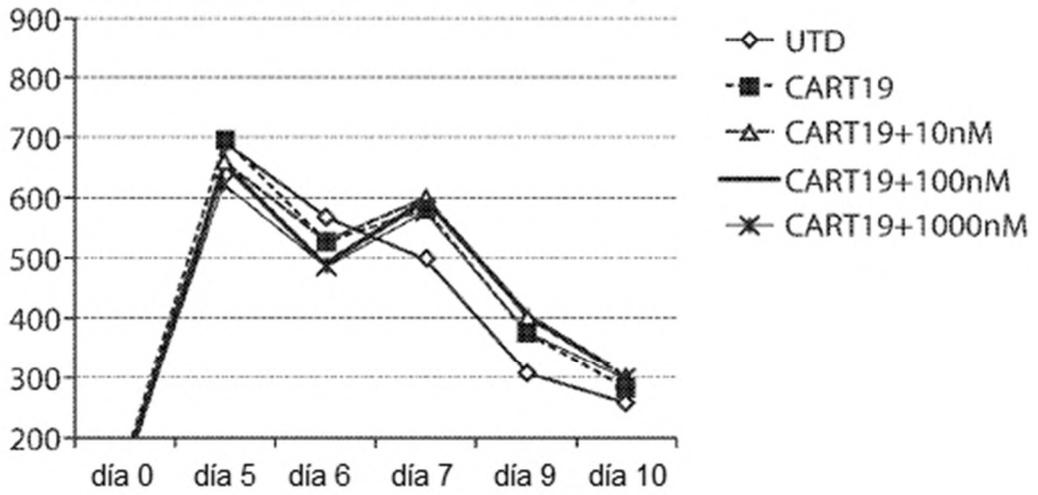
Fig. 1

**Números de células**



**FIG. 2A**

**Volumen de células**



**FIG. 2B**

ENSAYO PROLIFERACIÓN CFSE DE 5 DÍAS

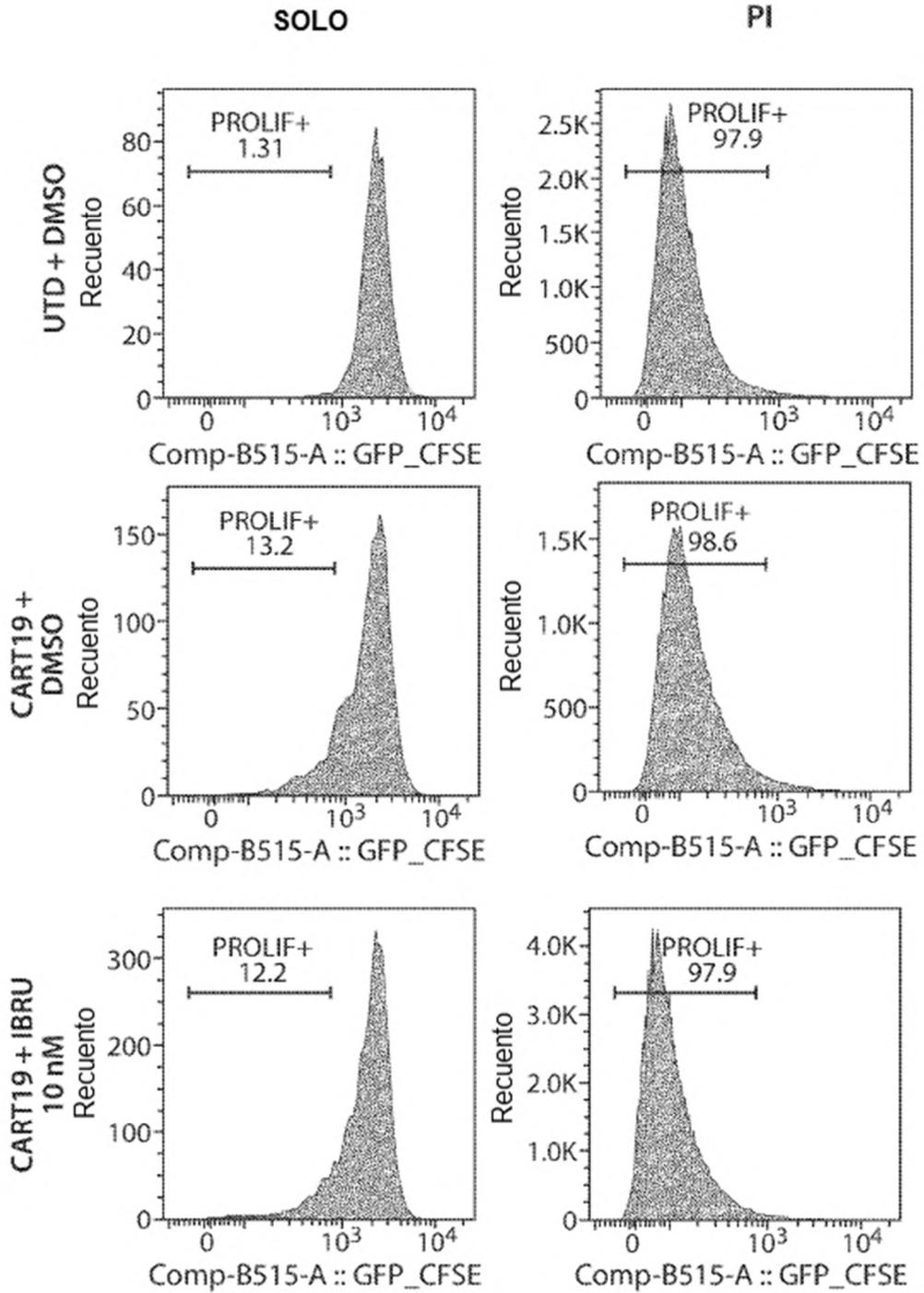


FIG. 3A-1

ENSAYO PROLIFERACIÓN CFSE DE 5 DÍAS

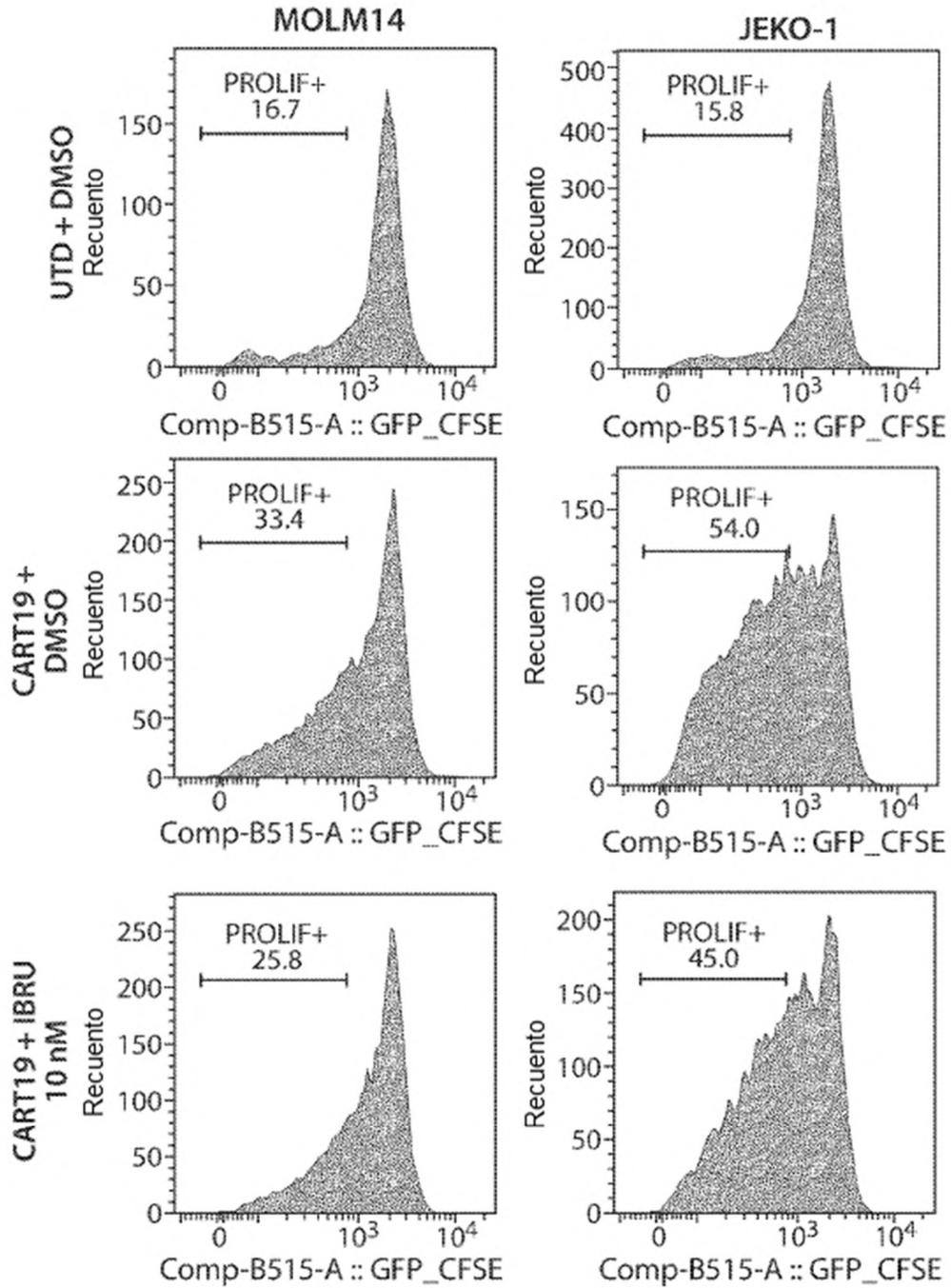


FIG. 3A-2

ENSAYO PROLIFERACIÓN CFSE DE 5 DÍAS

RL

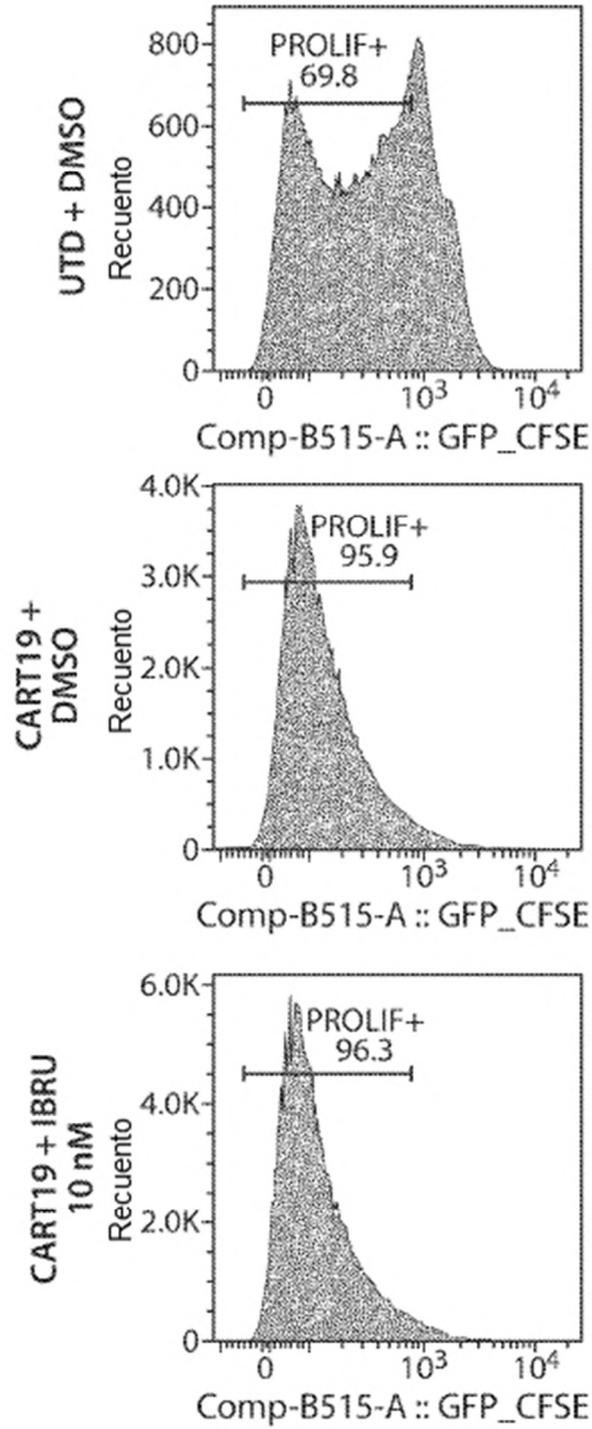


FIG. 3A-3

ENSAYO PROLIFERACIÓN CFSE DE 5 DÍAS

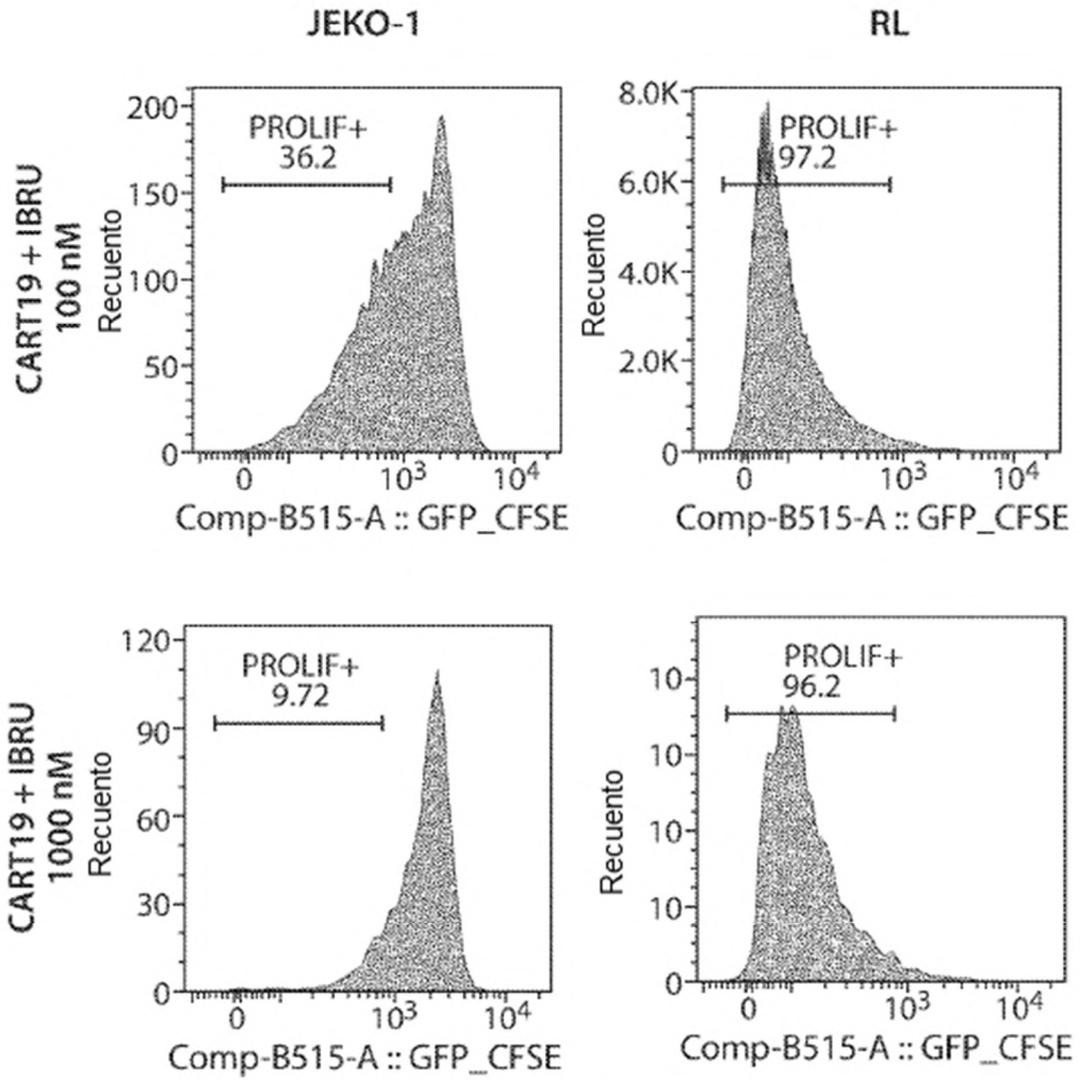
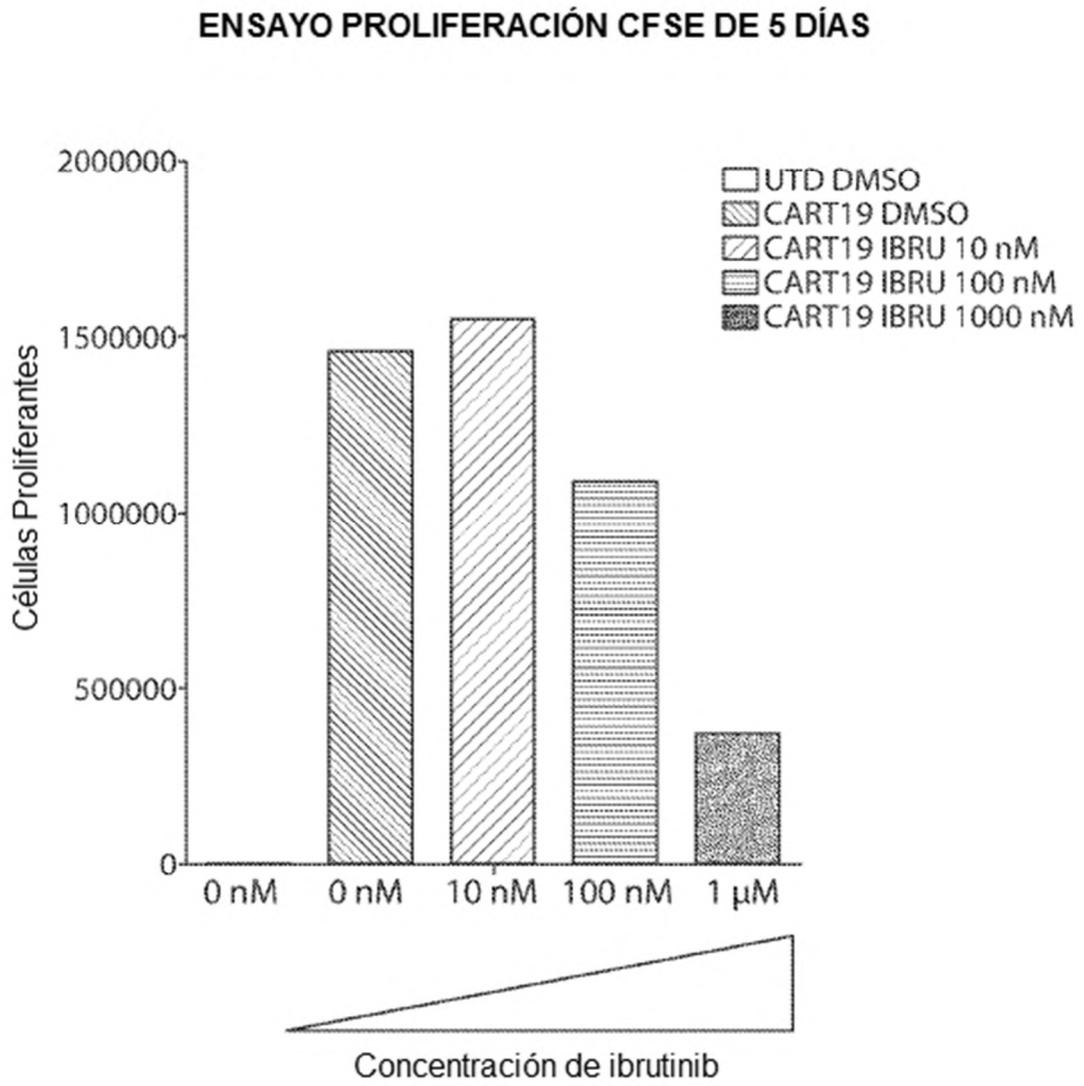
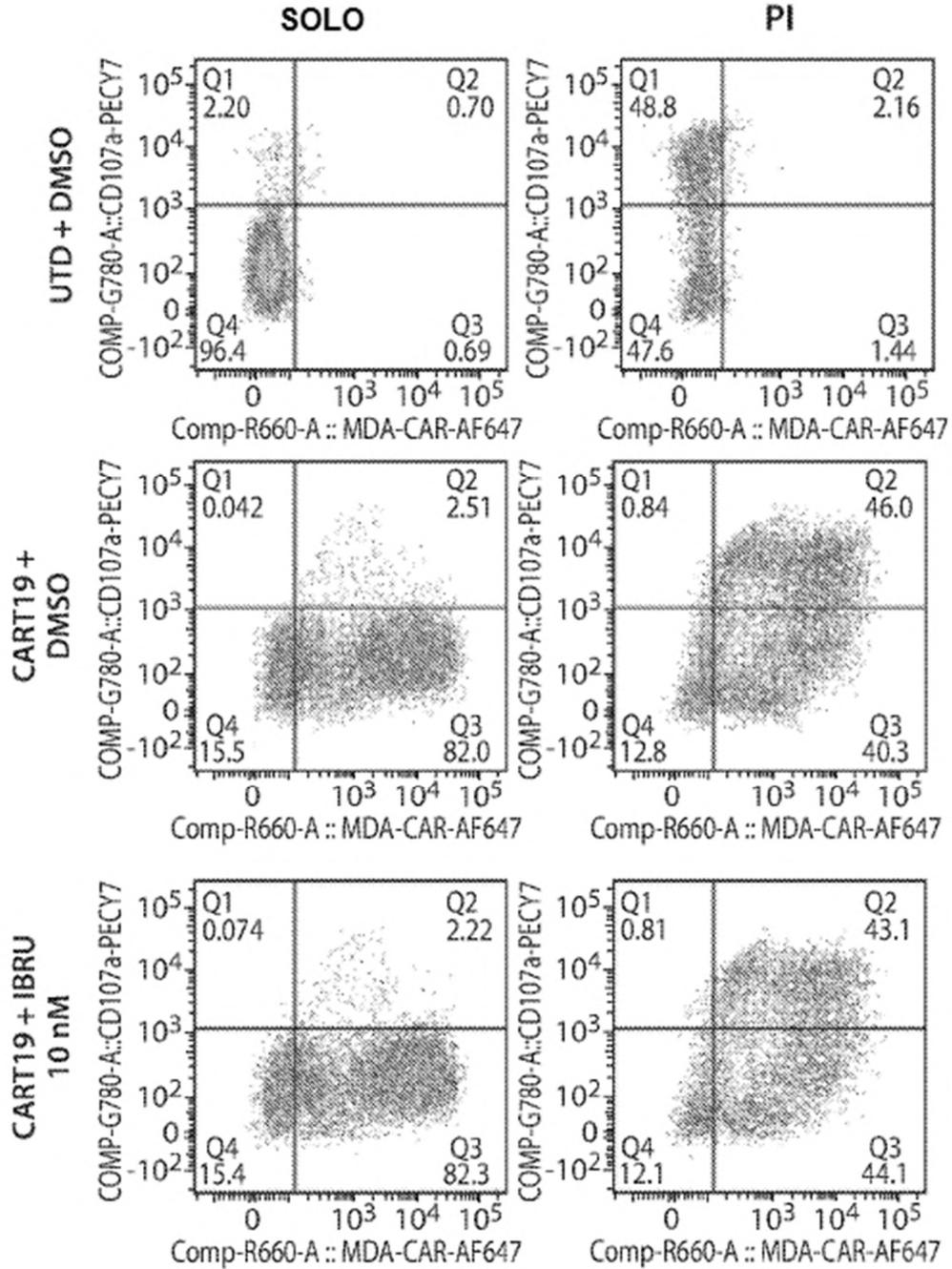


FIG. 3A-4



**FIG. 3B**

**DESGRANULACIÓN DE CD107a**



**FIG. 4A-1**

DESGRANULACIÓN DE CD107a

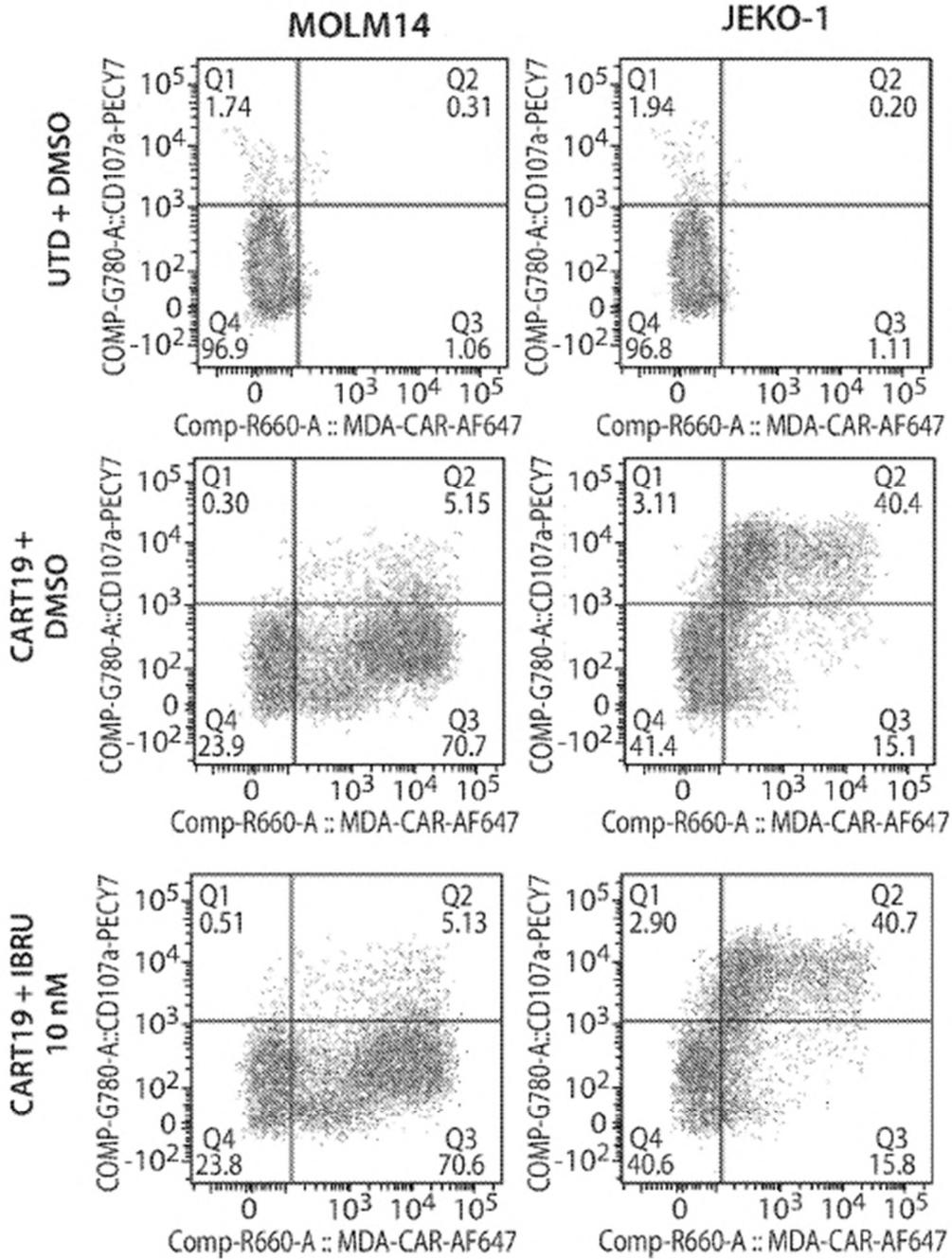


FIG. 4A-2

DESGRANULACIÓN DE CD107a

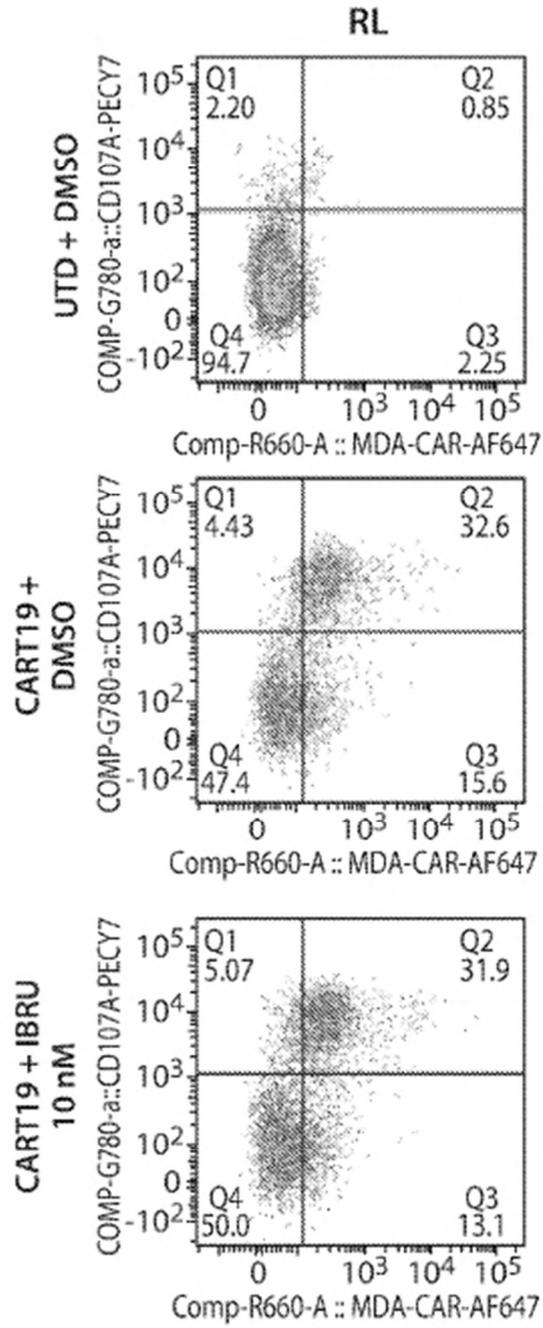


FIG. 4A-3

DESGRANULACIÓN DE CD107a

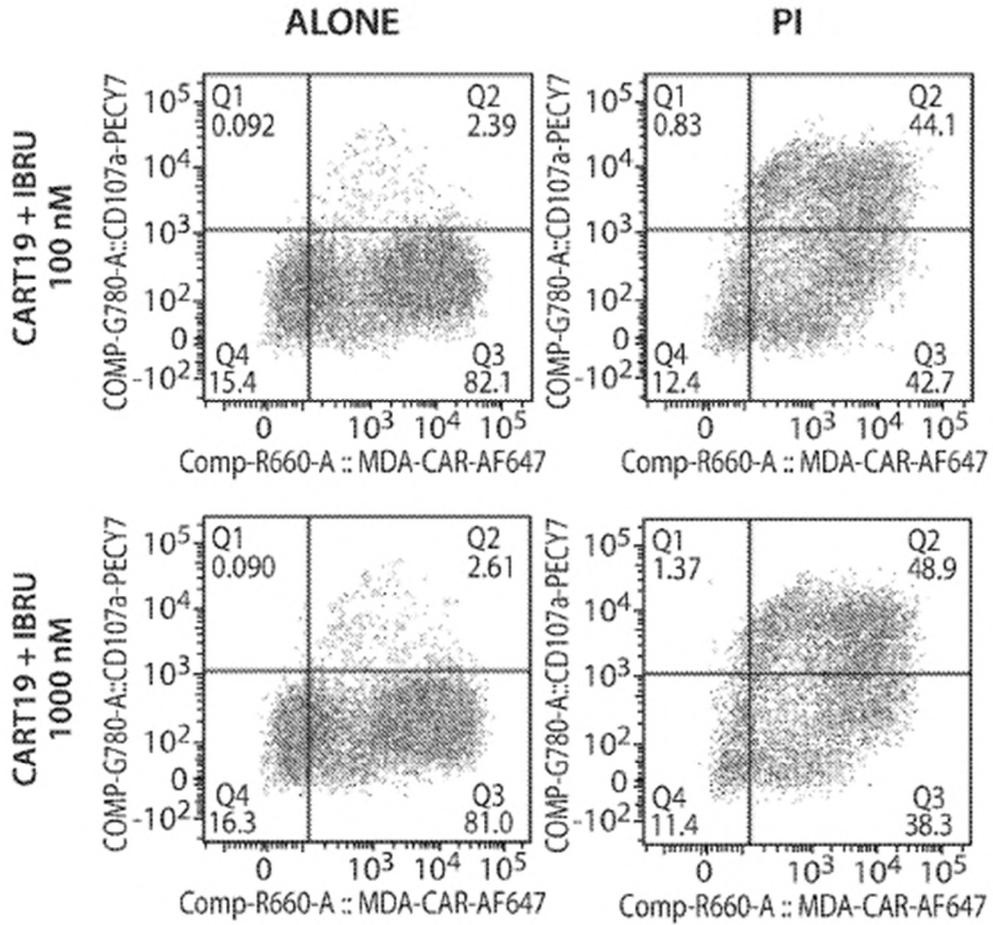


FIG. 4A-4

DESGRANULACIÓN DE CD107a

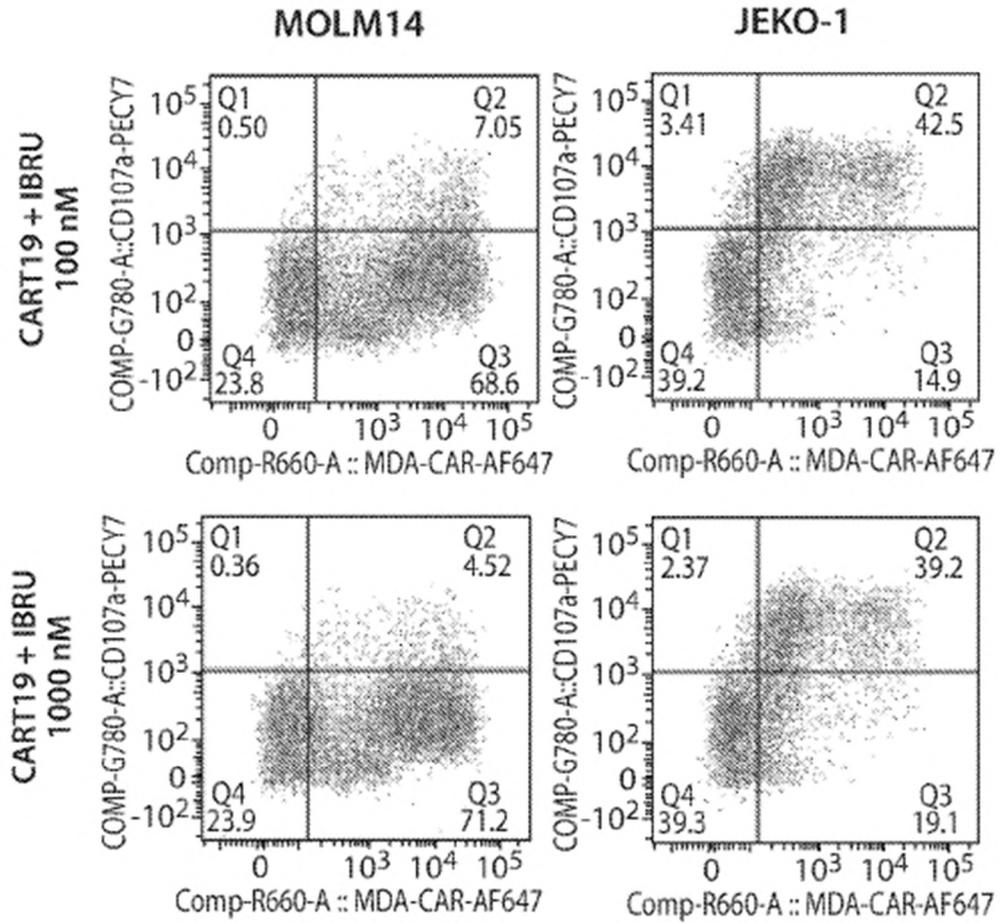


FIG. 4A-5

DESGRANULACIÓN DE CD107a

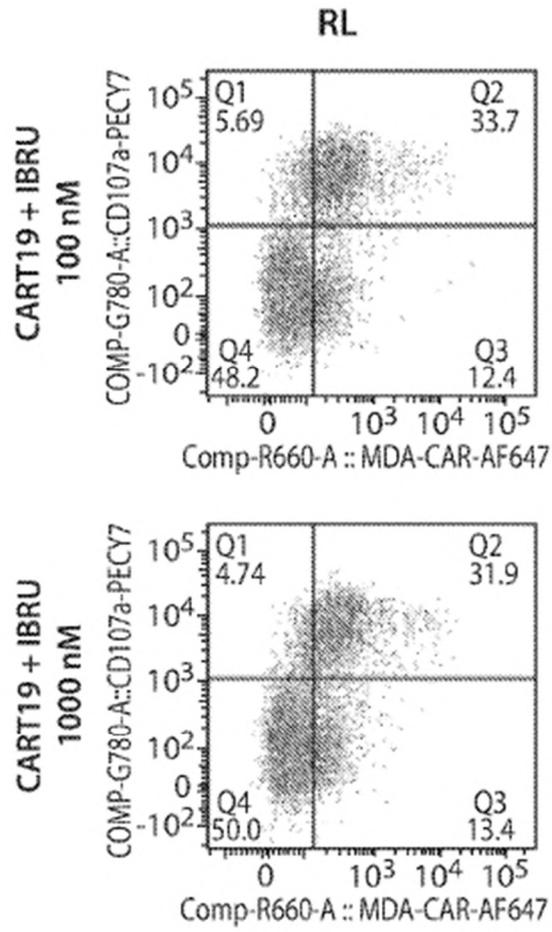


FIG. 4A-6

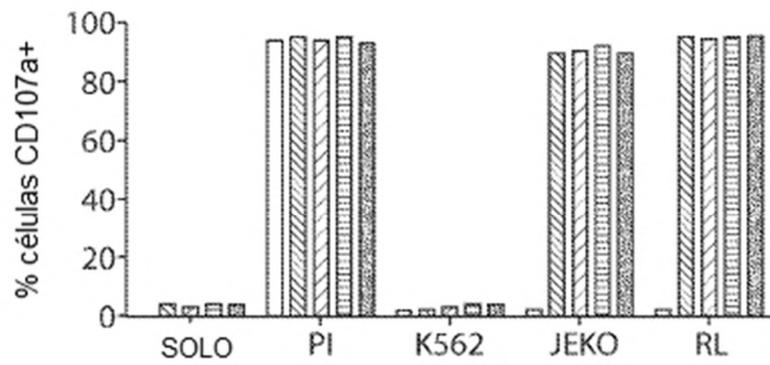
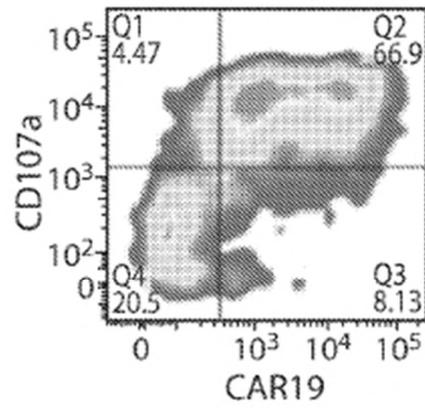


FIG. 4B

PRODUCCIÓN DE IL-2 INTRACITOPLASMÁTICA

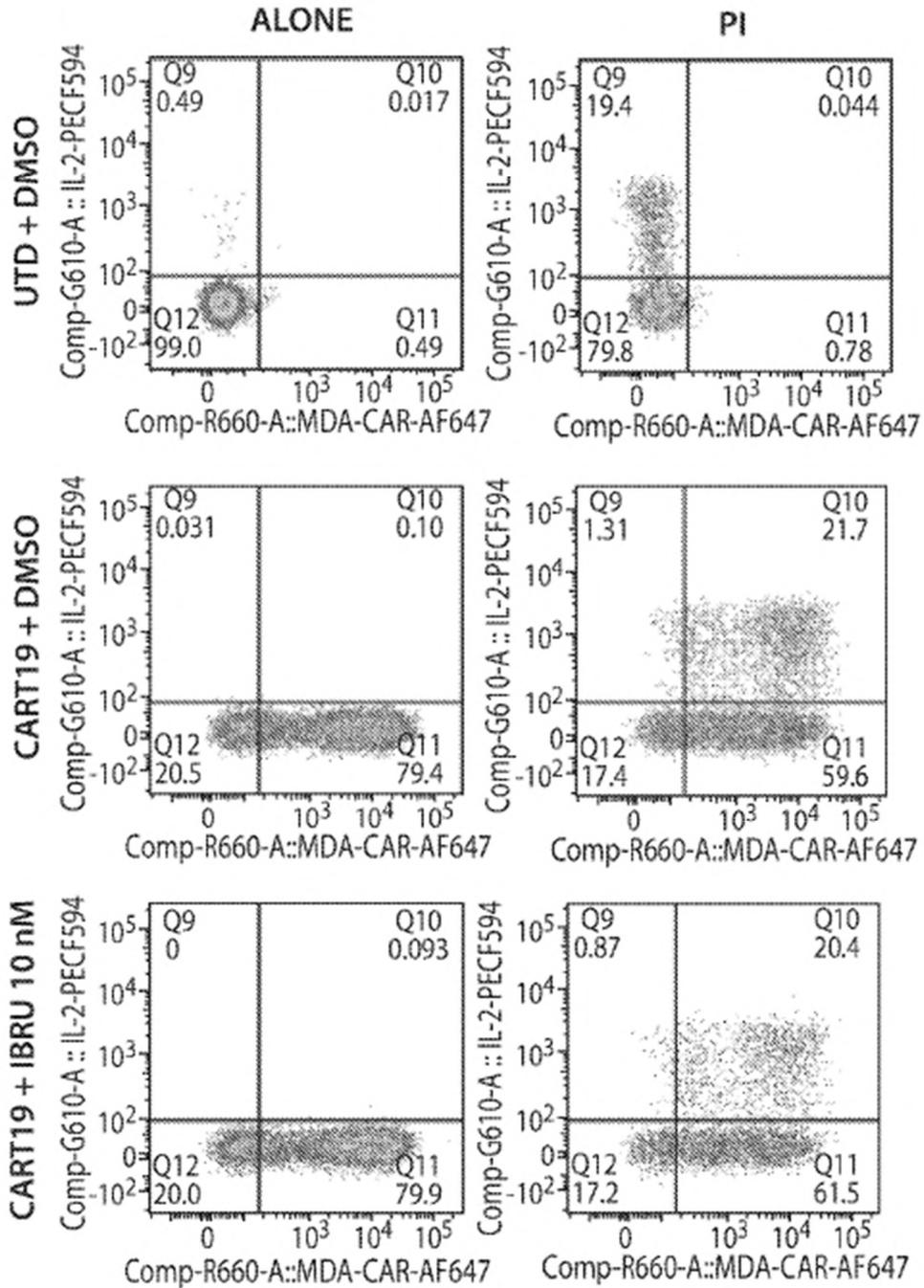


FIG. 5-1

PRODUCCIÓN DE IL-2 INTRACITOPLASMÁTICA

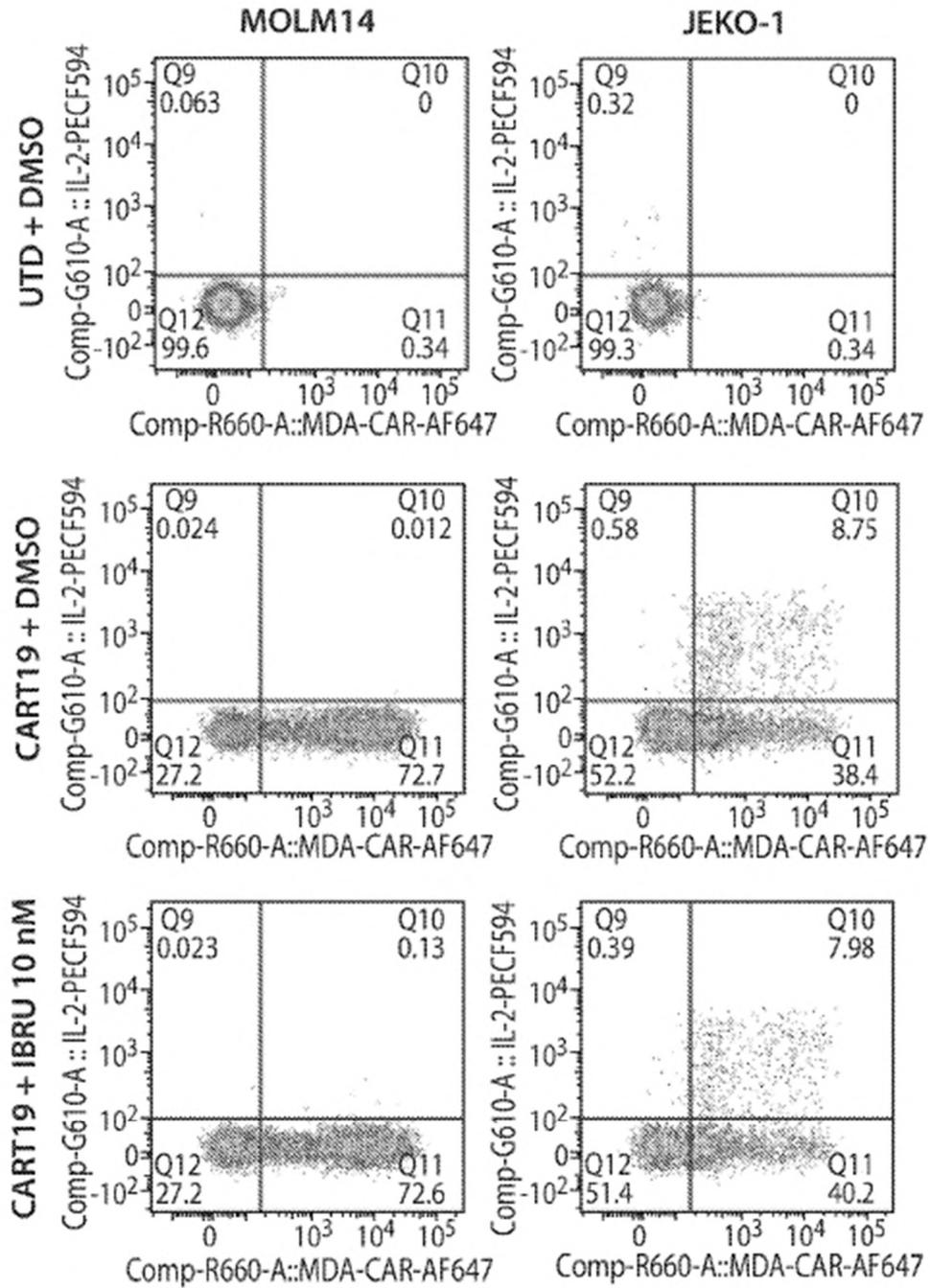
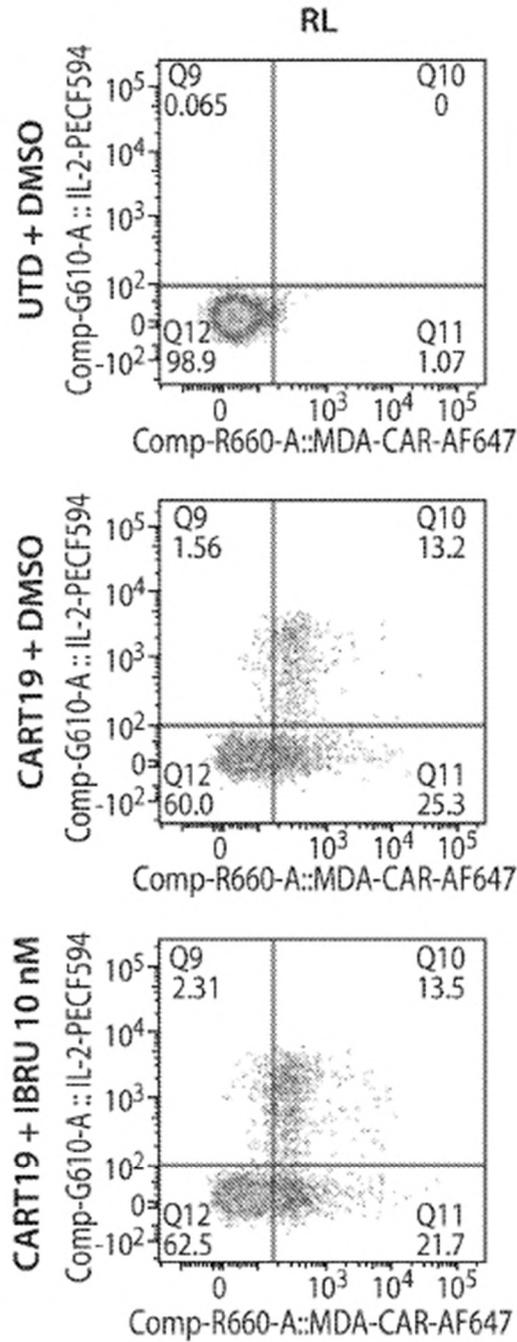


FIG. 5-2

**PRODUCCIÓN DE IL-2 INTRACITOPLASMÁTICA**



**FIG. 5-3**

PRODUCCIÓN DE IL-2 INTRACITOPLASMÁTICA

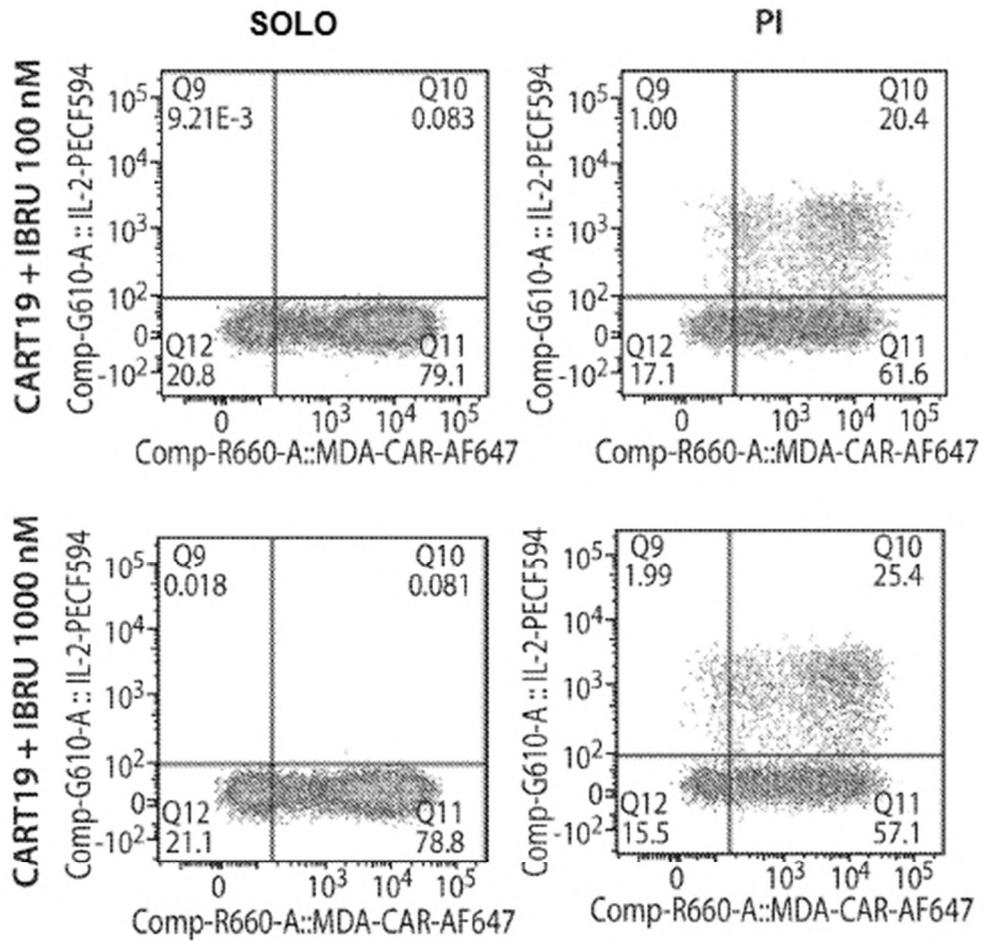


FIG. 5-4

PRODUCCIÓN DE IL-2 INTRACITOPLASMÁTICA

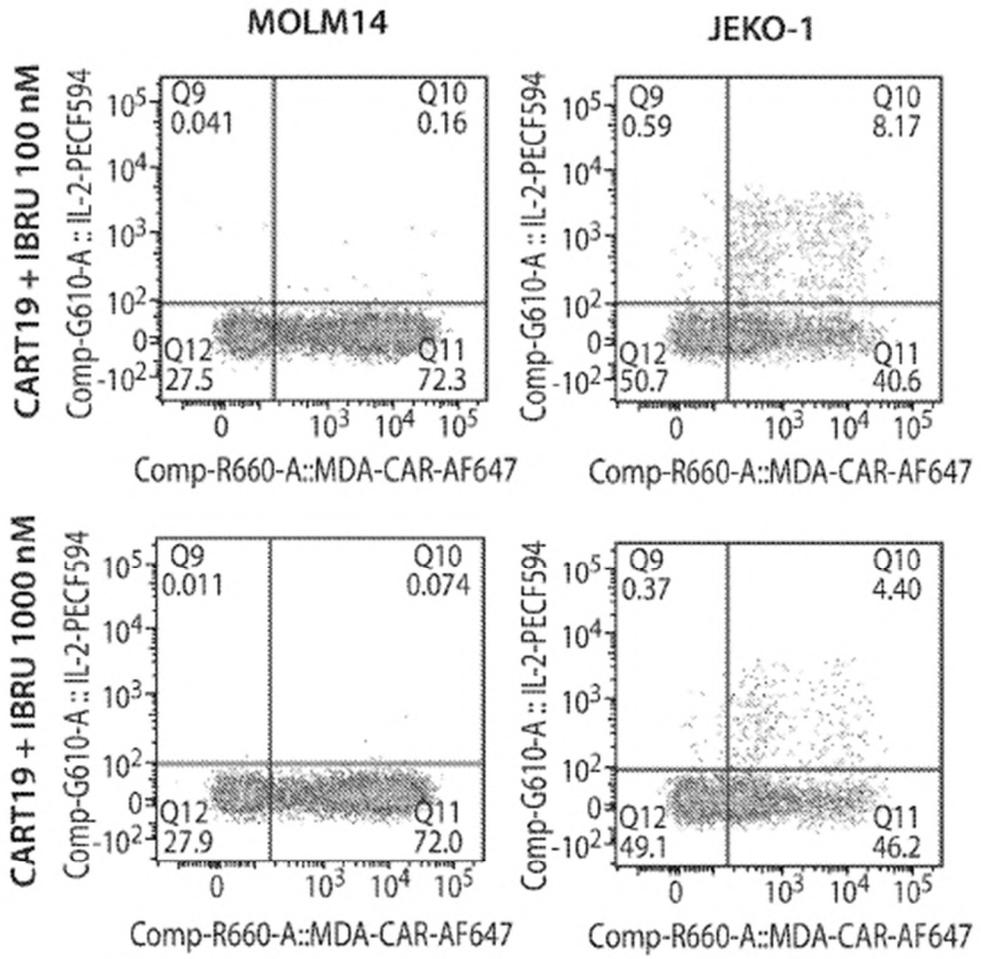


FIG. 5-5

PRODUCCIÓN DE IL-2 INTRACITOPLASMÁTICA

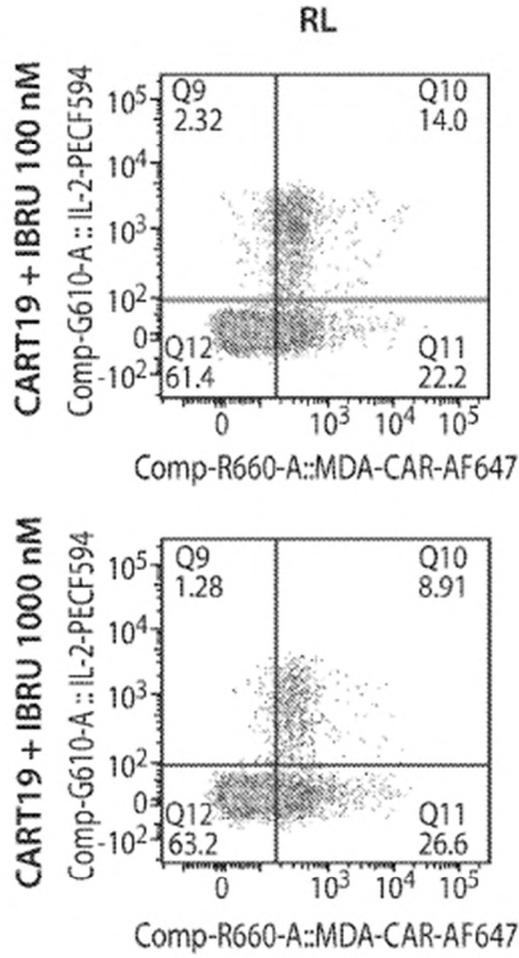
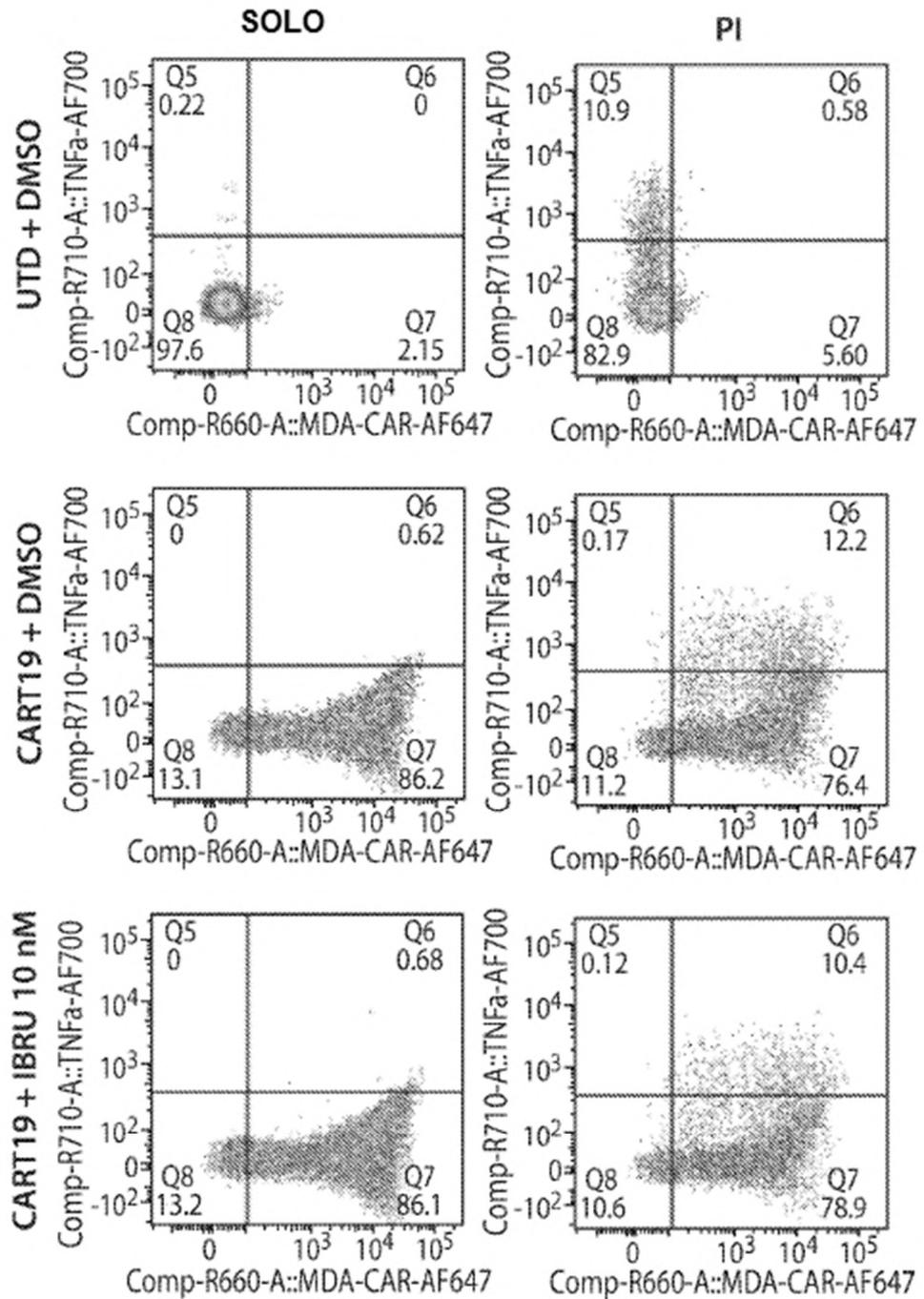


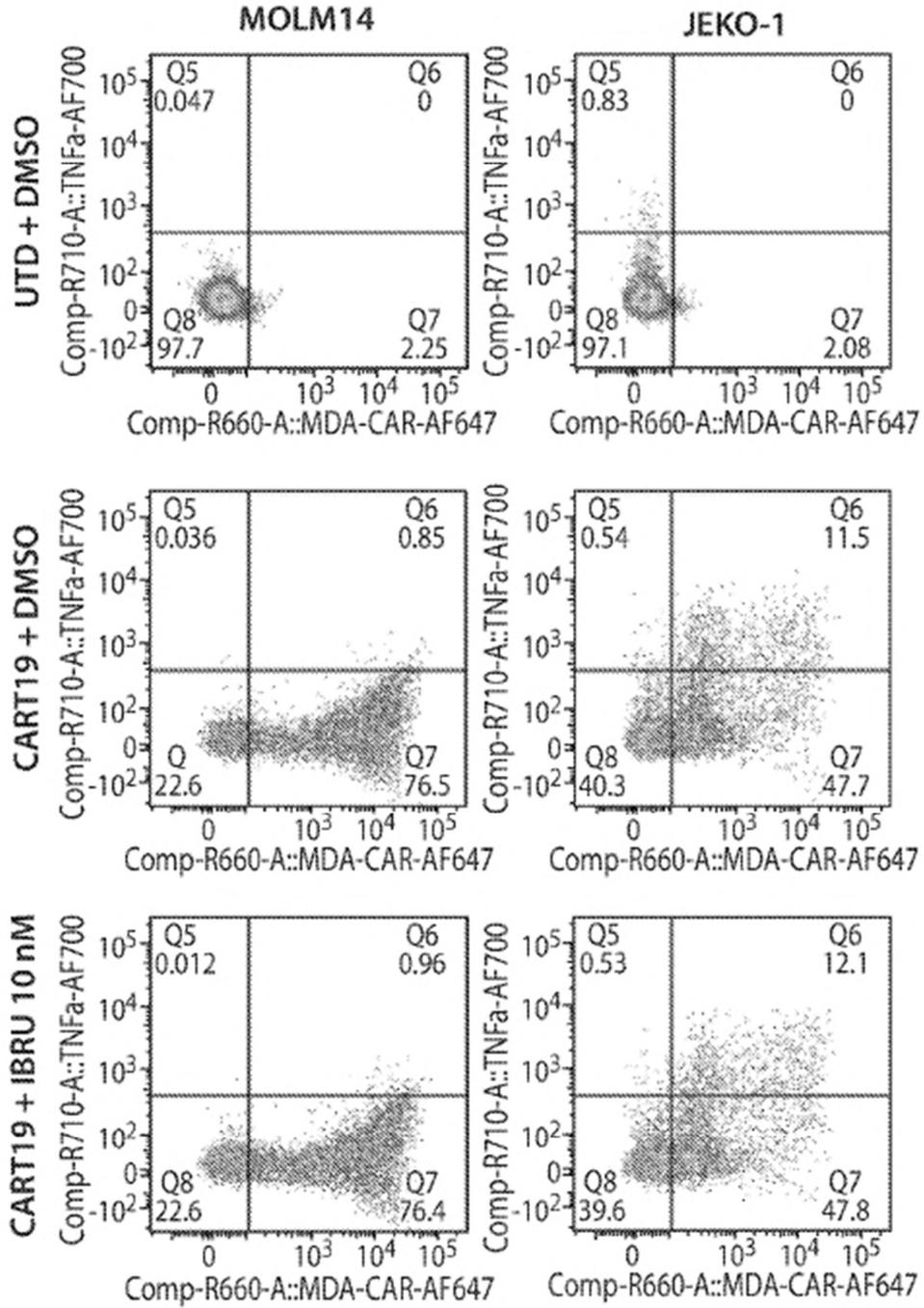
FIG. 5-6

**PRODUCCIÓN DE TNF $\alpha$  INTRACITOPLASMÁTICA**



**FIG. 6-1**

**PRODUCCIÓN DE TNFa CITOPLASMÁTICA**



**FIG. 6-2**

PRODUCCIÓN DE TNFa CITOPLASMÁTICA

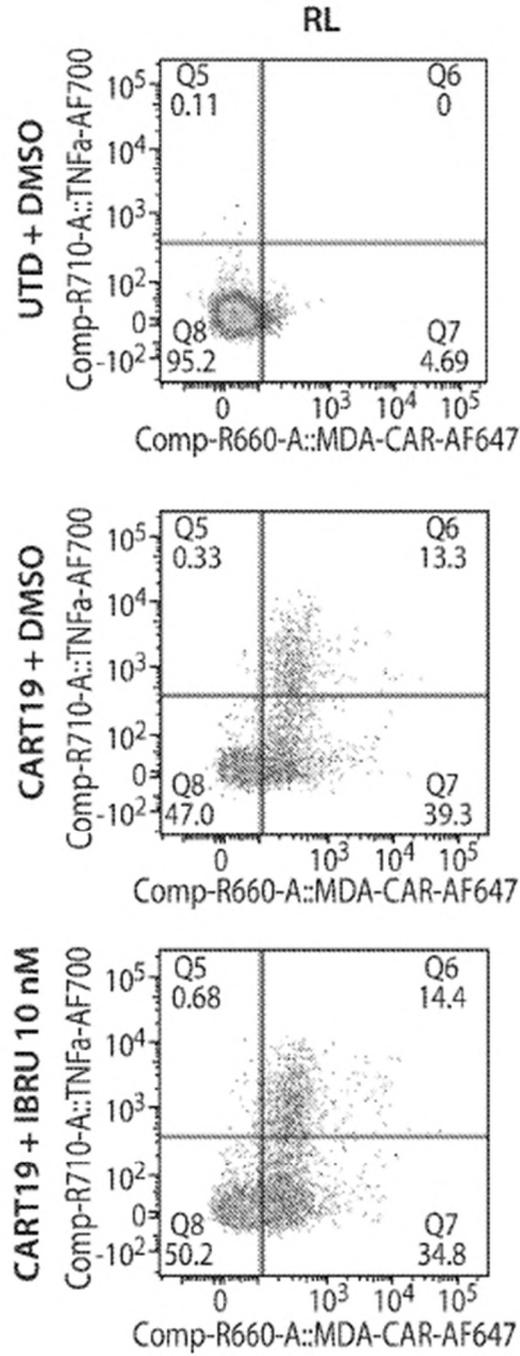


FIG. 6-3

PRODUCCIÓN DE TNF $\alpha$  CITOPLASMÁTICA

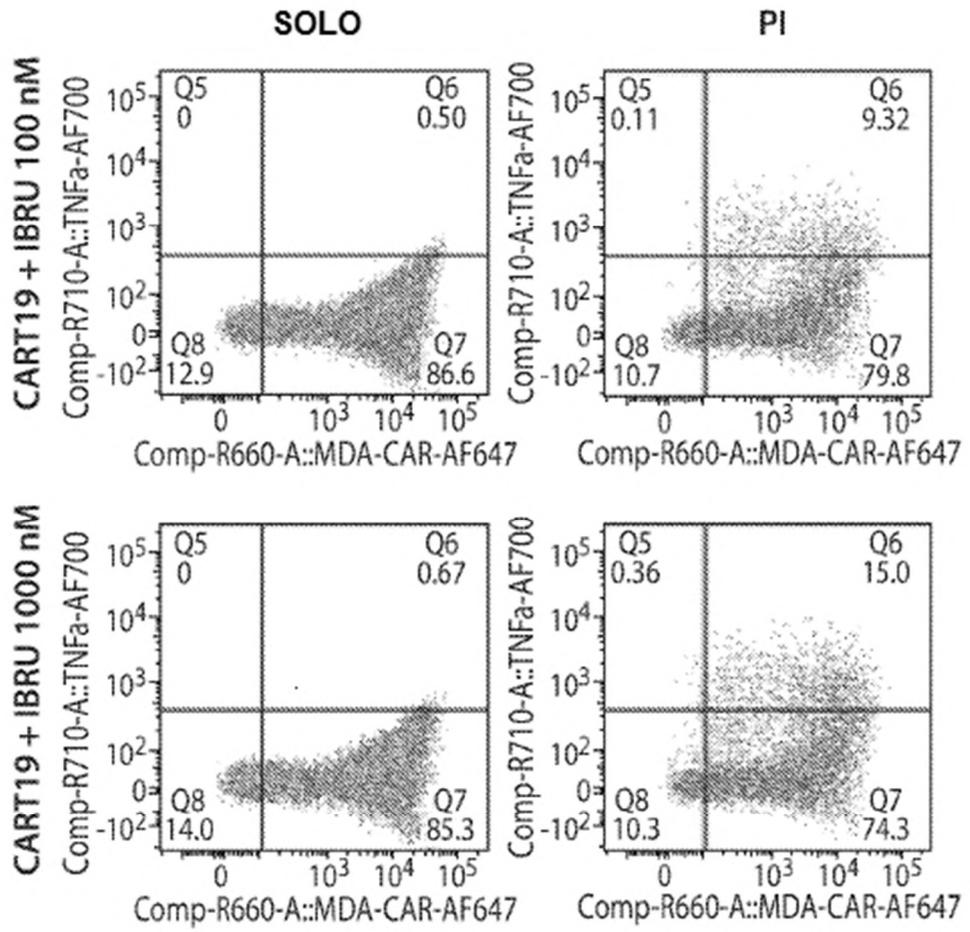


FIG. 6-4

PRODUCCIÓN DE TNF $\alpha$  CITOPLASMÁTICA

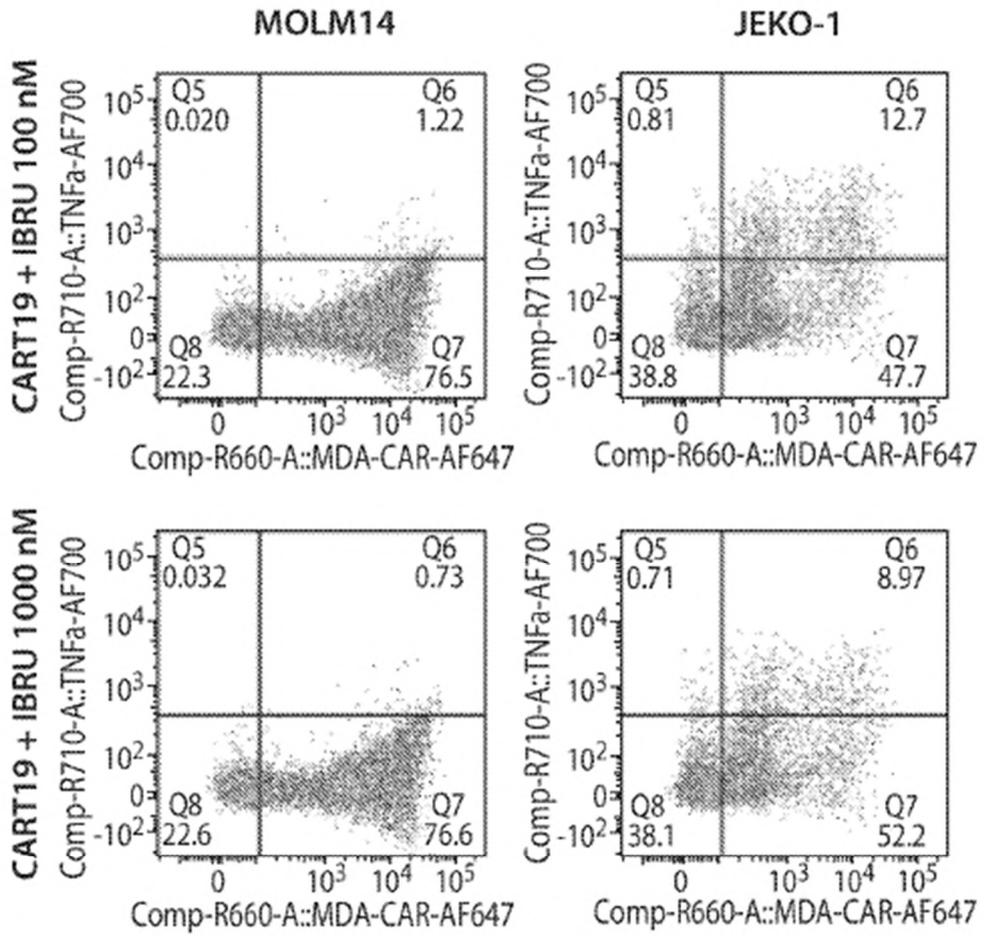


FIG. 6-5

PRODUCCIÓN DE TNF $\alpha$  CITOPLASMÁTICA

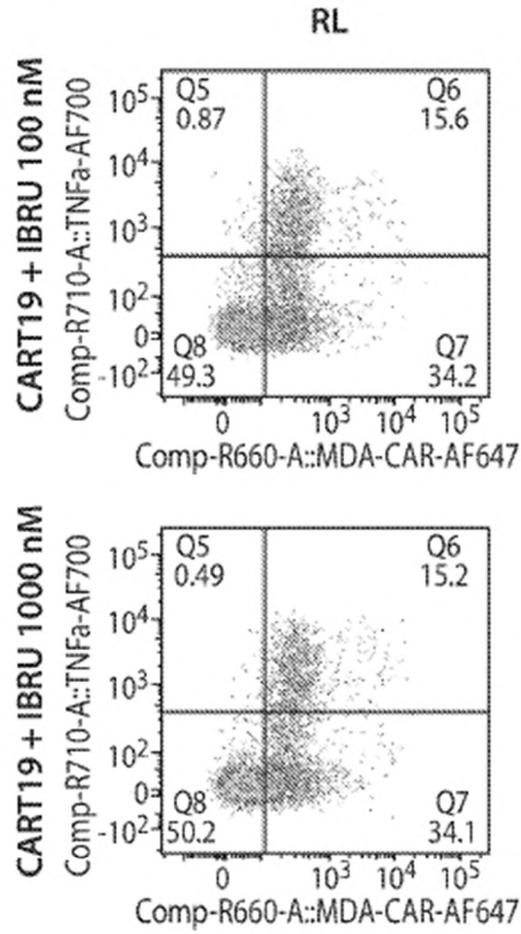
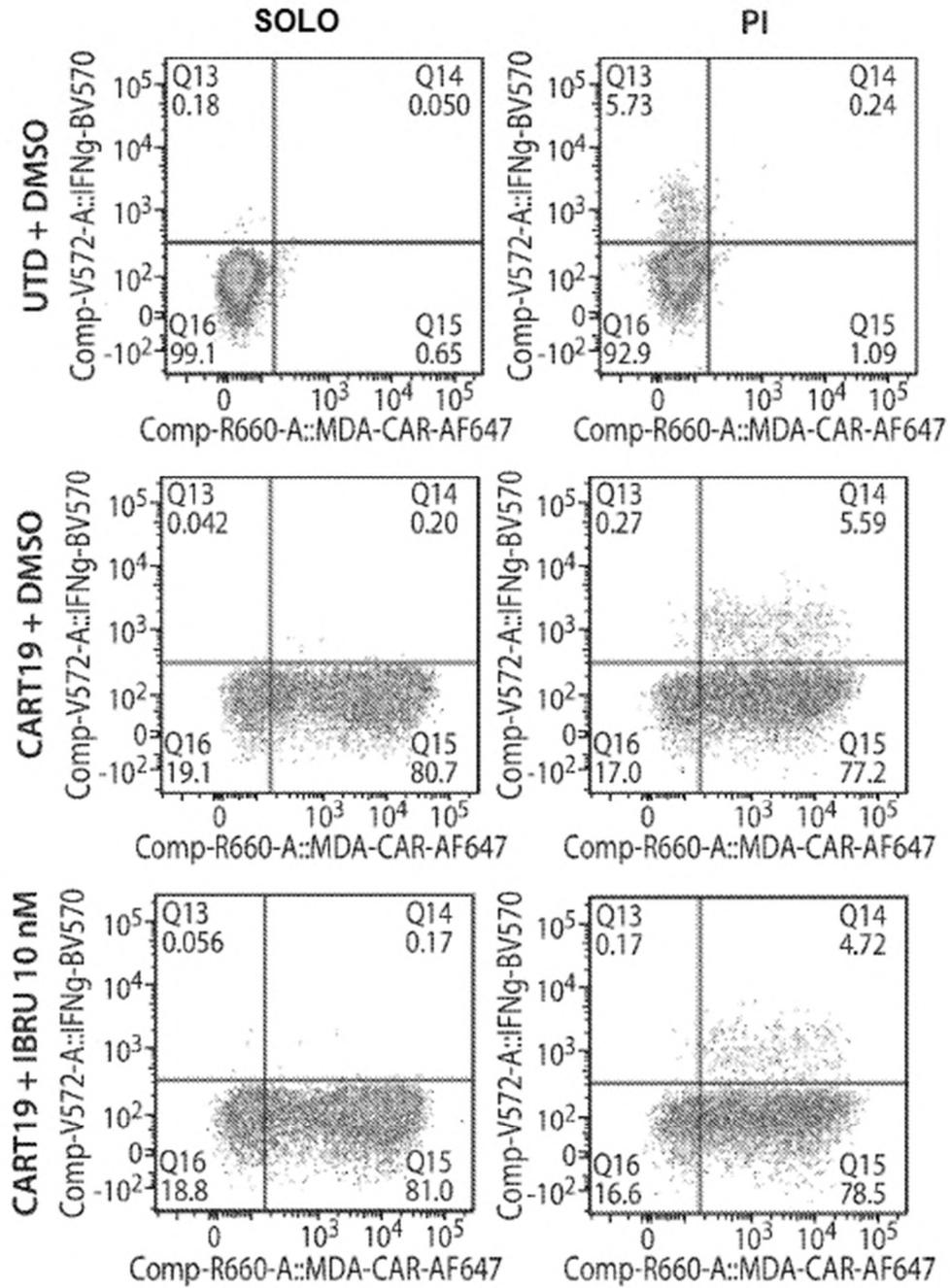


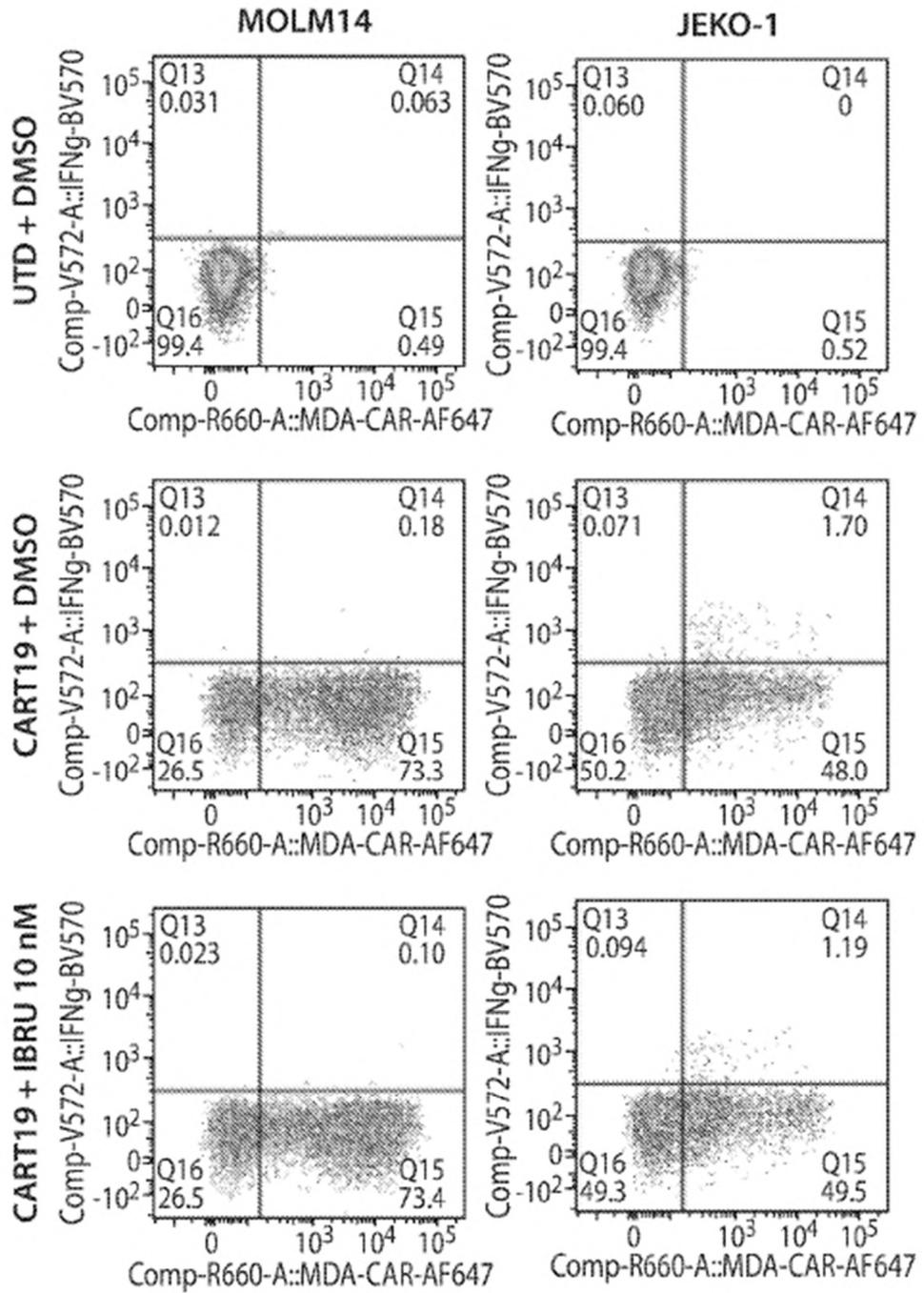
FIG. 6-6

**PRODUCCIÓN DE IFN $\gamma$  CITOPLASMÁTICA**



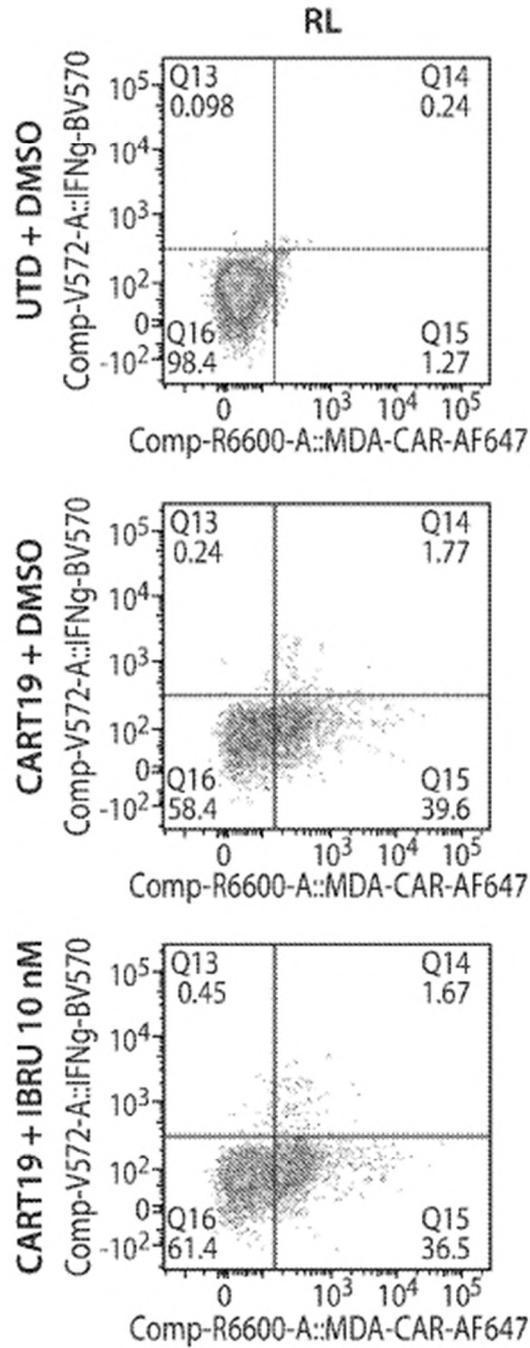
**FIG. 7-1**

**PRODUCCIÓN DE IFN $\gamma$  CITOPLASMÁTICA**



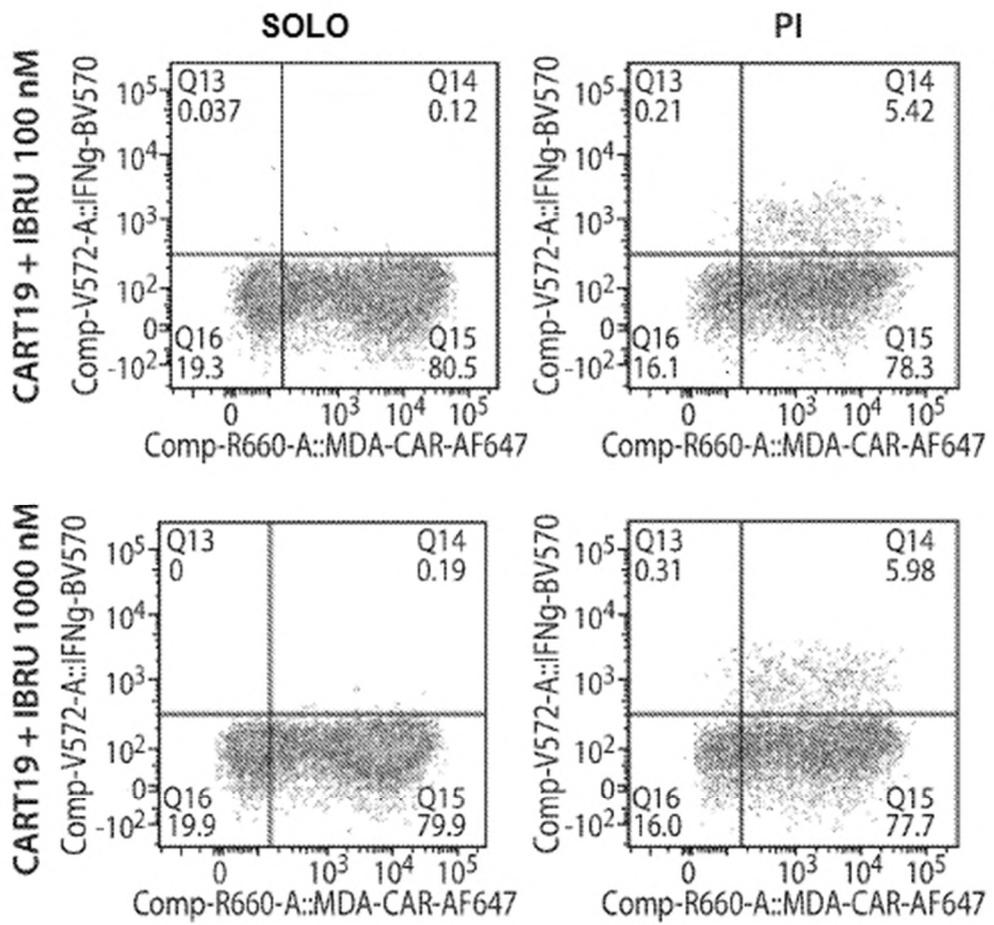
**FIG. 7-2**

**PRODUCCIÓN DE IFN $\gamma$  CITOPLASMÁTICA**



**FIG. 7-3**

**PRODUCCIÓN DE IFN $\gamma$  INTRACITOPLASMÁTICA**



**FIG. 7-4**

PRODUCCIÓN DE IFN $\gamma$  INTRACITOPLASMÁTICA

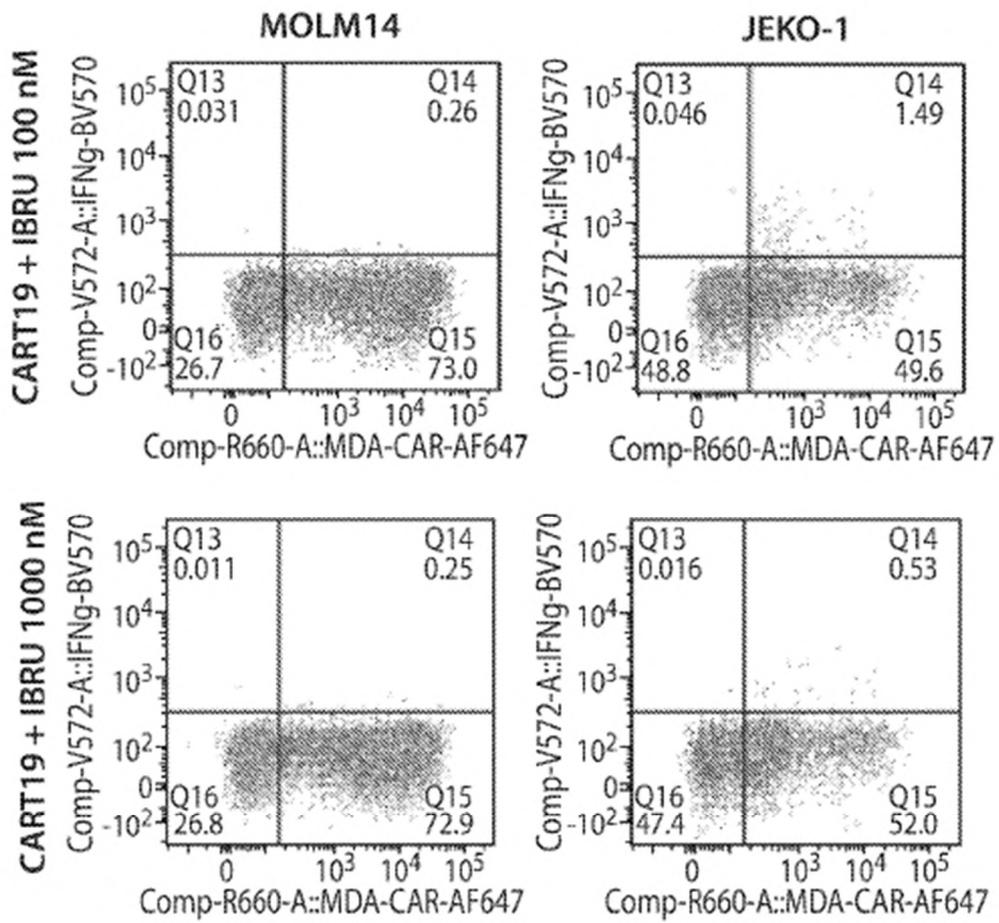


FIG. 7-5

PRODUCCIÓN DE IFN $\gamma$  INTRACITOPLASMÁTICA

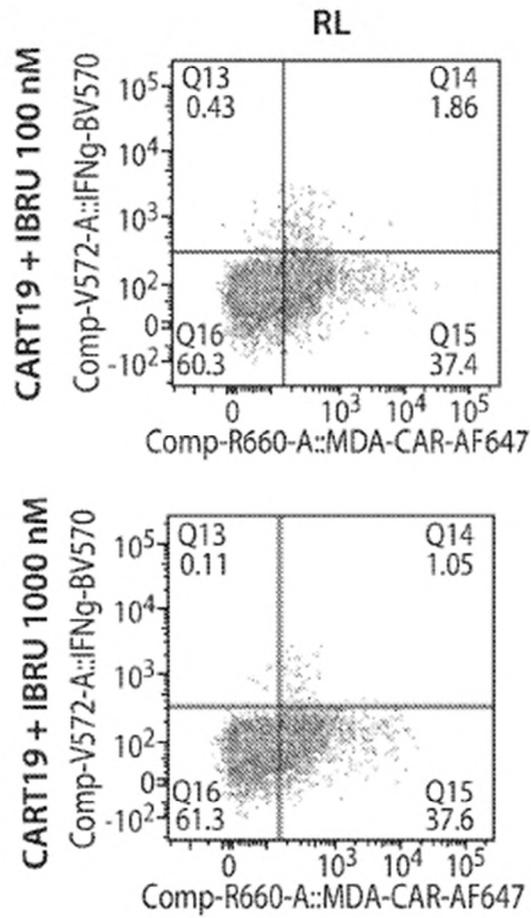


FIG. 7-6

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

Th-1

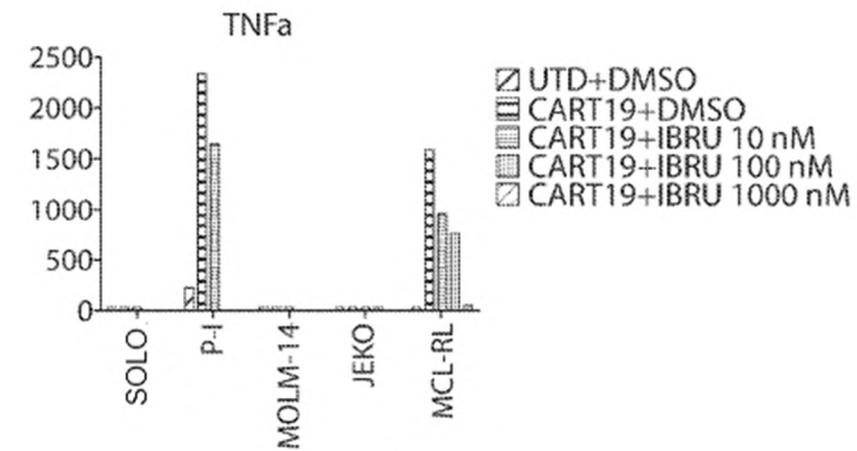
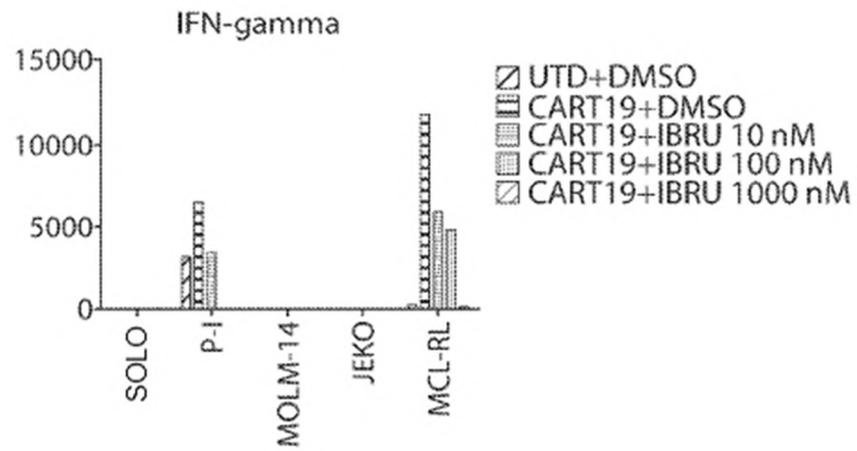
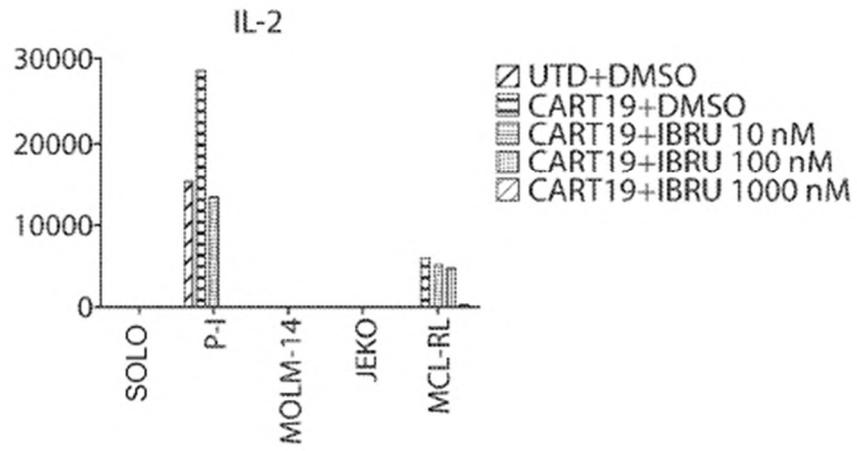


FIG. 8-1

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

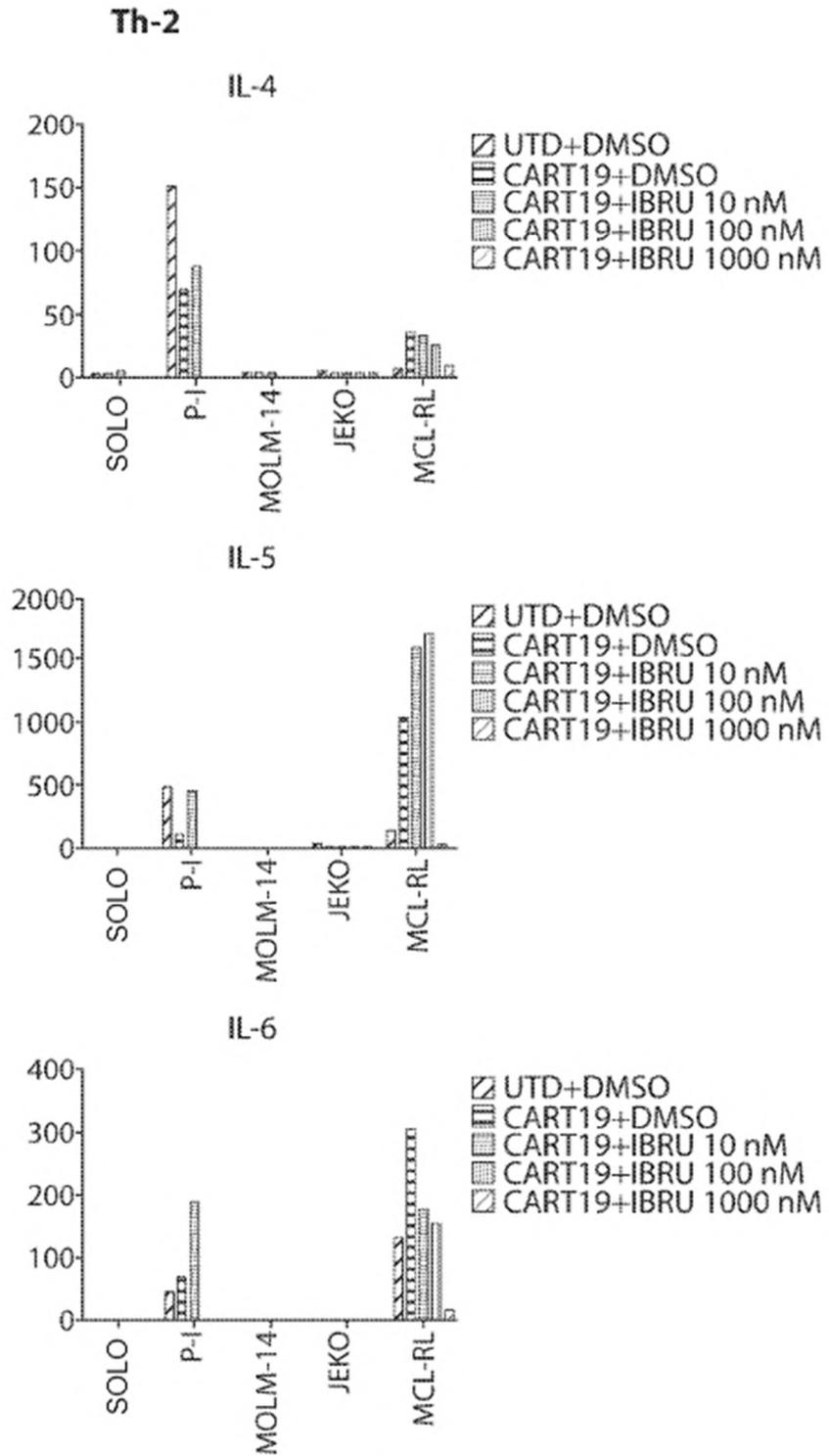


FIG. 8-2

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

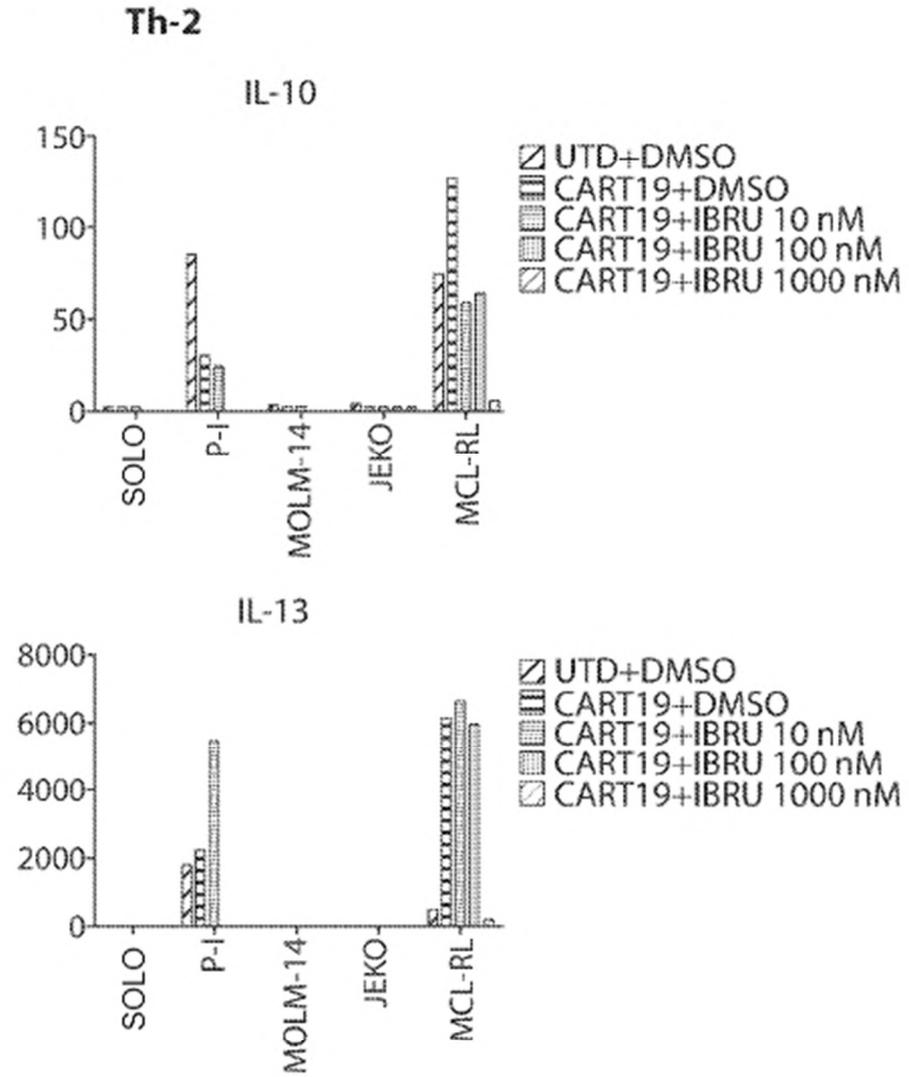


FIG. 8-3

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

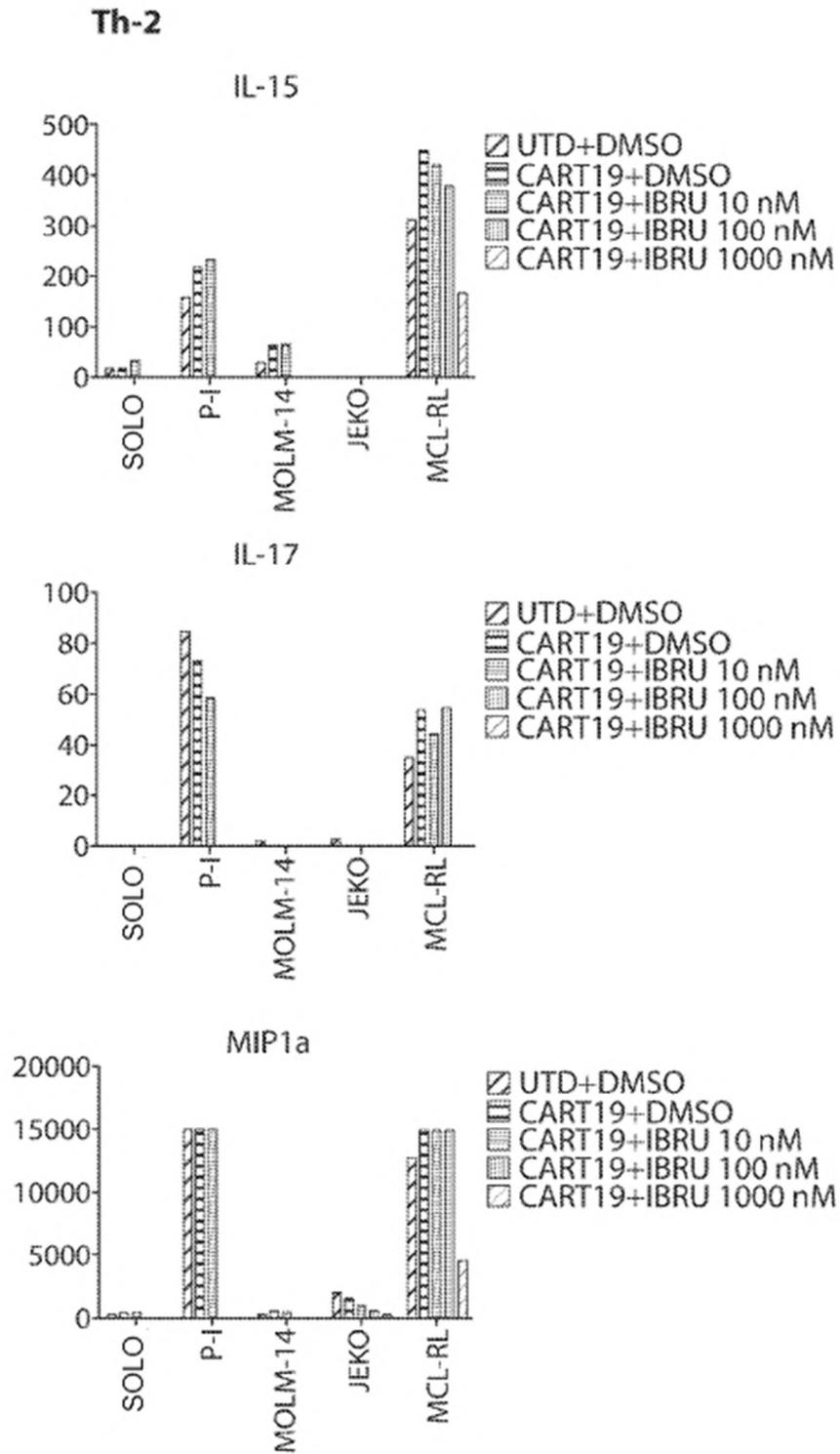


FIG. 8-4

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

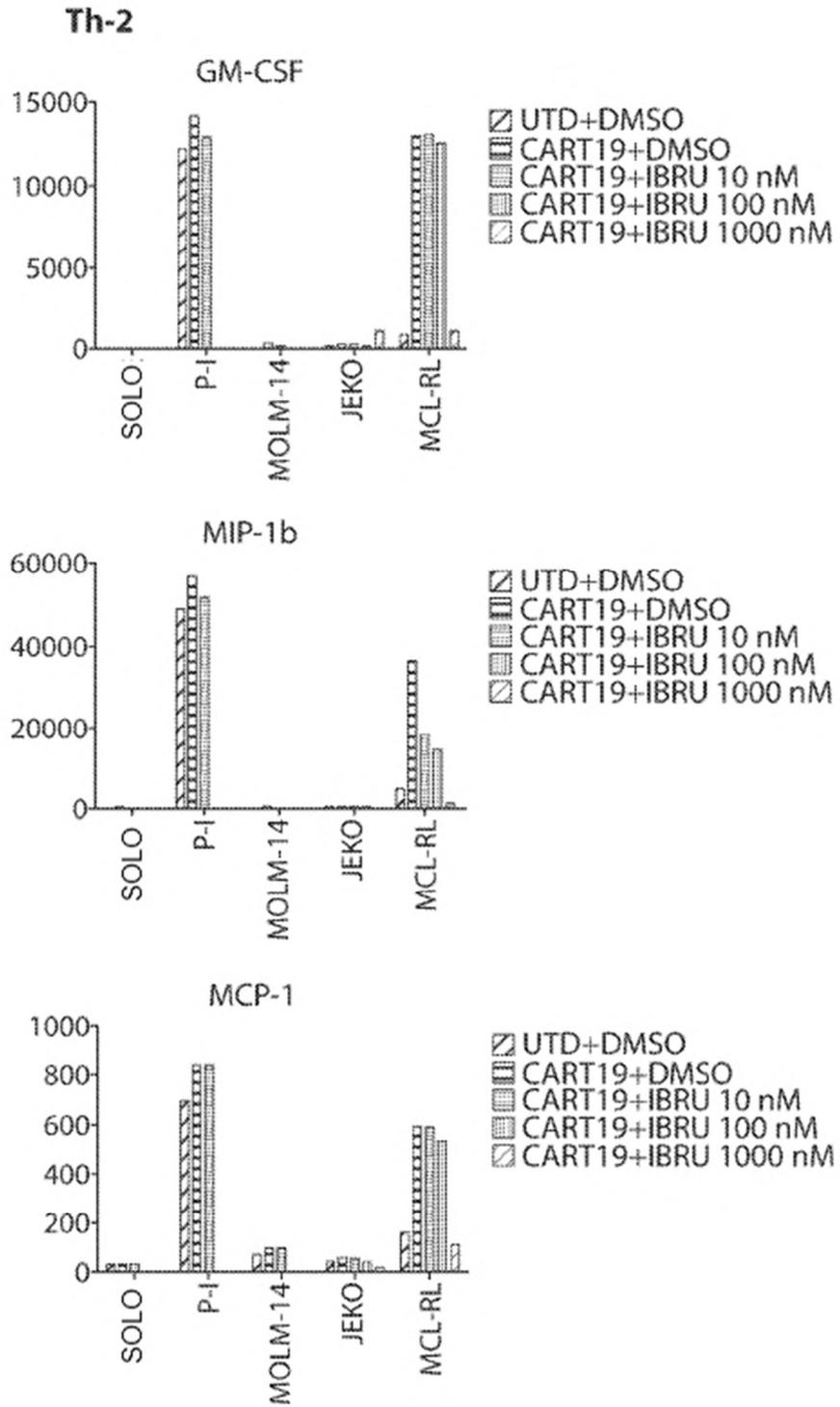


FIG. 8-5

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

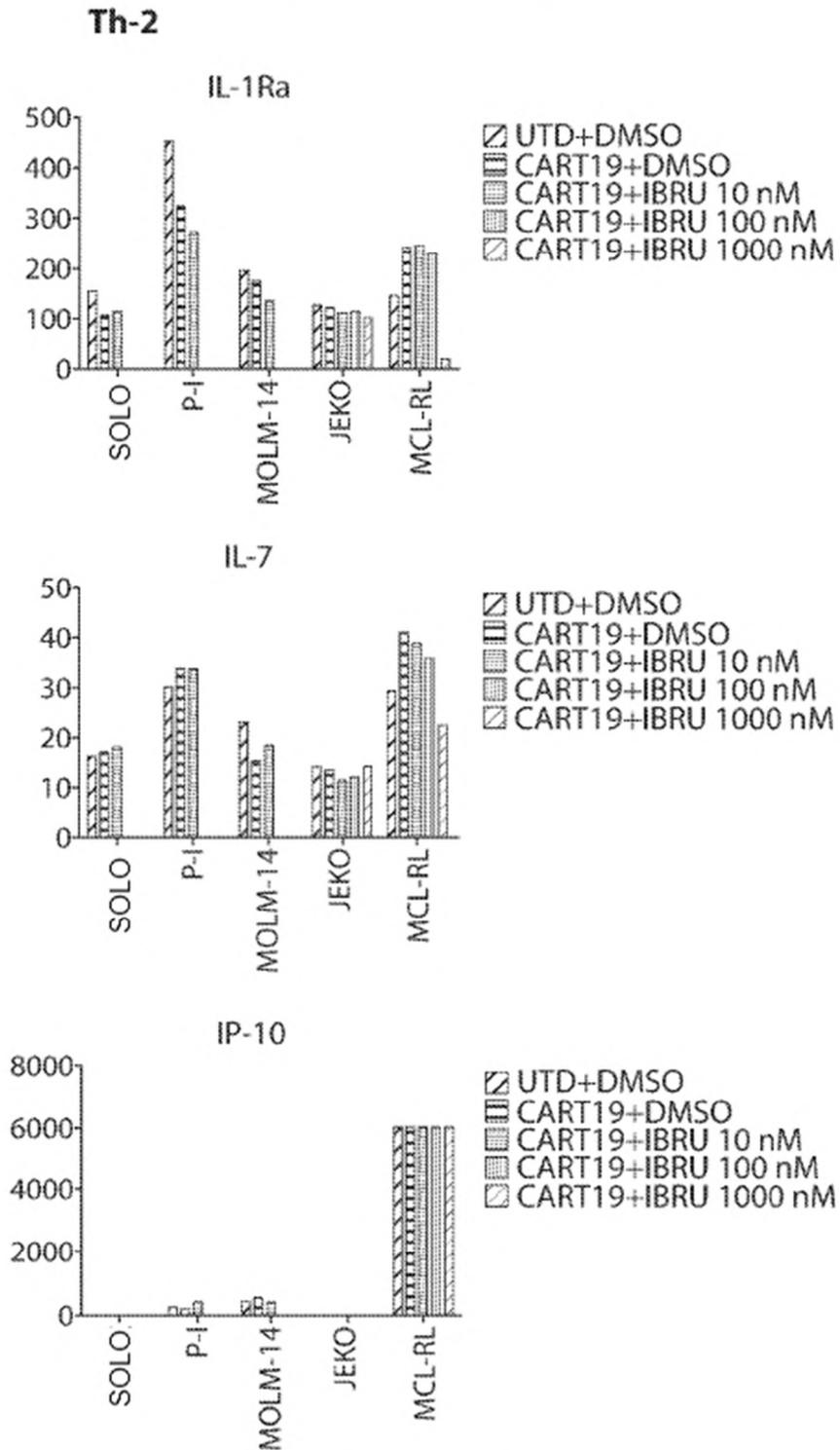


FIG. 8-6

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

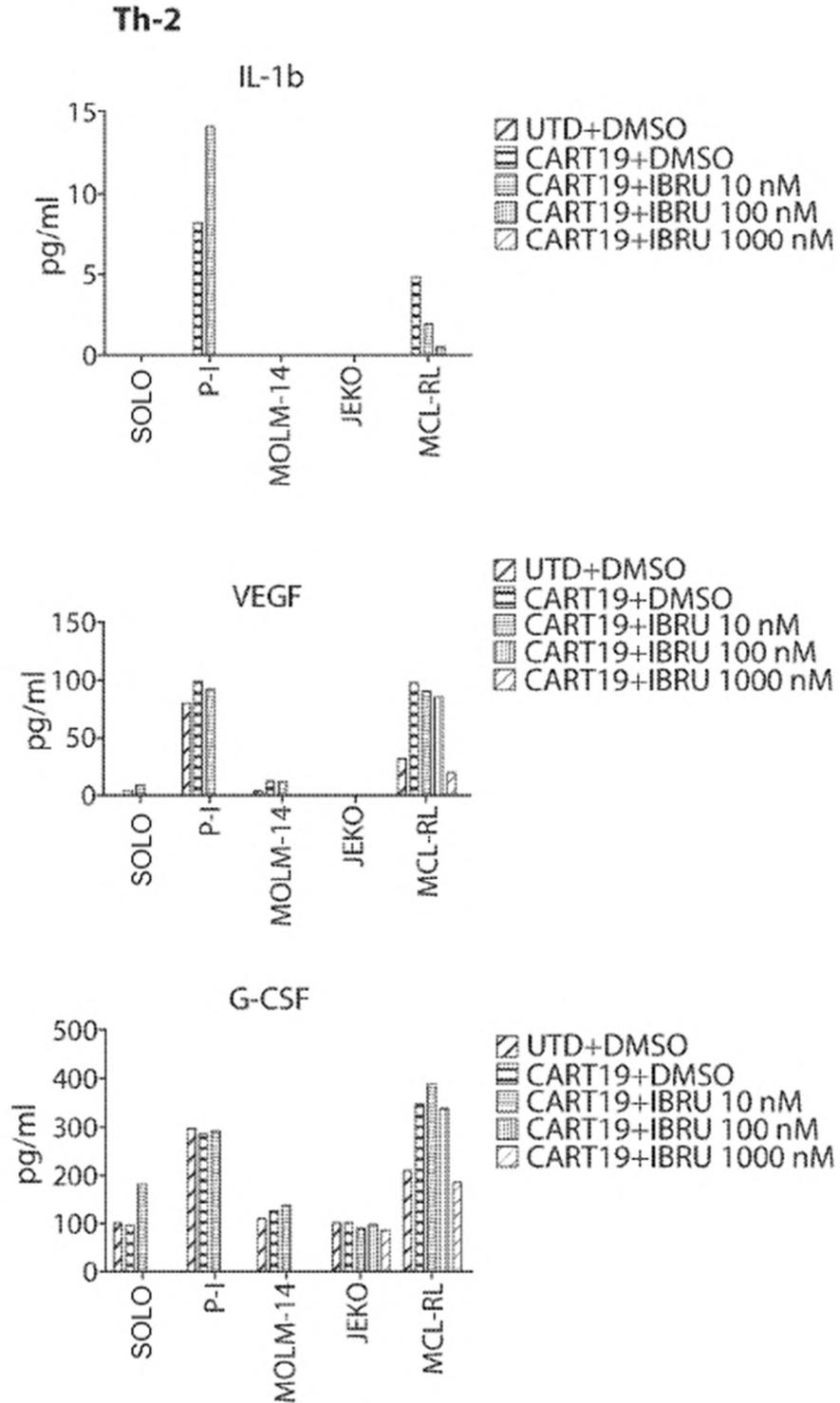


FIG. 8-7

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

Th-2

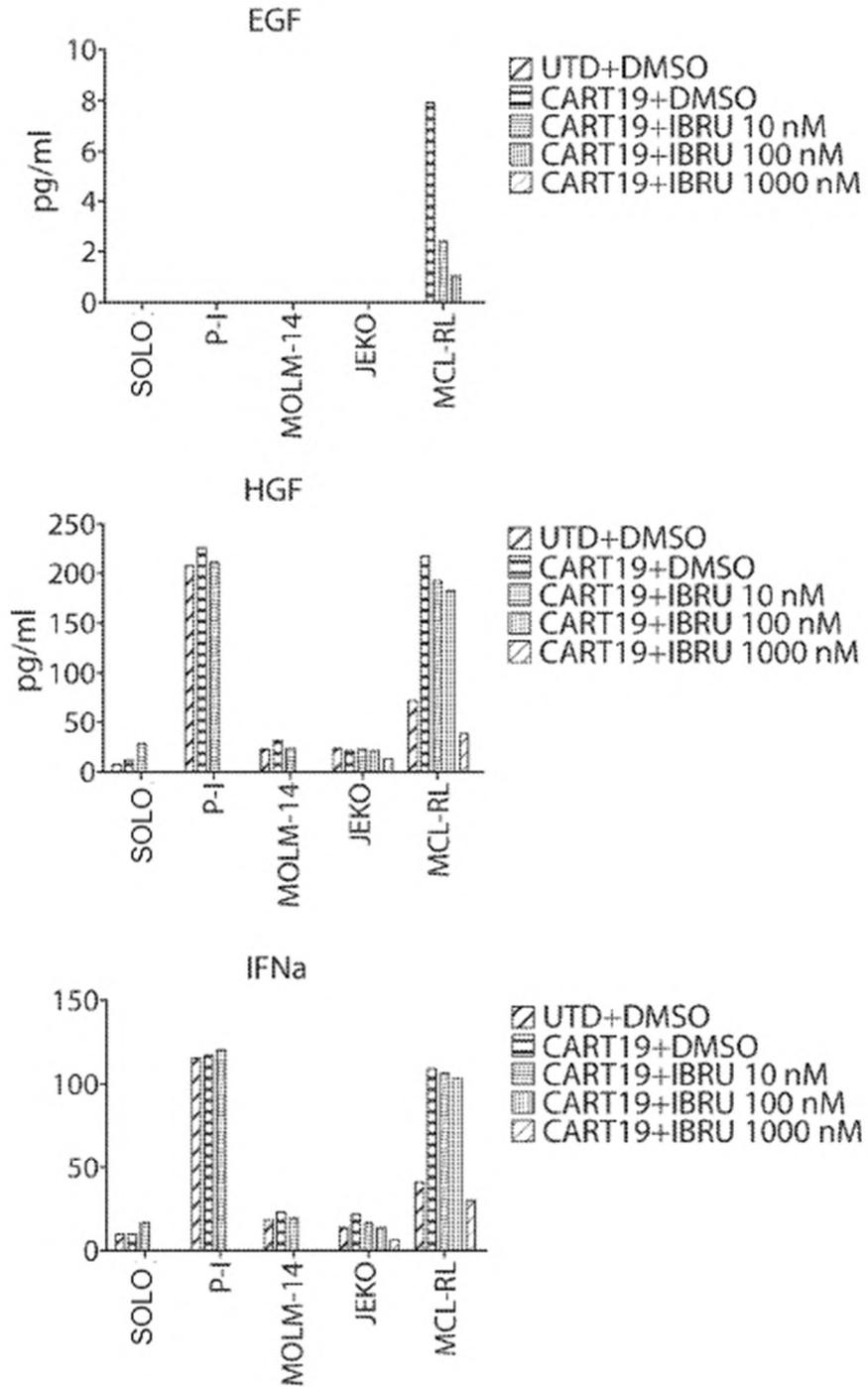
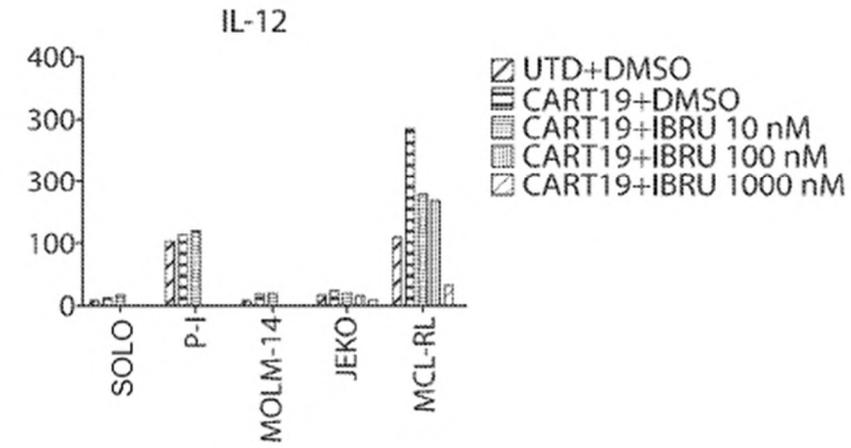


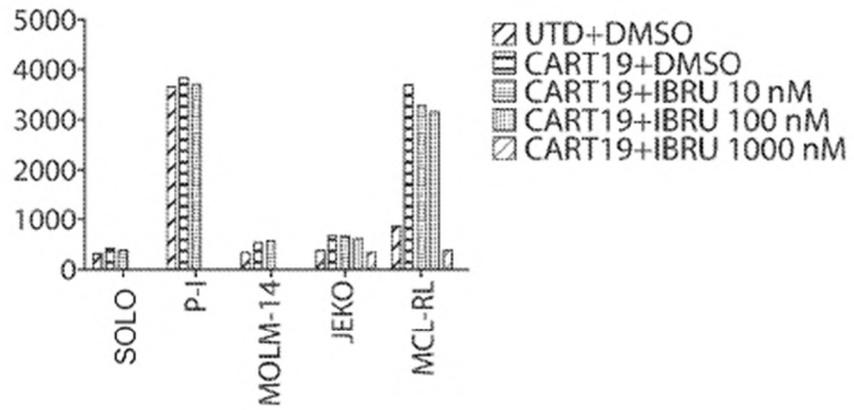
FIG. 8-8

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

Th-2



RANTES



Eotaxin

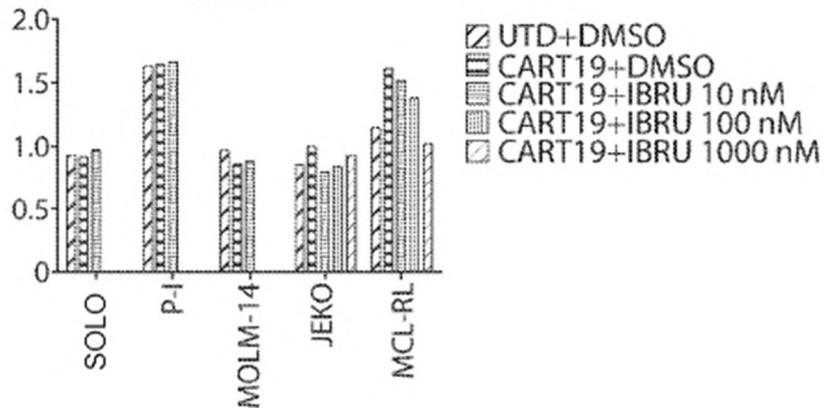


FIG. 8-9

SECRECIÓN DE CITOQUINA 72 H (LUMINEX DE 30-plex)

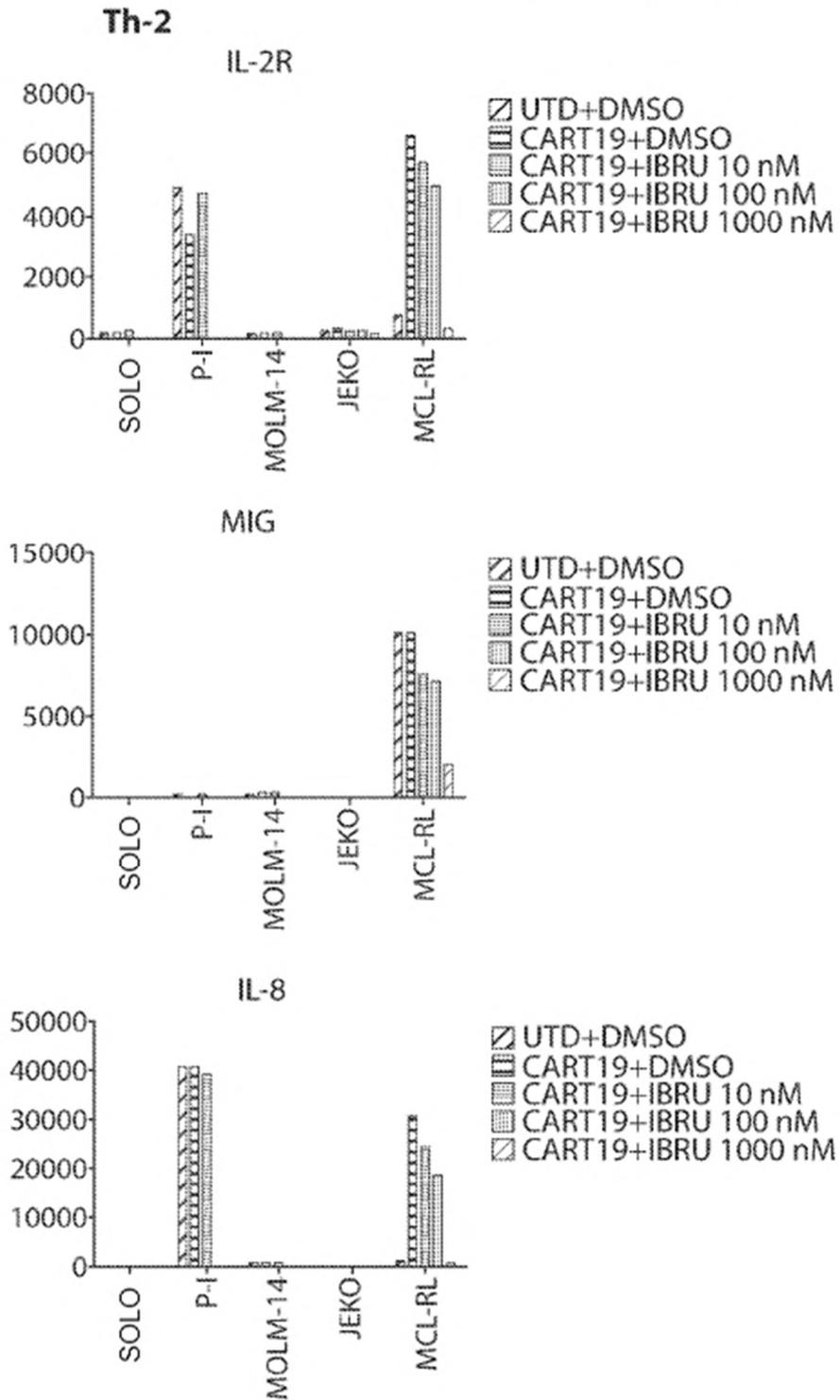
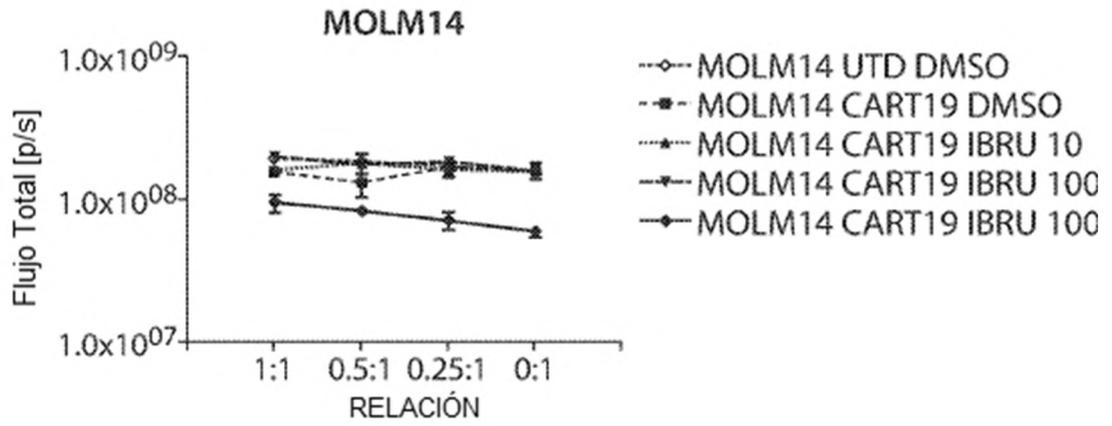
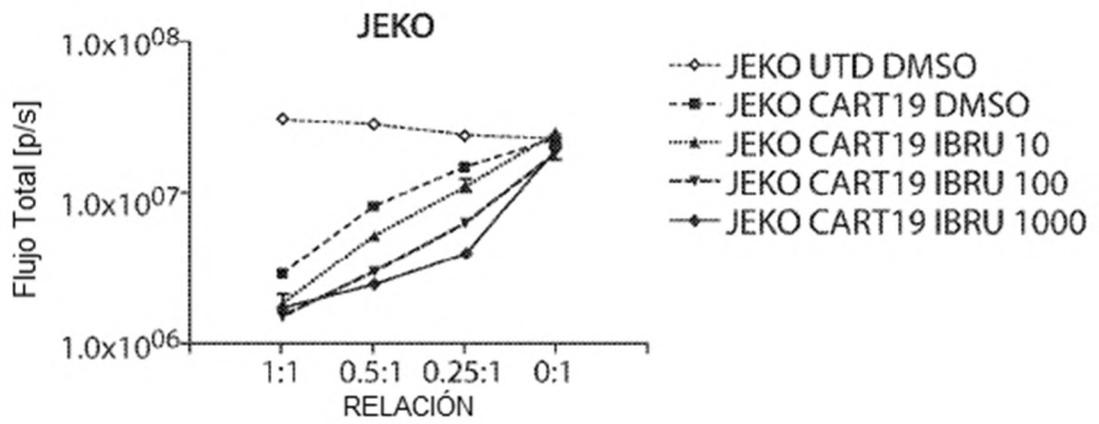


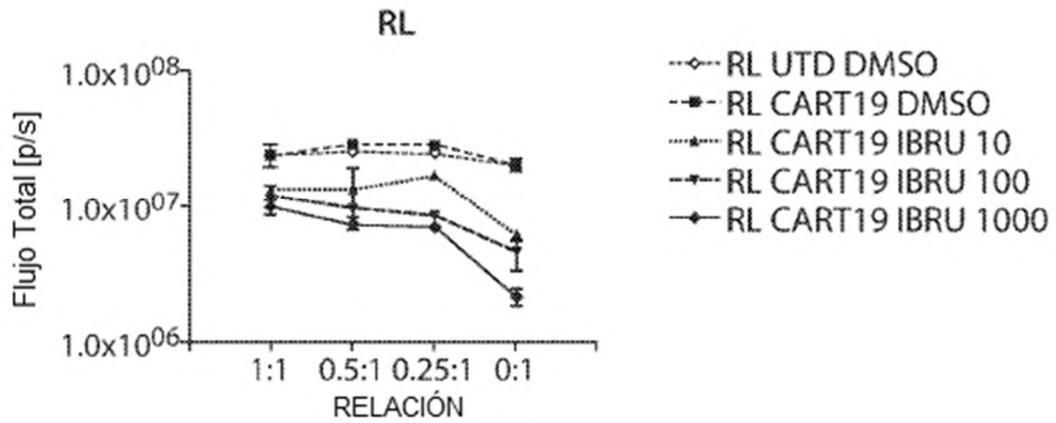
FIG. 8-10



**FIG. 9A**



**FIG. 9B**



**FIG. 9C**

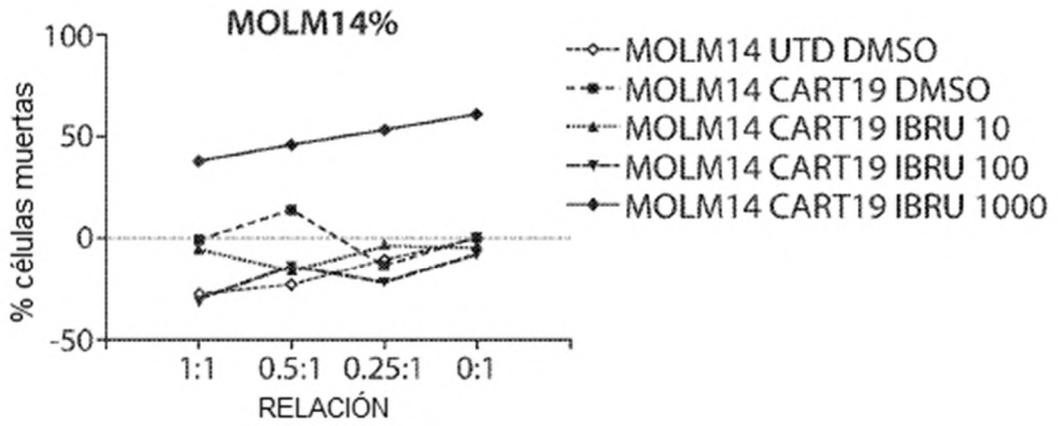


FIG. 9D

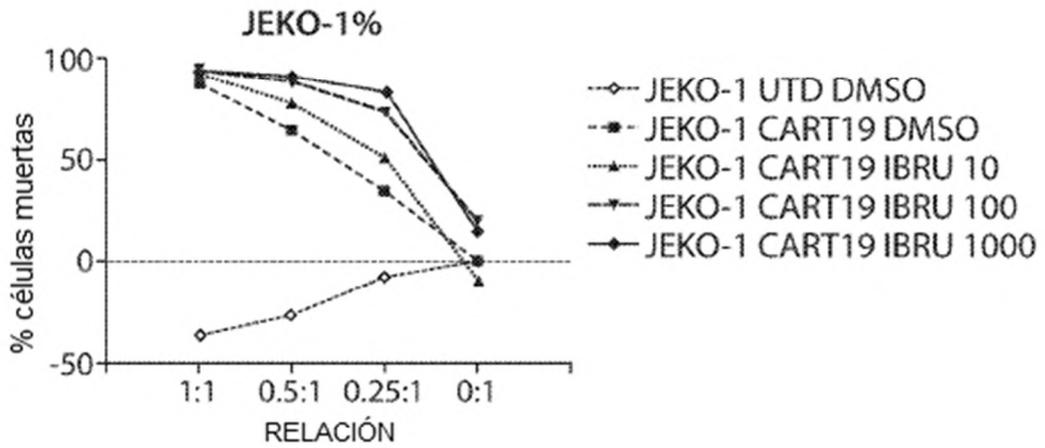


FIG. 9E

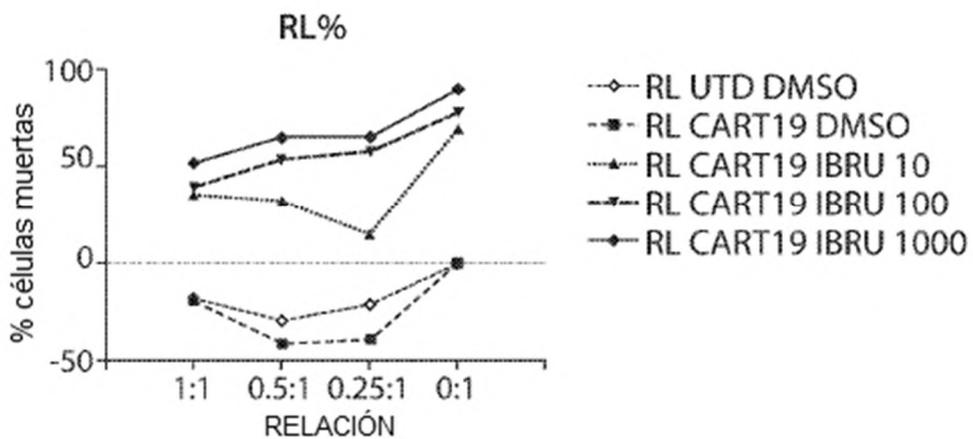


FIG. 9F

24 H EXTERMINIO POR FLUJO

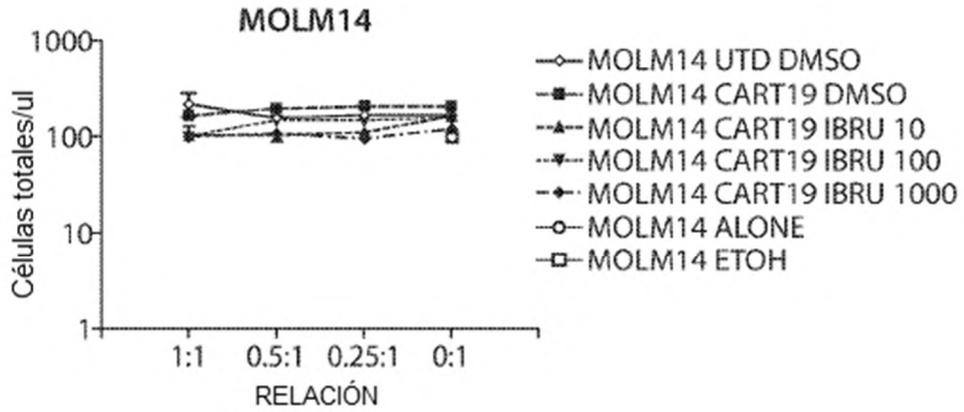


FIG. 10A

24 H EXTERMINIO POR FLUJO

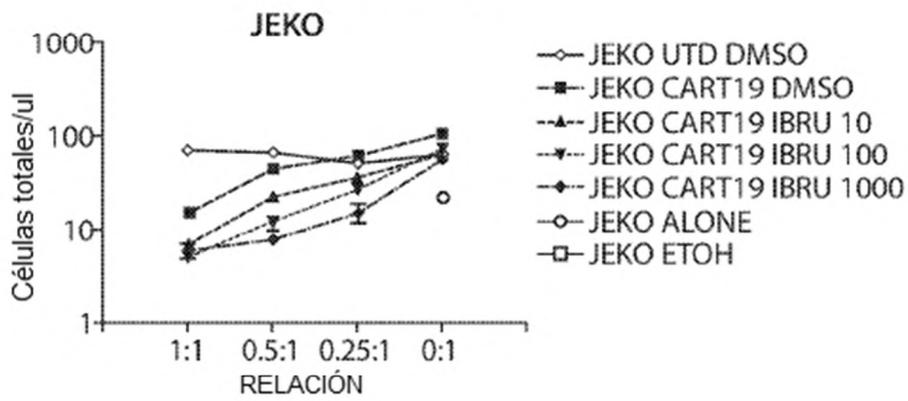


FIG. 10B

24 H EXTERMINIO POR FLUJO

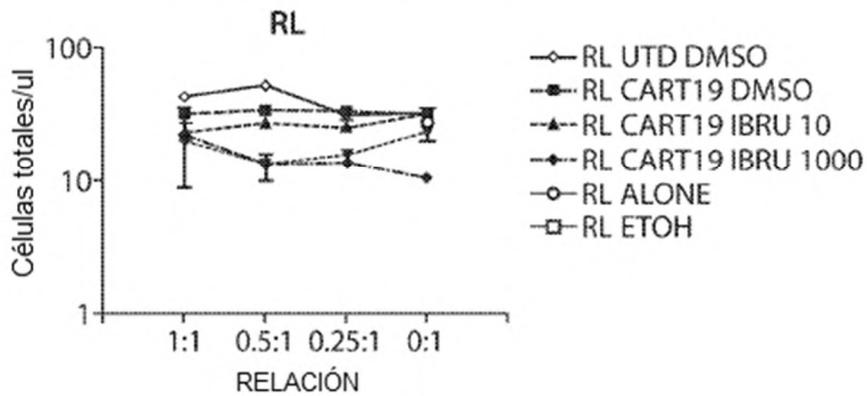
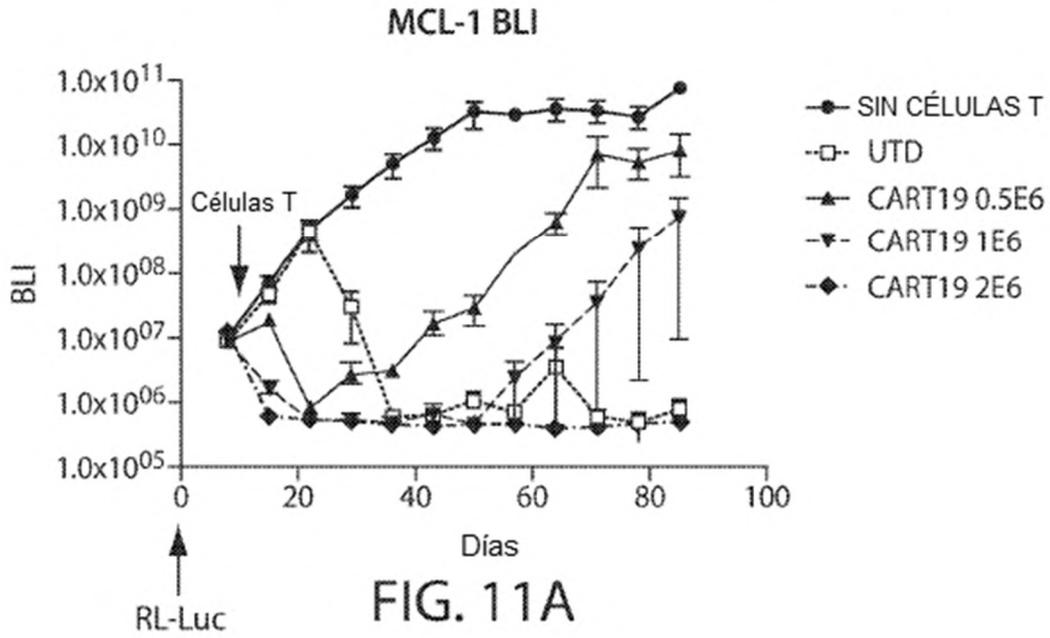
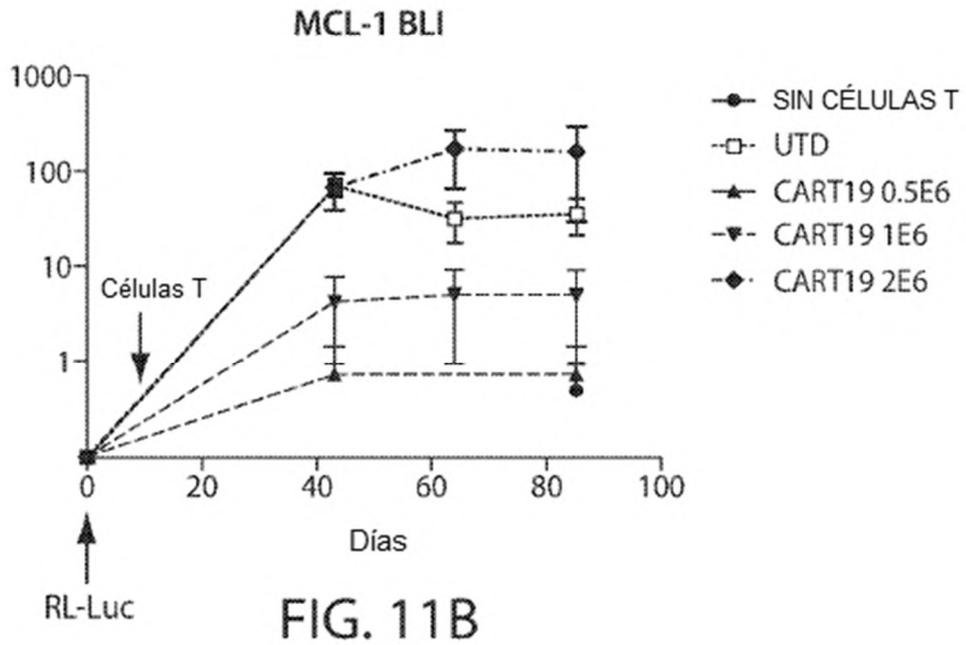


FIG. 10C

Hallazgo de dosis de CART19 en modelo RL MCL: MCL-1



Hallazgo de dosis de CART19 en modelo RL MCL: MCL-1



Hallazgo de dosis de CART19 en modelo RL MCL: MCL-1

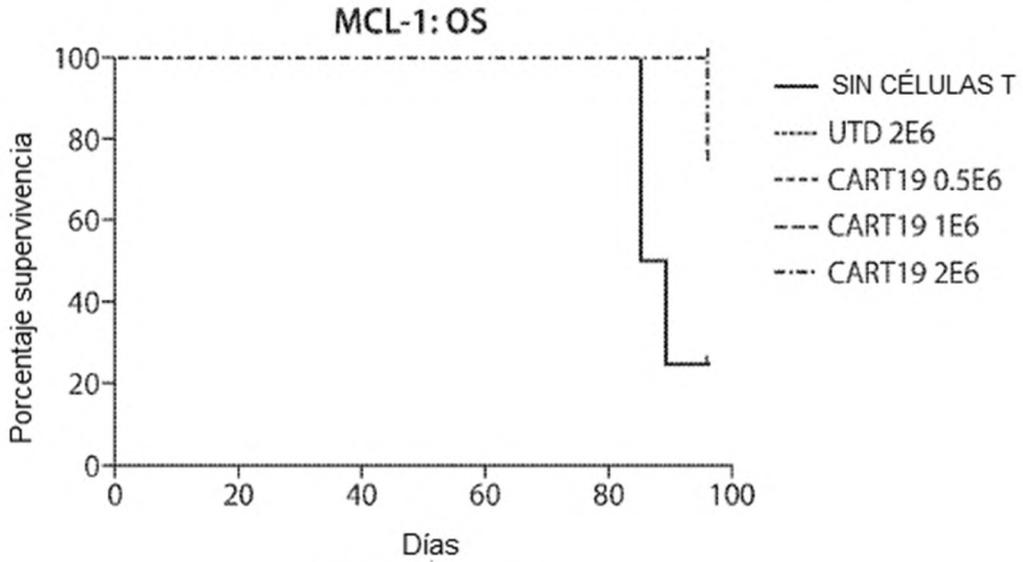


FIG. 11C

Hallazgo de dosis de CART19 en modelo RL MCL: MCL-1

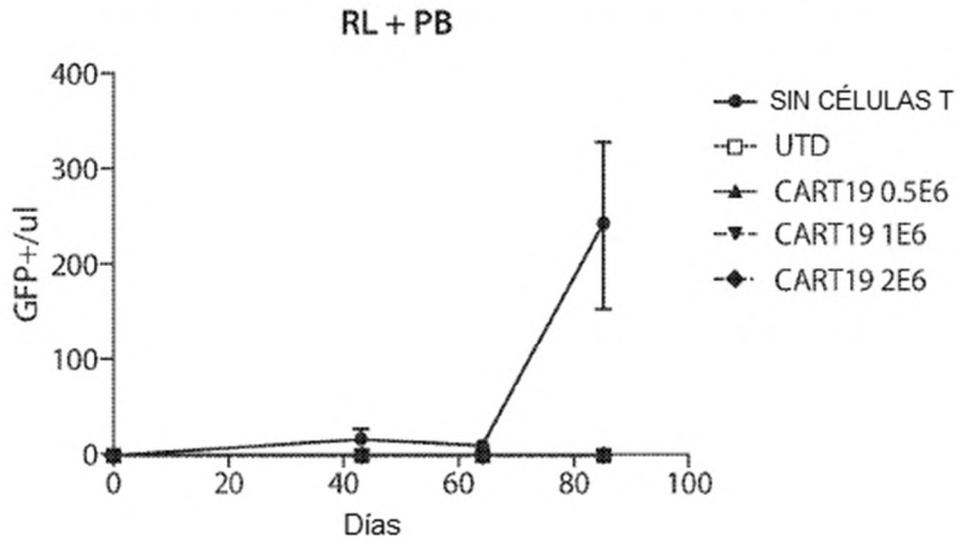


FIG. 11D

Hallazgo de dosis de CART19 en modelo JEKO-1 MCL: MCL-2

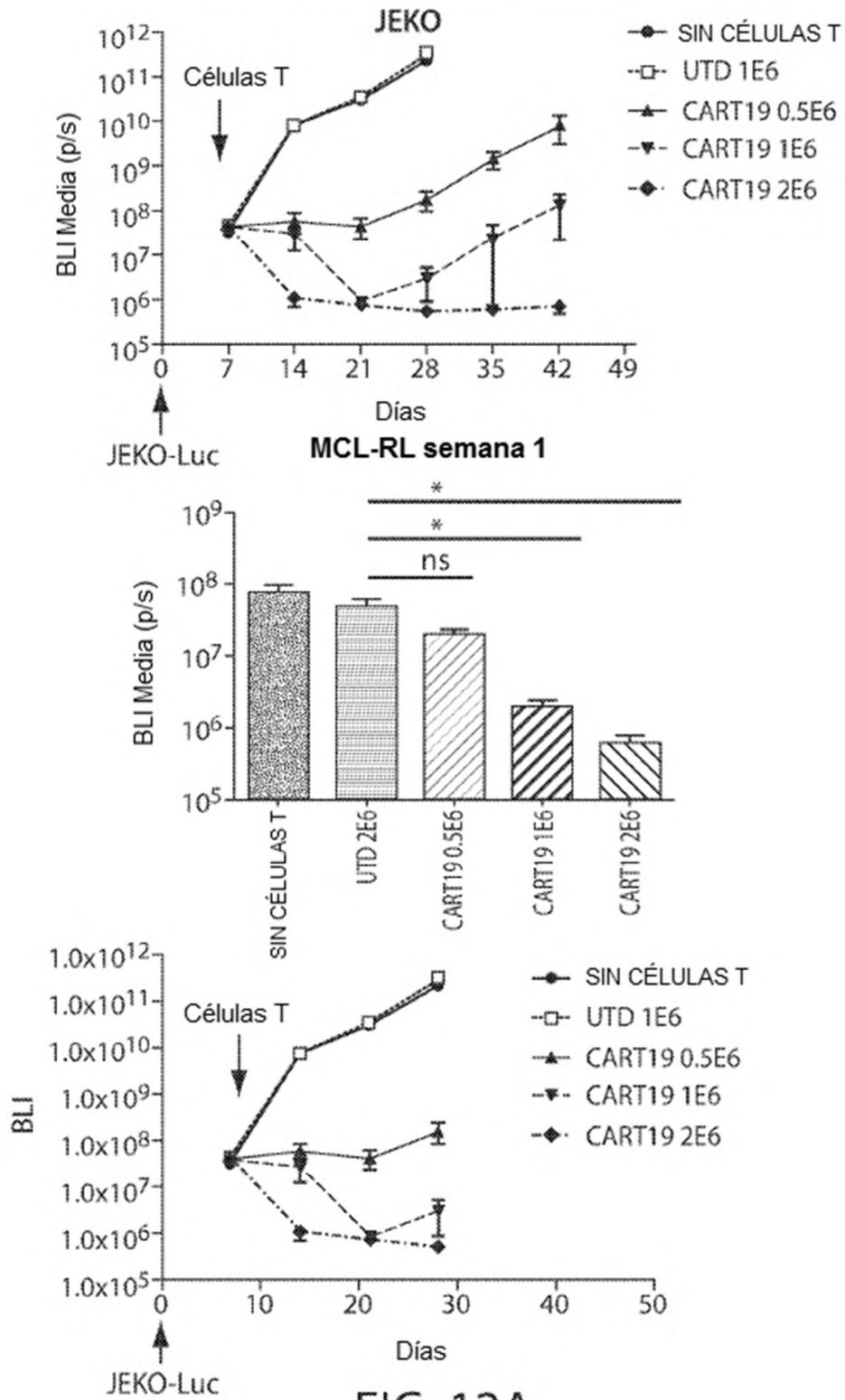


FIG. 12A

Hallazgo de dosis de CART19 en modelo RL MCL: MCL-1

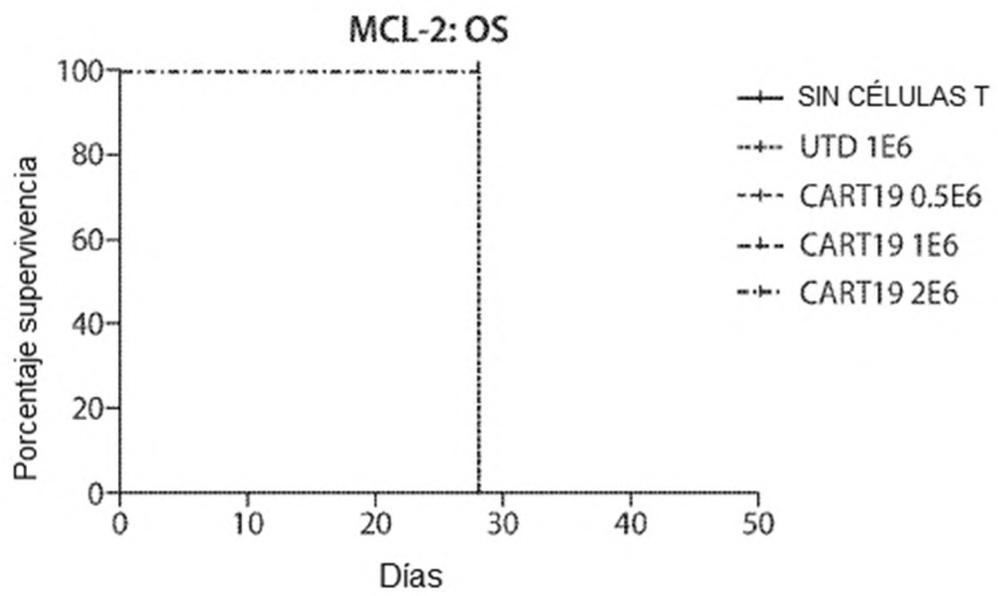


FIG. 12B

Actividad in-vivo de CART19 e Ibrutinib: MCL-3,45

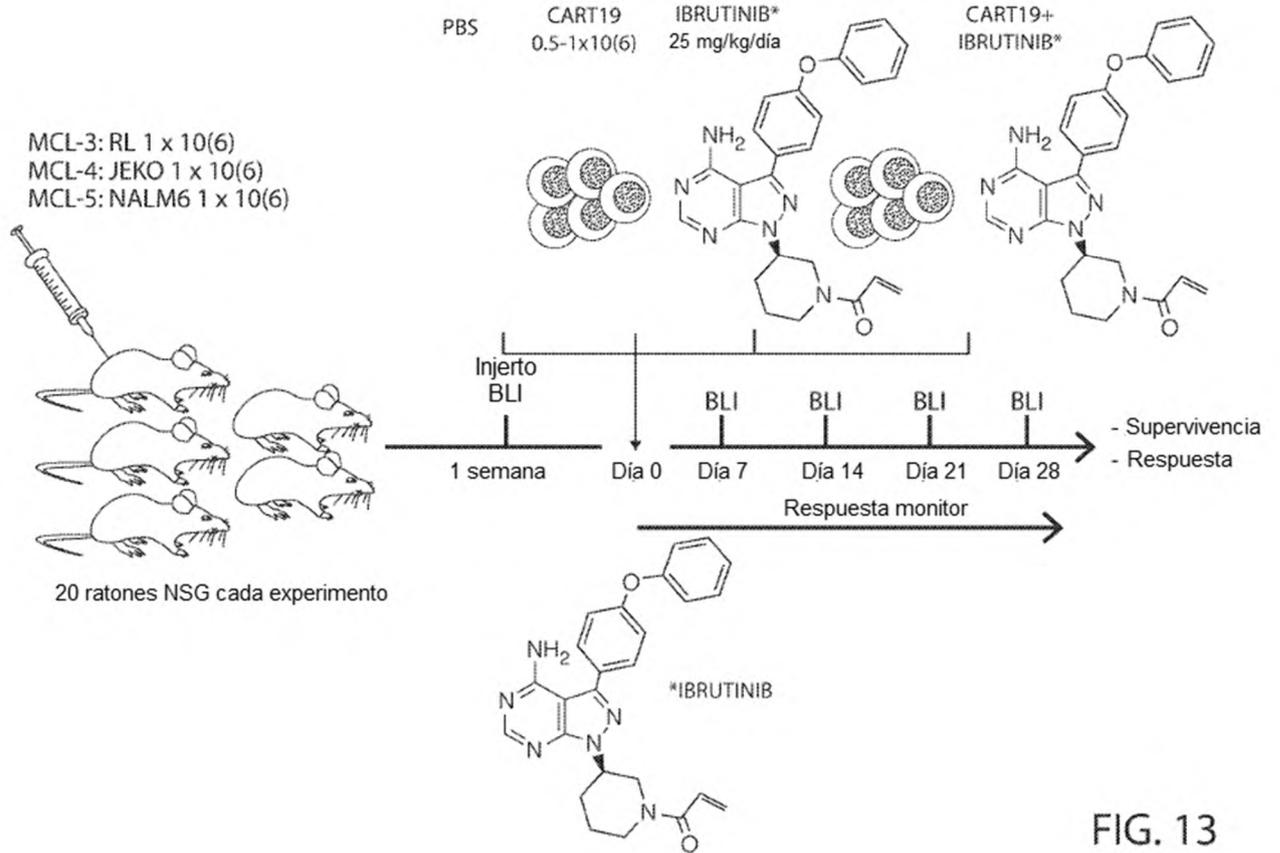
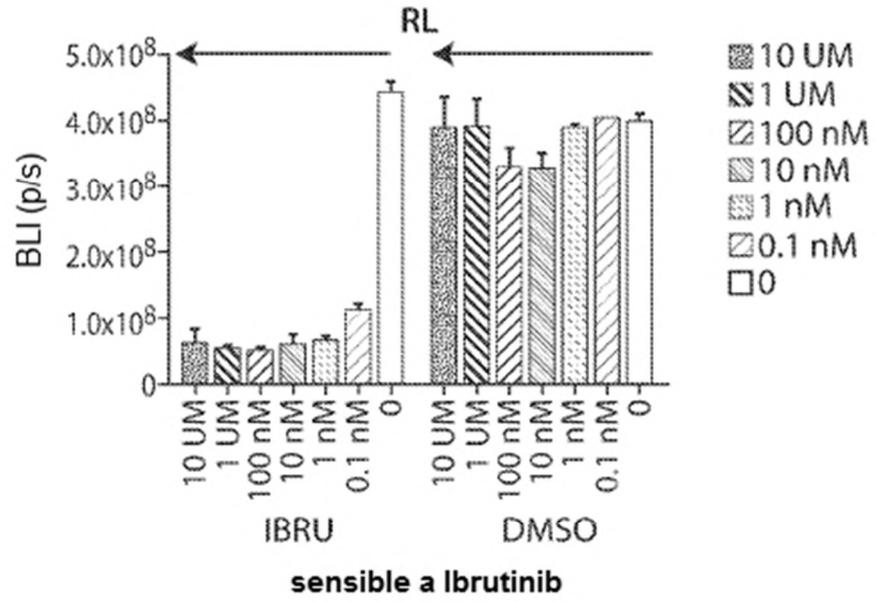
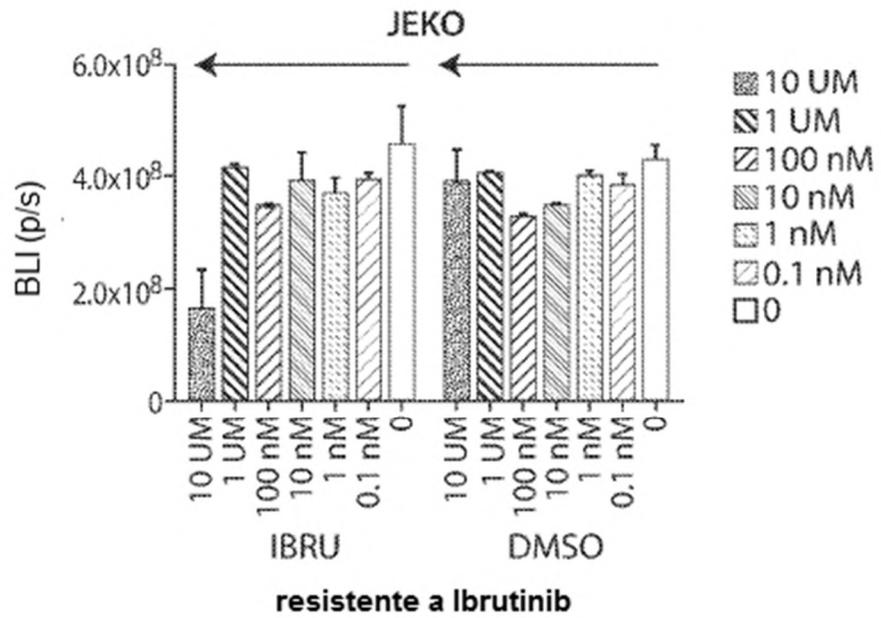


FIG. 13



**FIG. 14A**



**FIG. 14B**

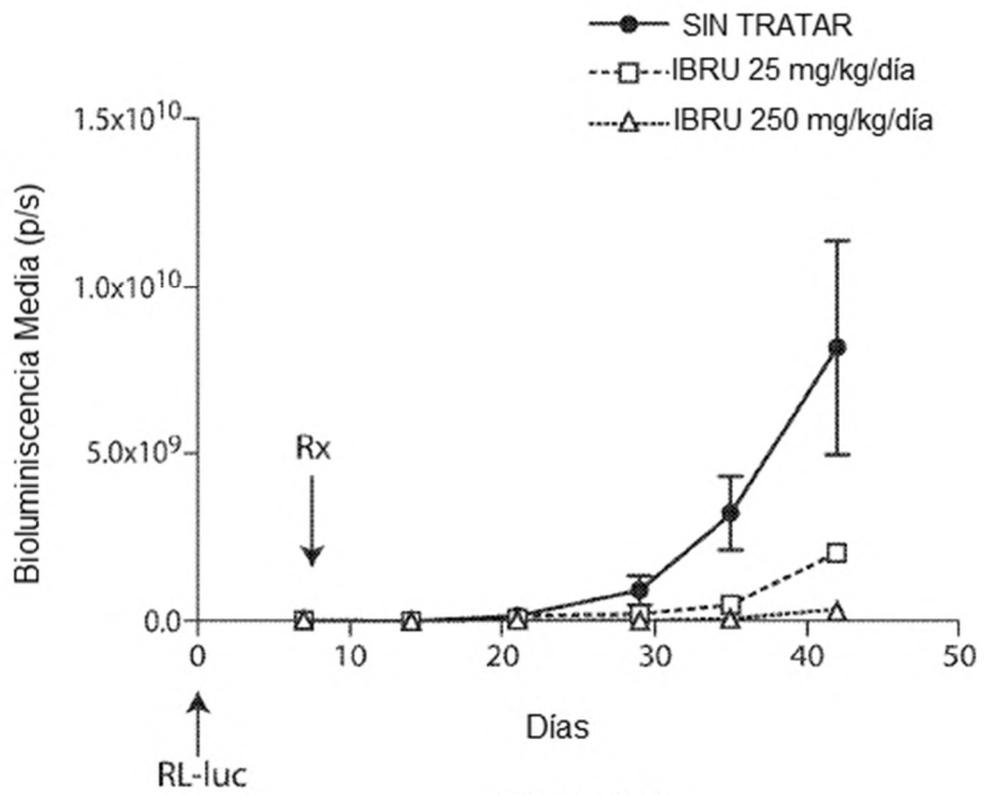


FIG. 15

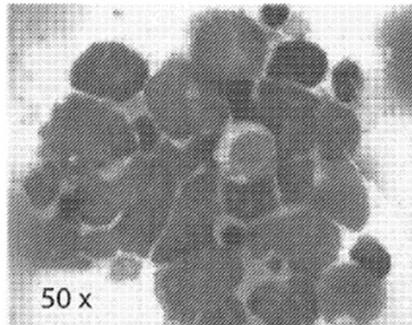


FIG. 16A

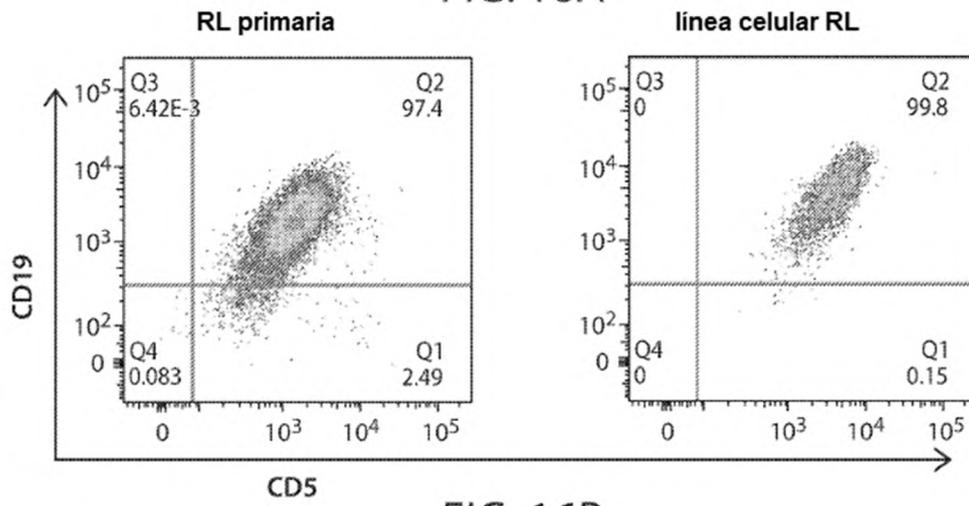


FIG. 16B

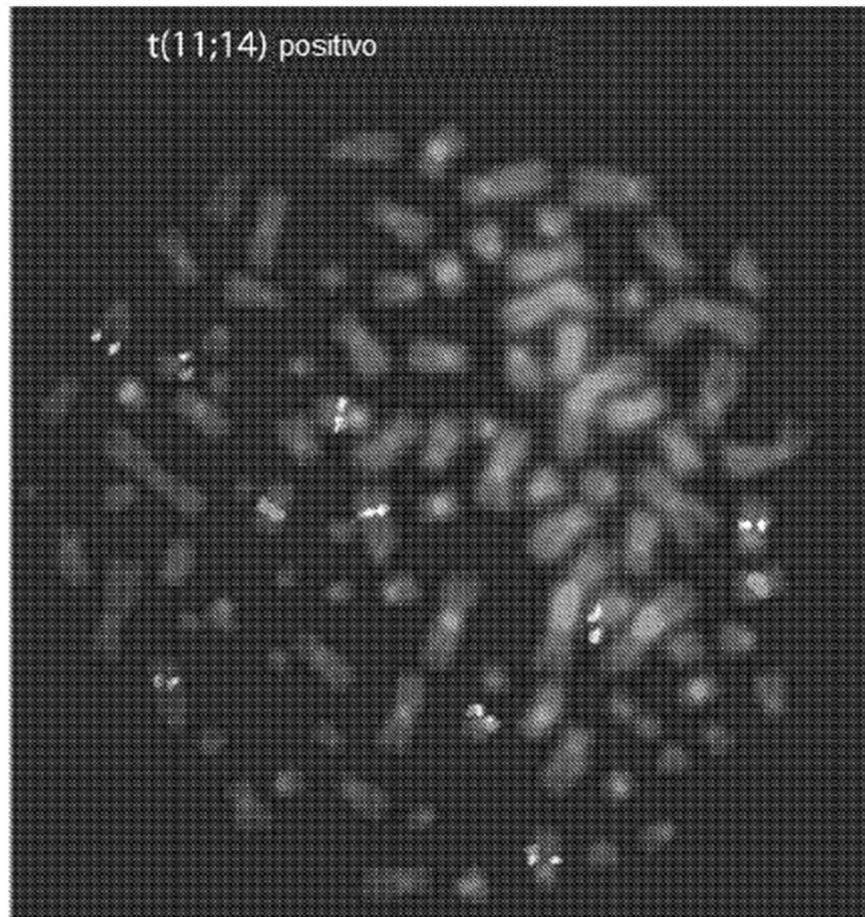


FIG. 16C

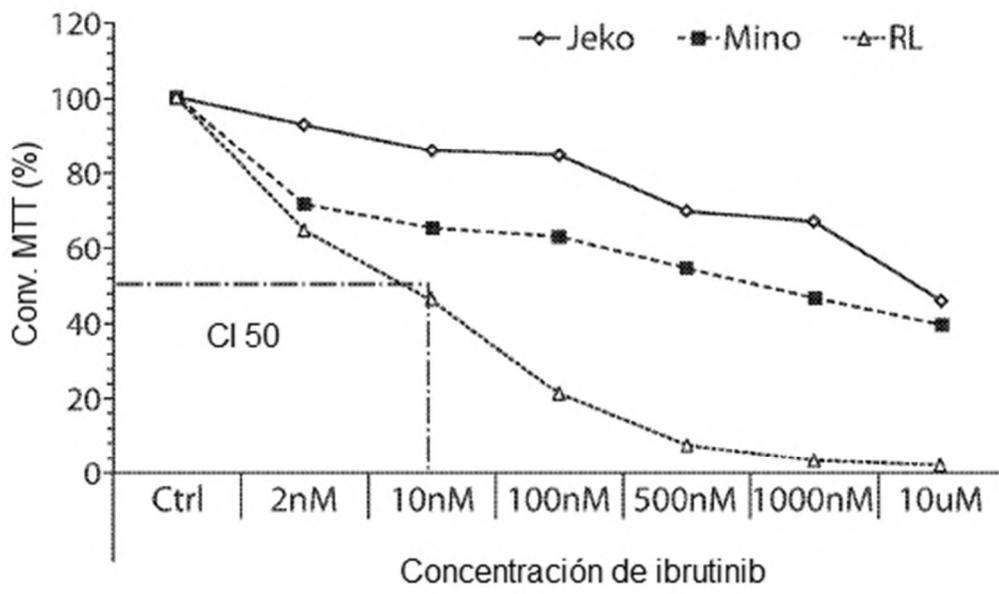


FIG. 16D

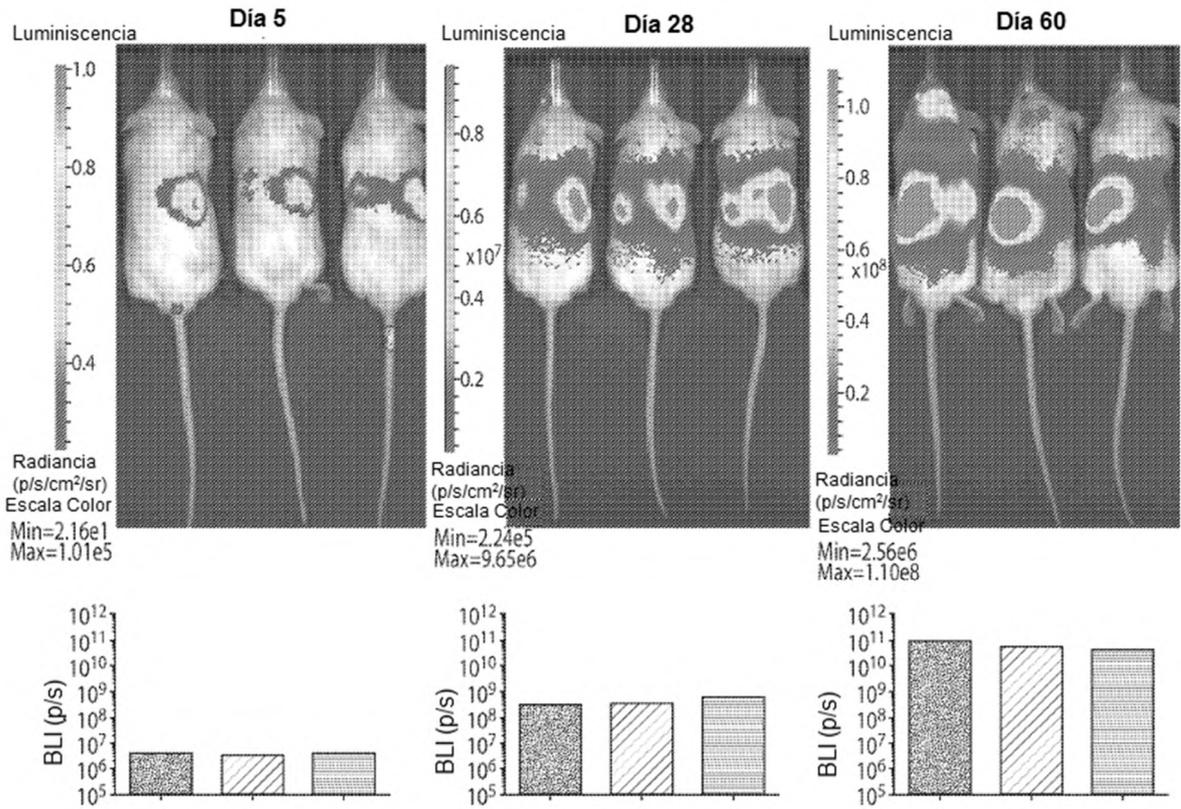
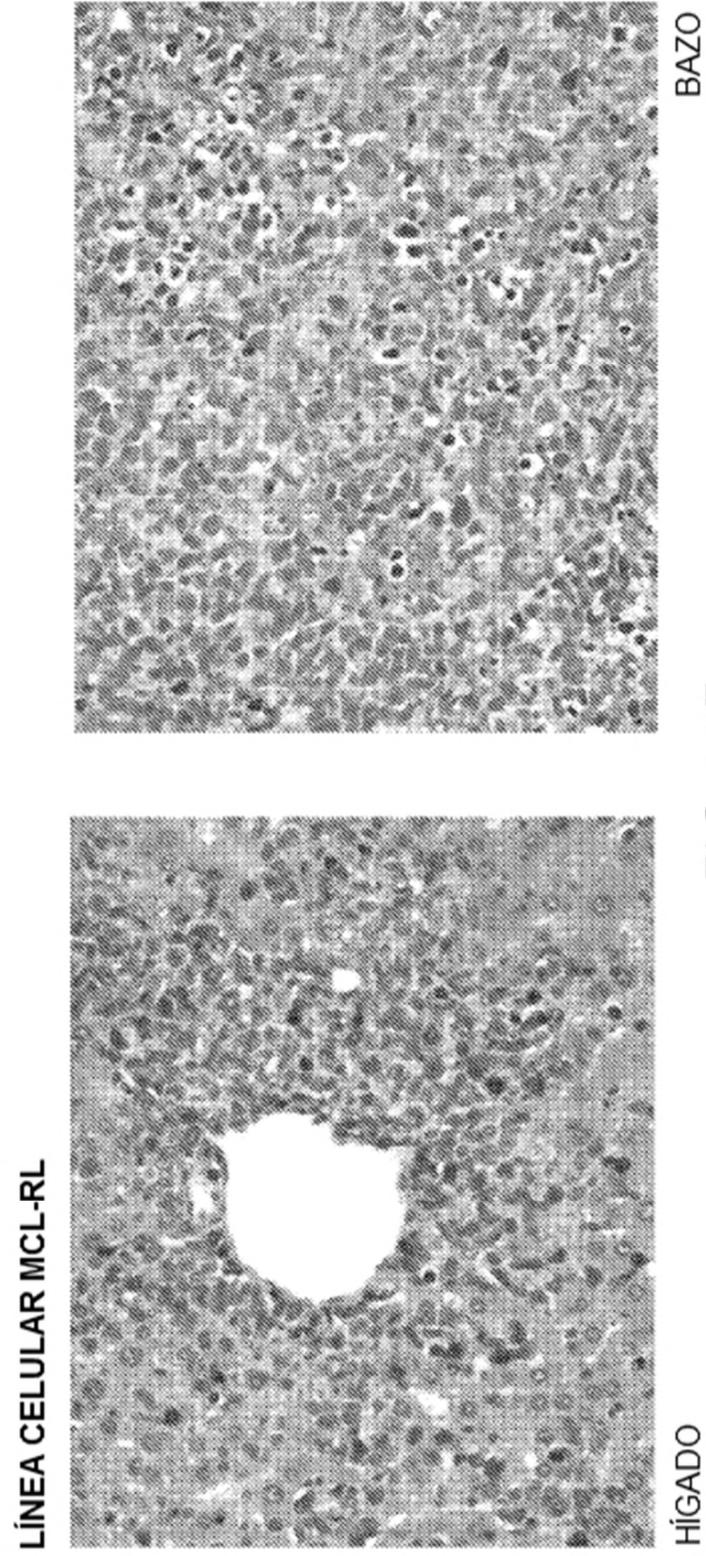


FIG. 16E



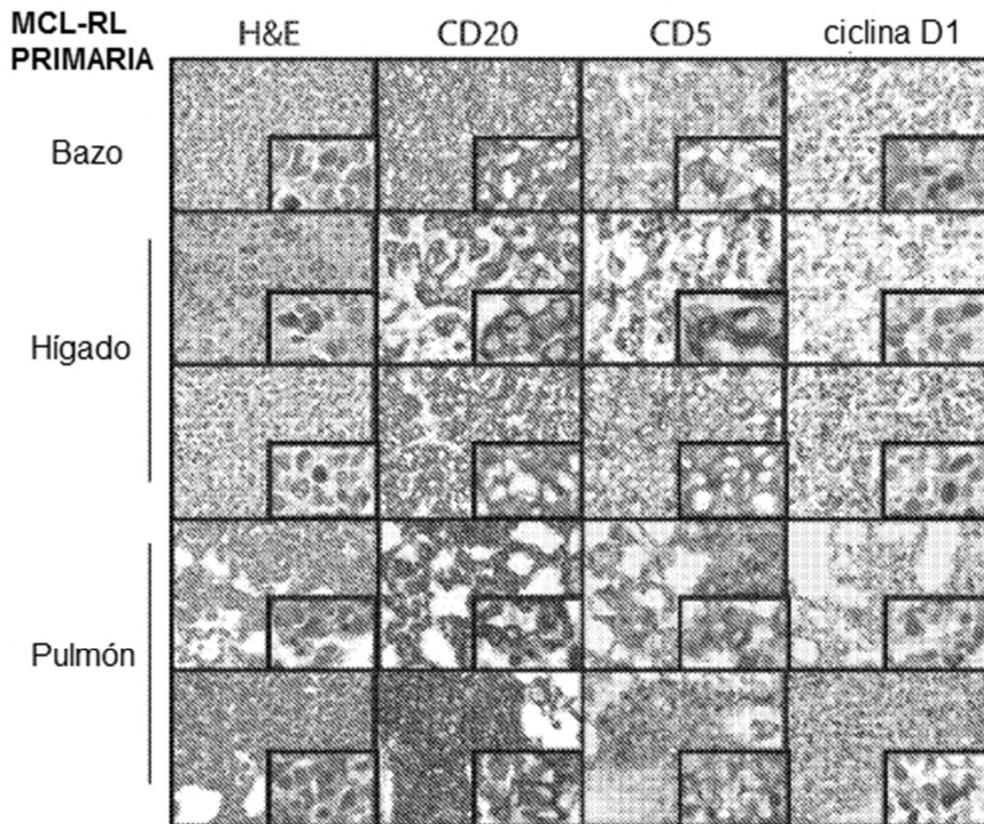


FIG. 16G

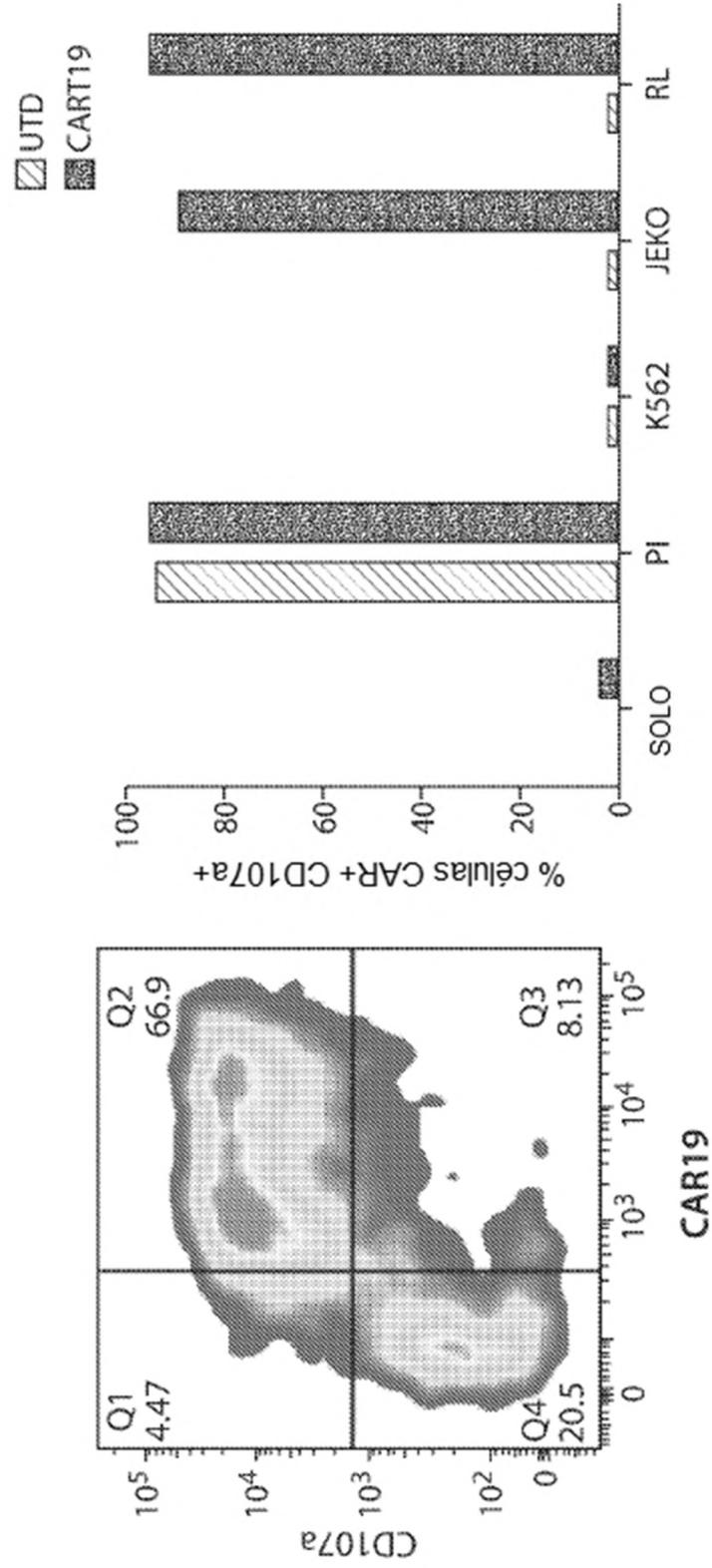


FIG. 17A

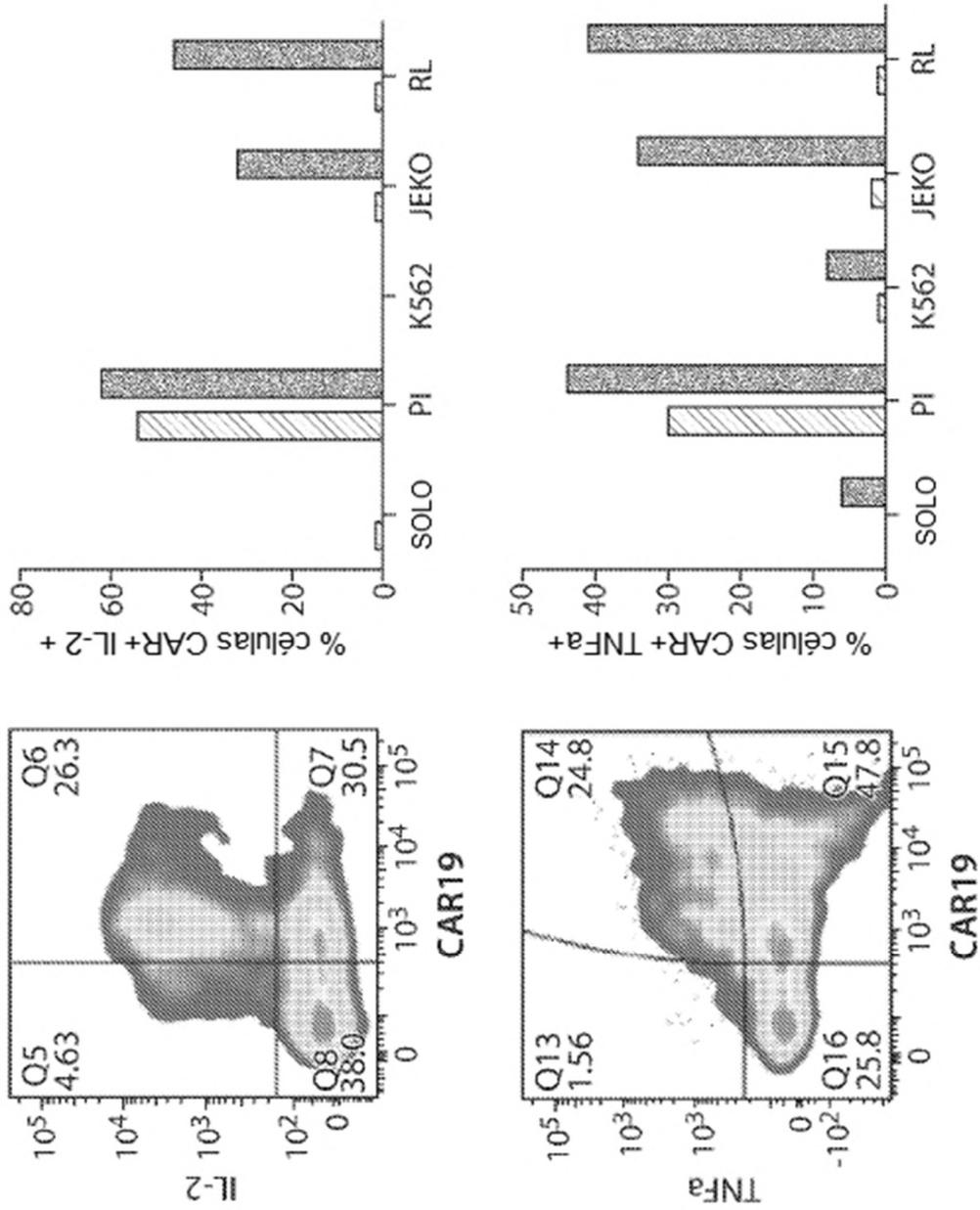


FIG. 17B

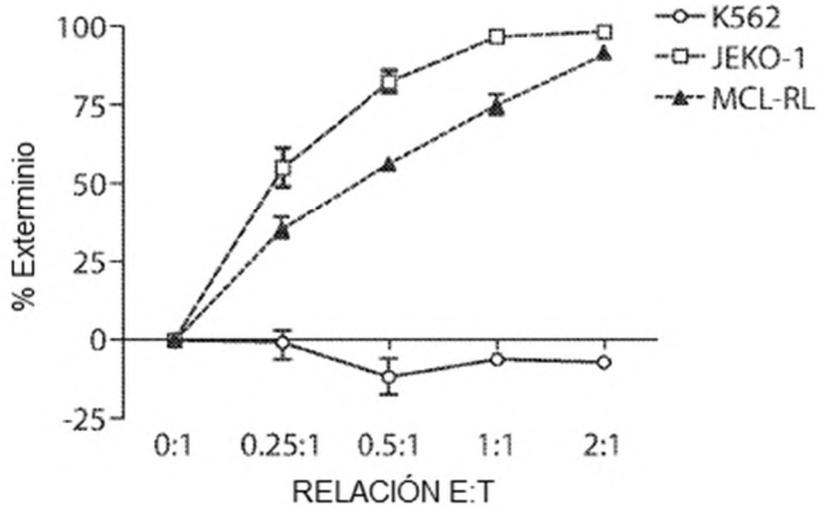


FIG. 17C

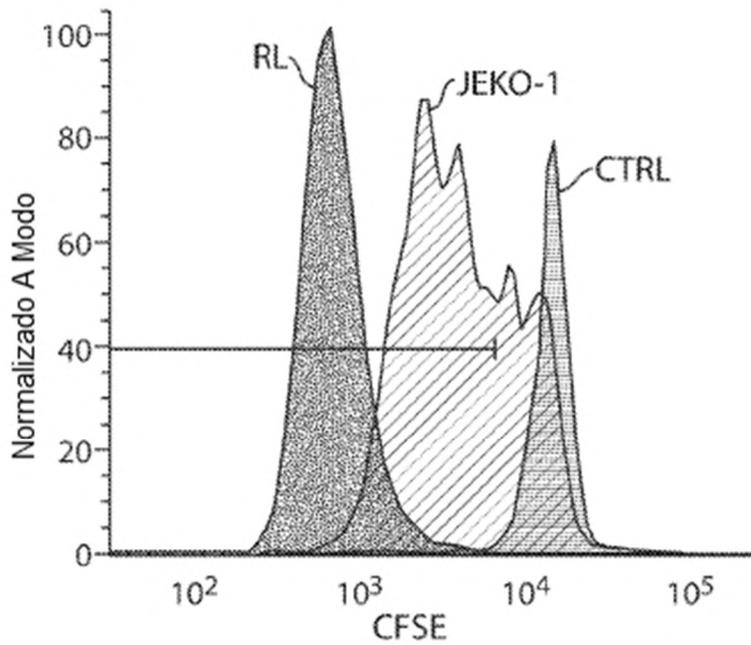


FIG. 17D



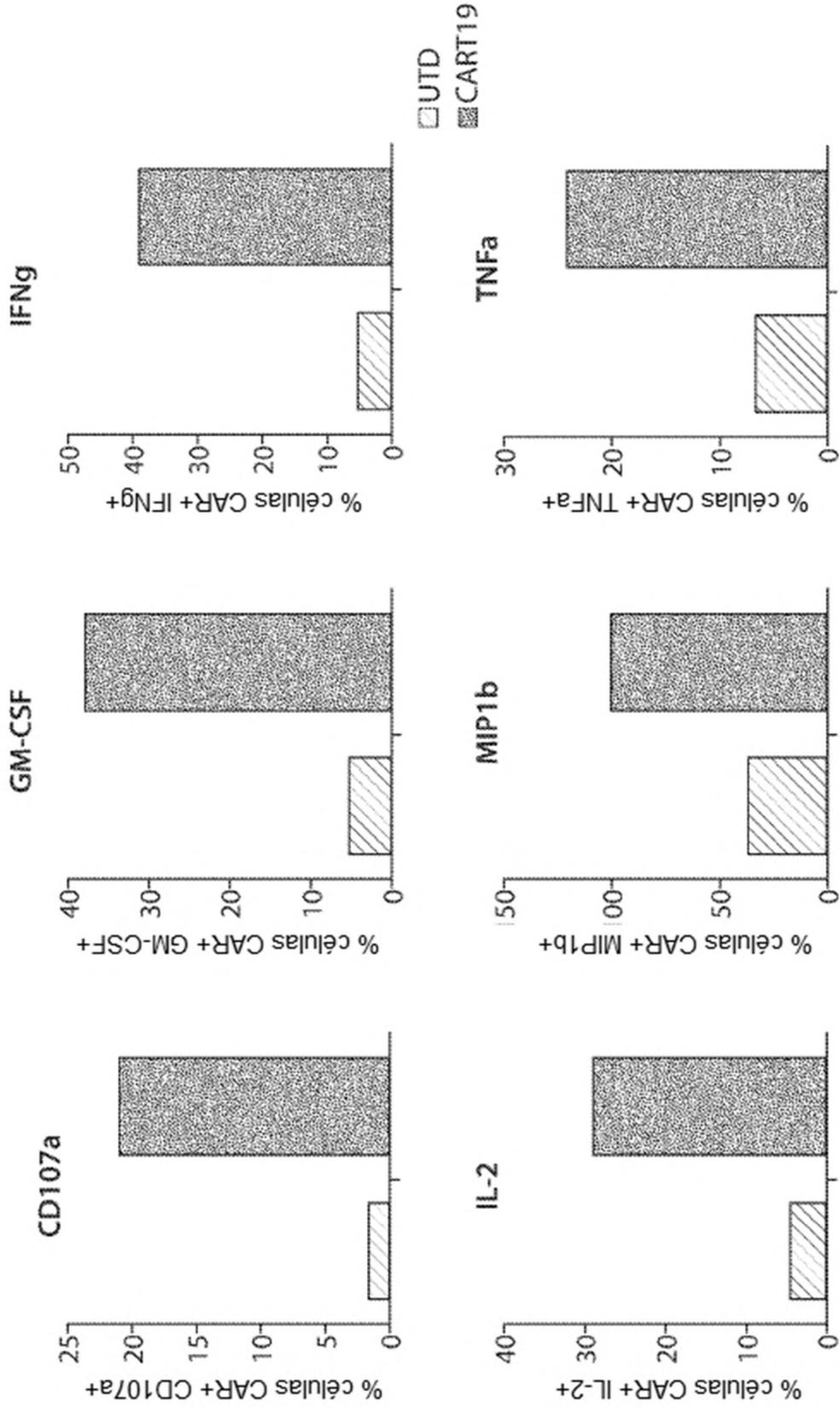


FIG. 17F

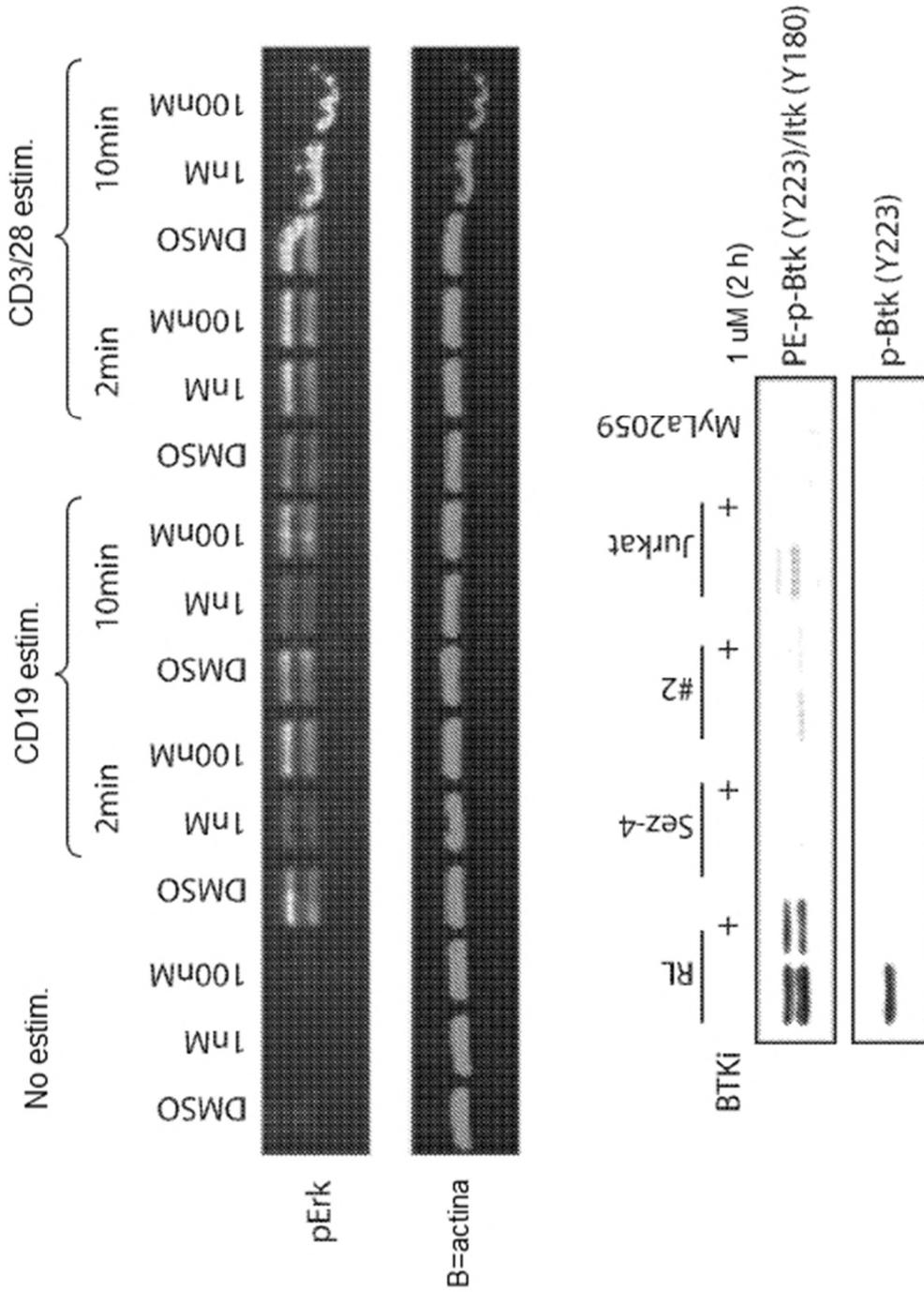


FIG. 18A

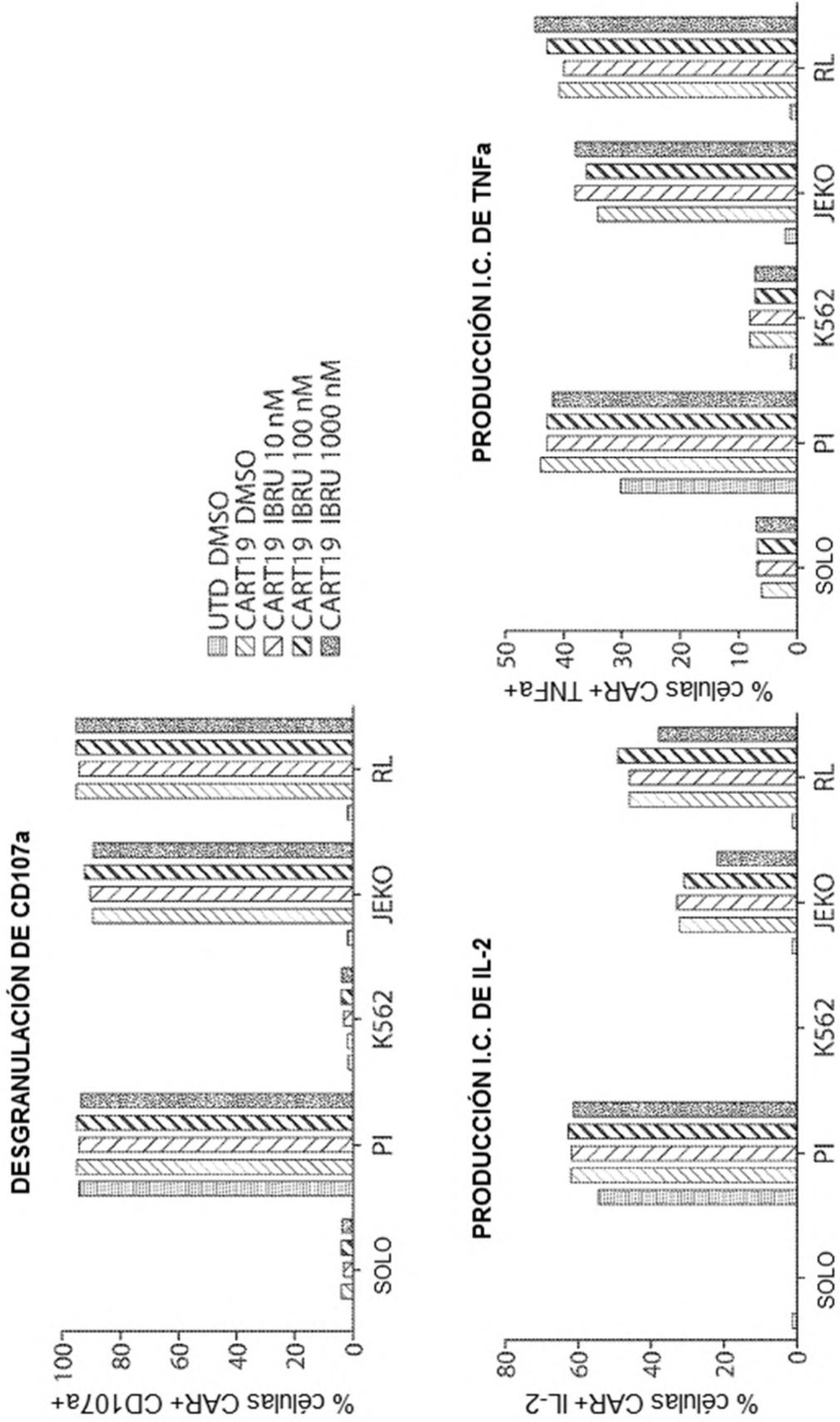


FIG. 18B

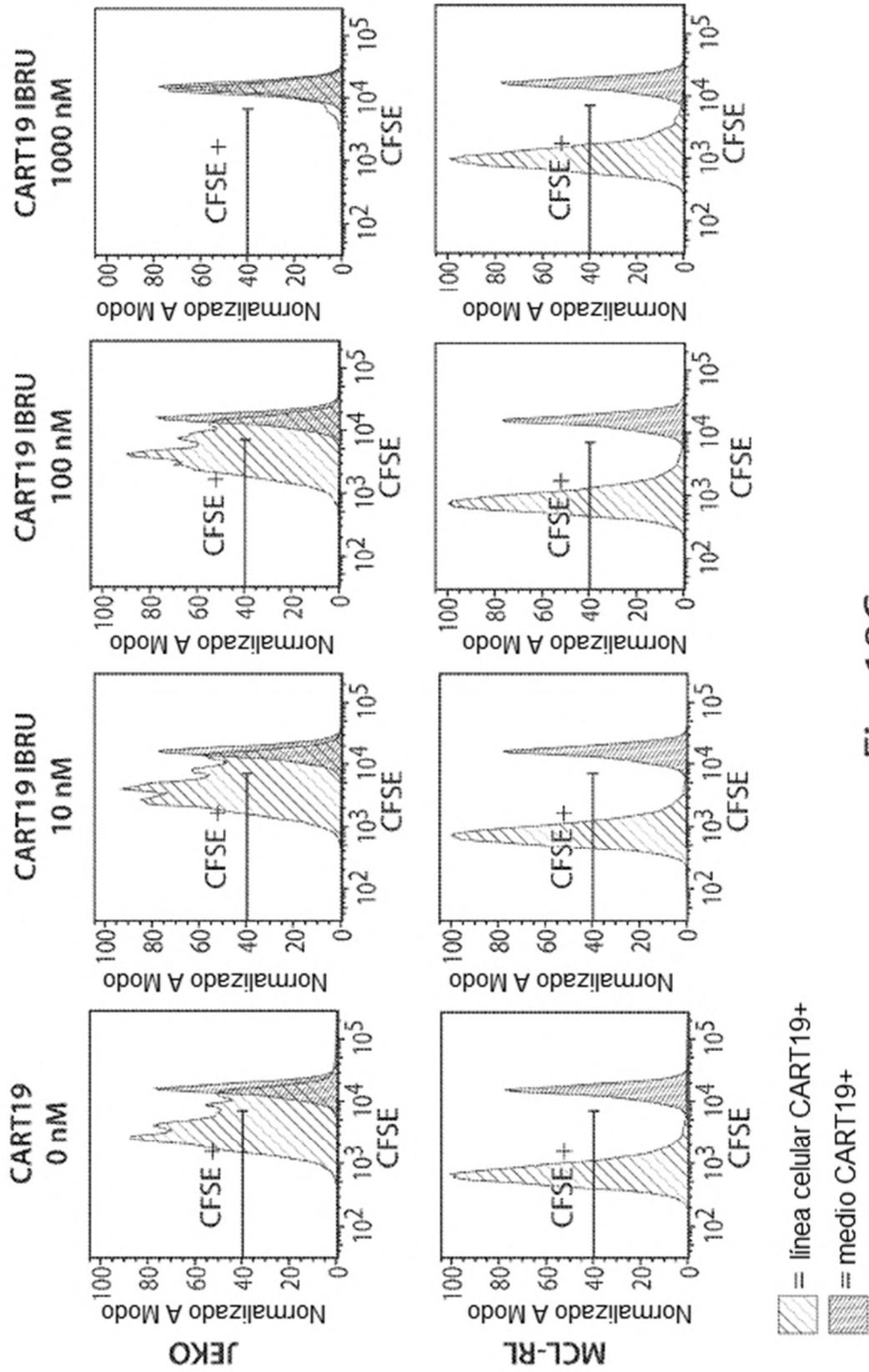


Fig. 18C

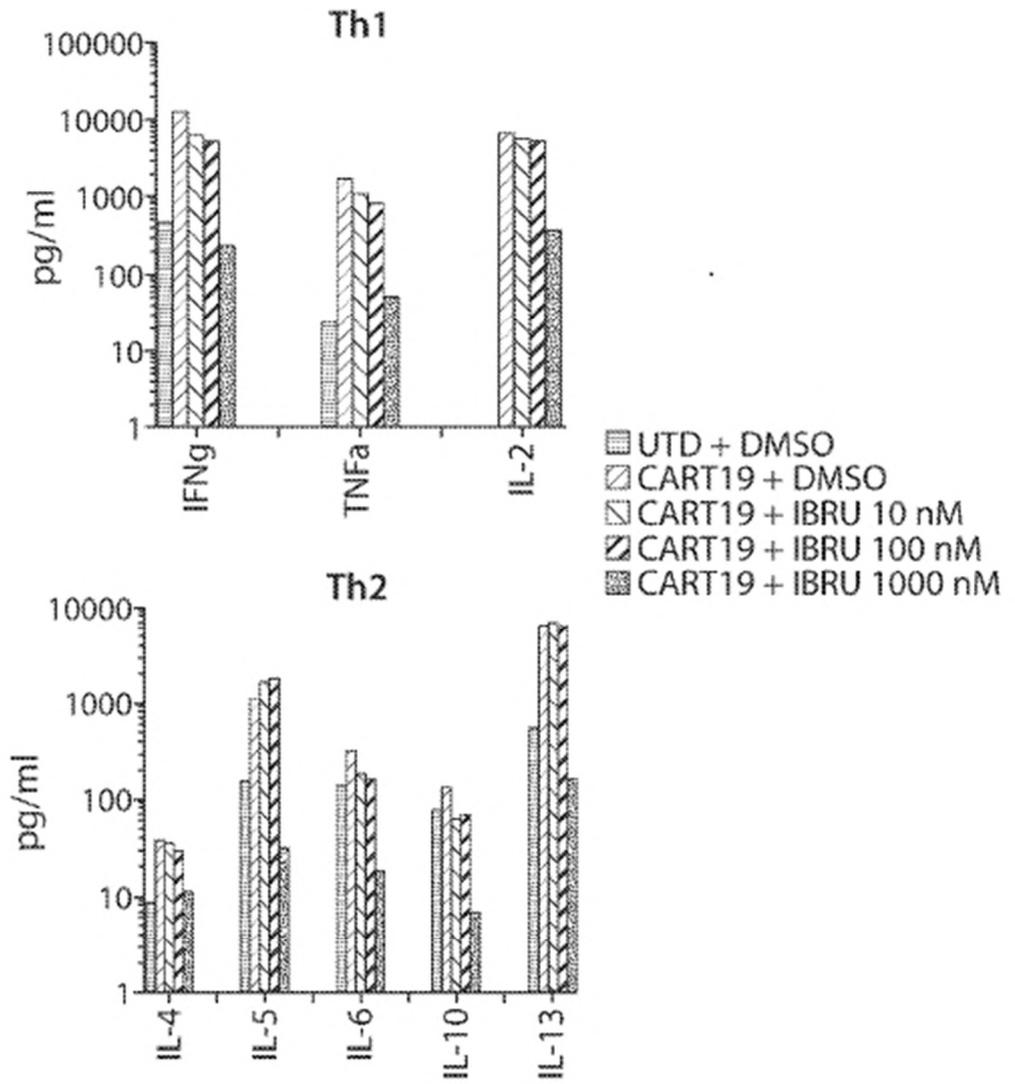


FIG. 18D-1

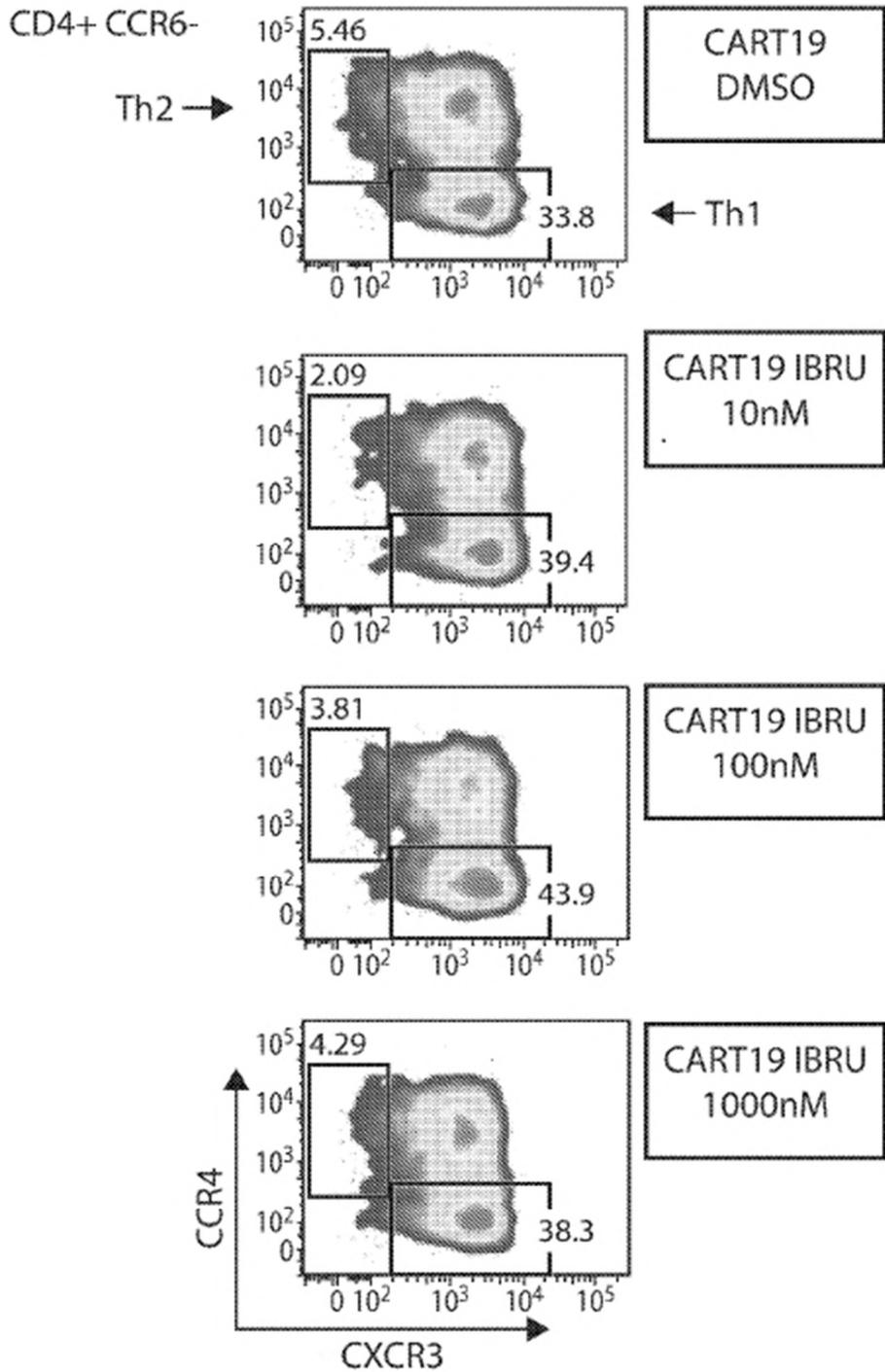


FIG. 18D-2

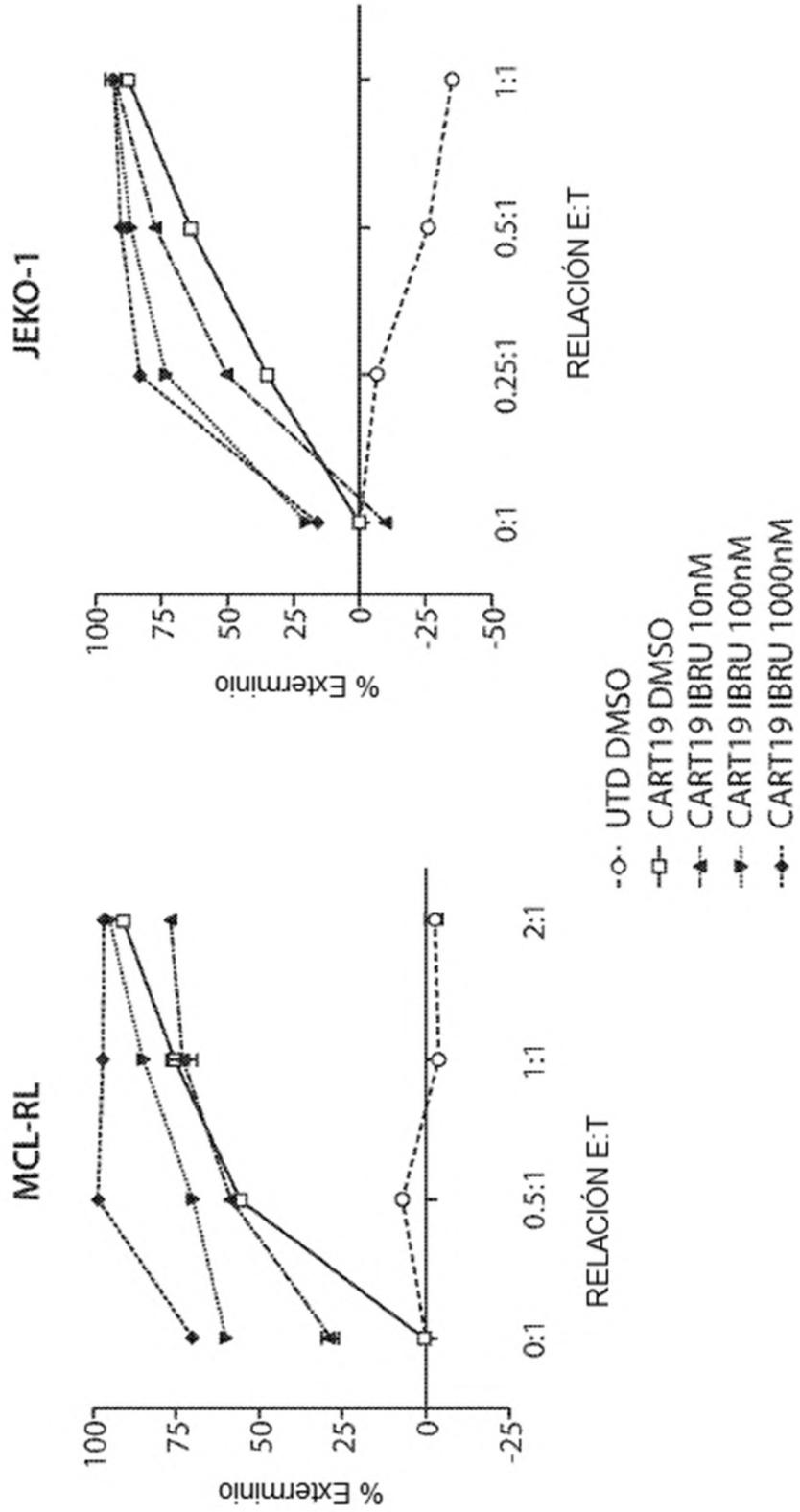
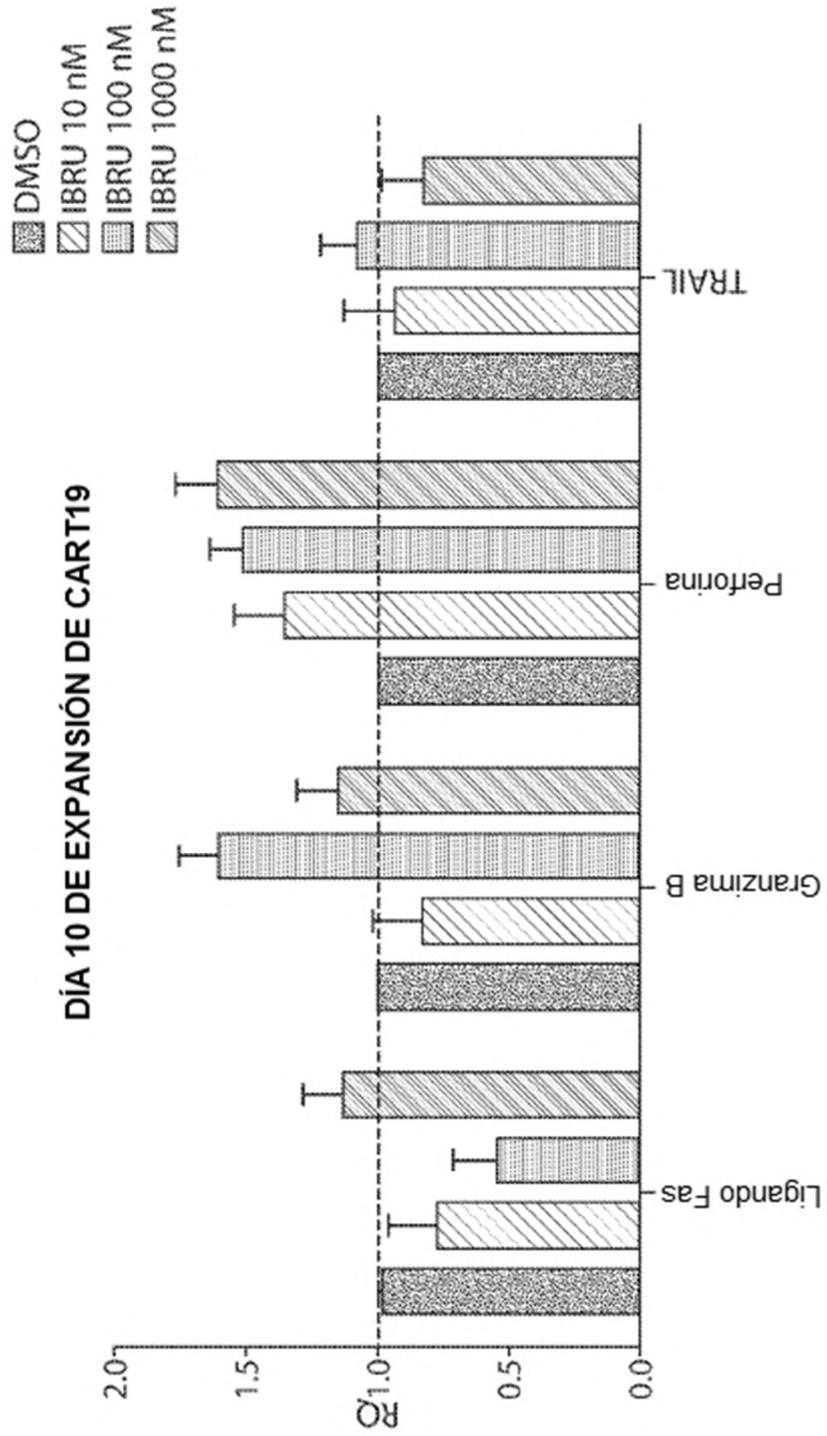


FIG. 18E



Resultados confirmados por citometría de flujo

**FIG. 18F**

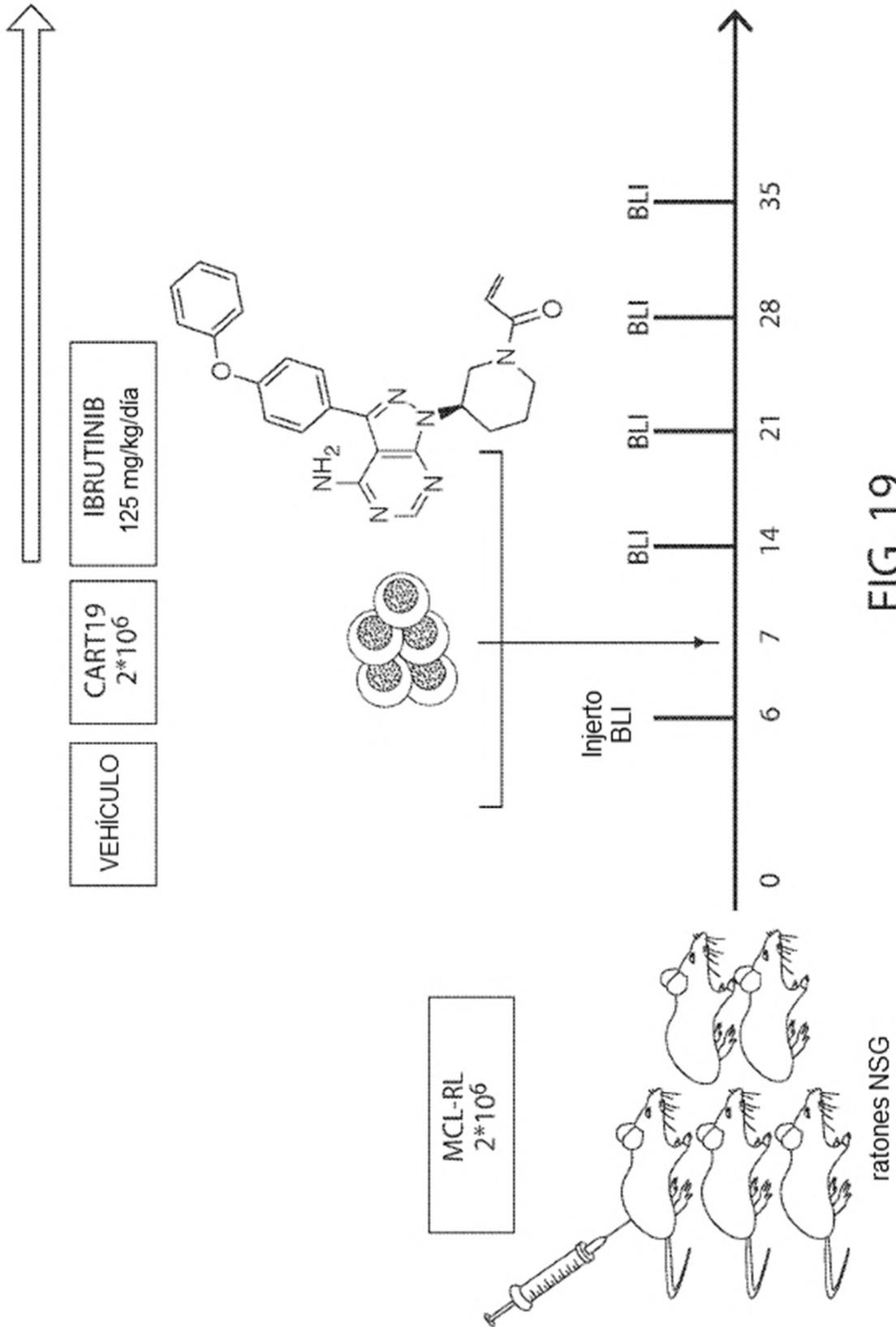


FIG. 19

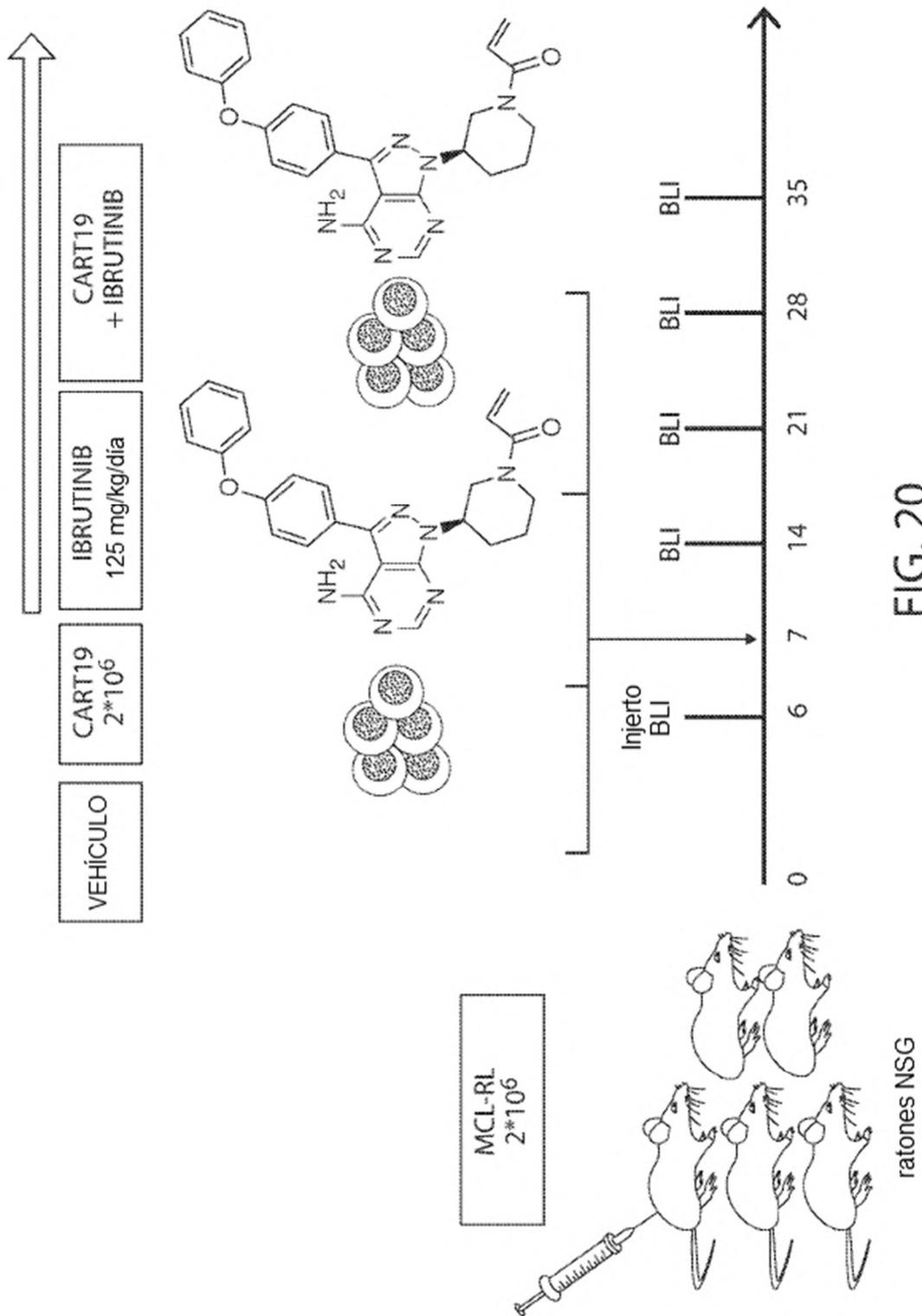
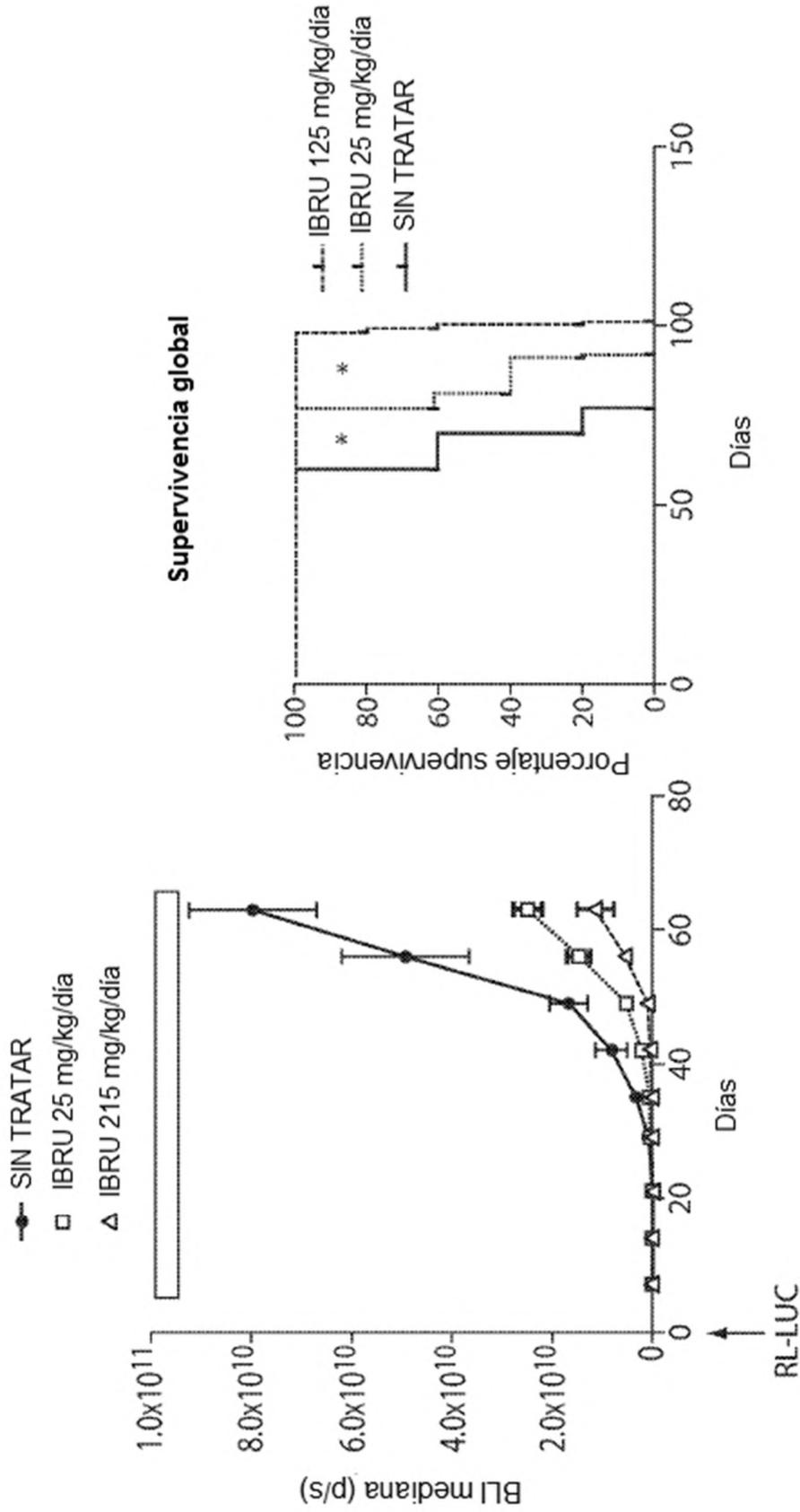


FIG. 20



4 ratones por grupo

FIG. 21

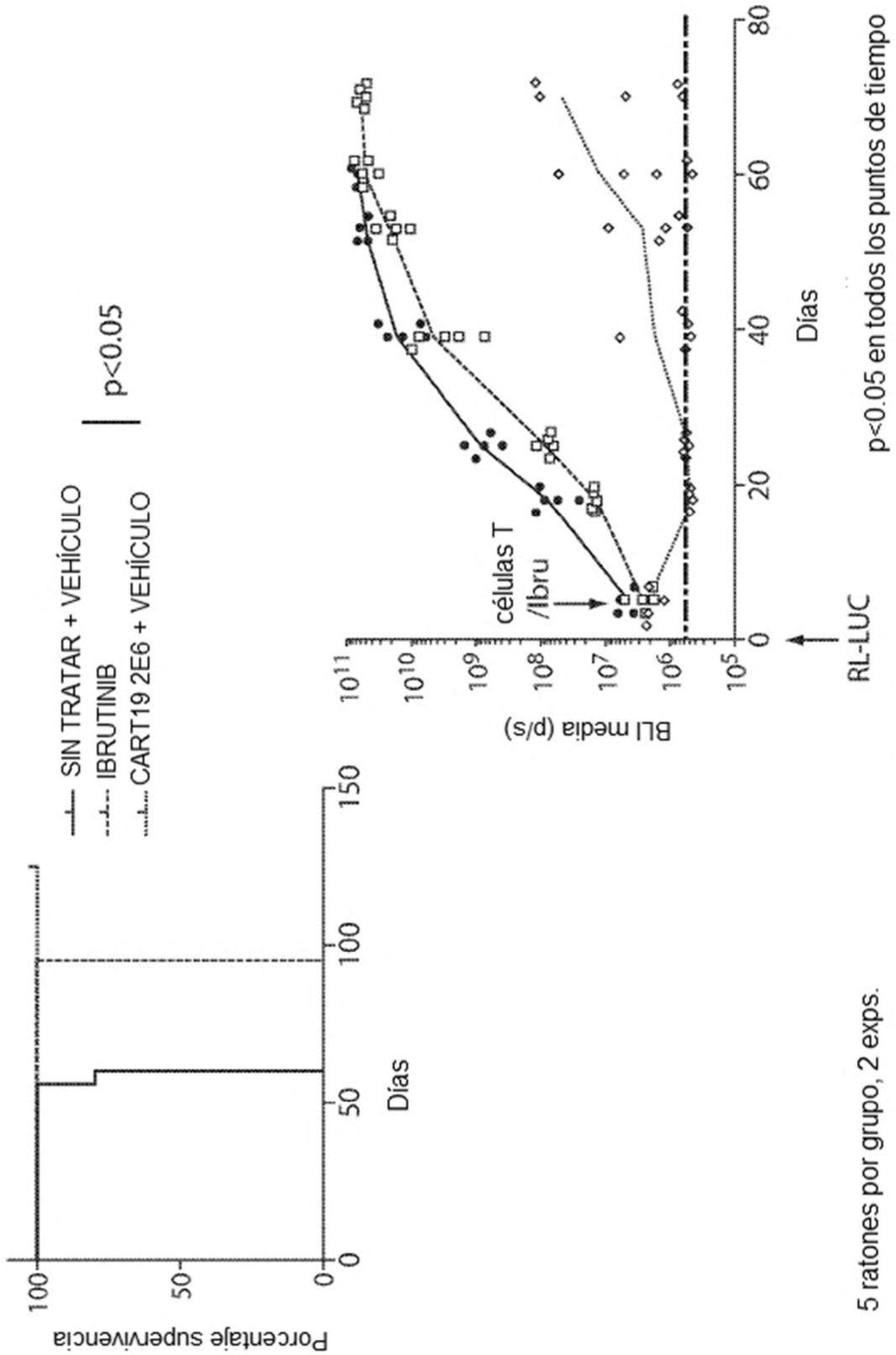


FIG. 22

5 ratones por grupo, 2 exps.

13 días después de  
infusión de células T

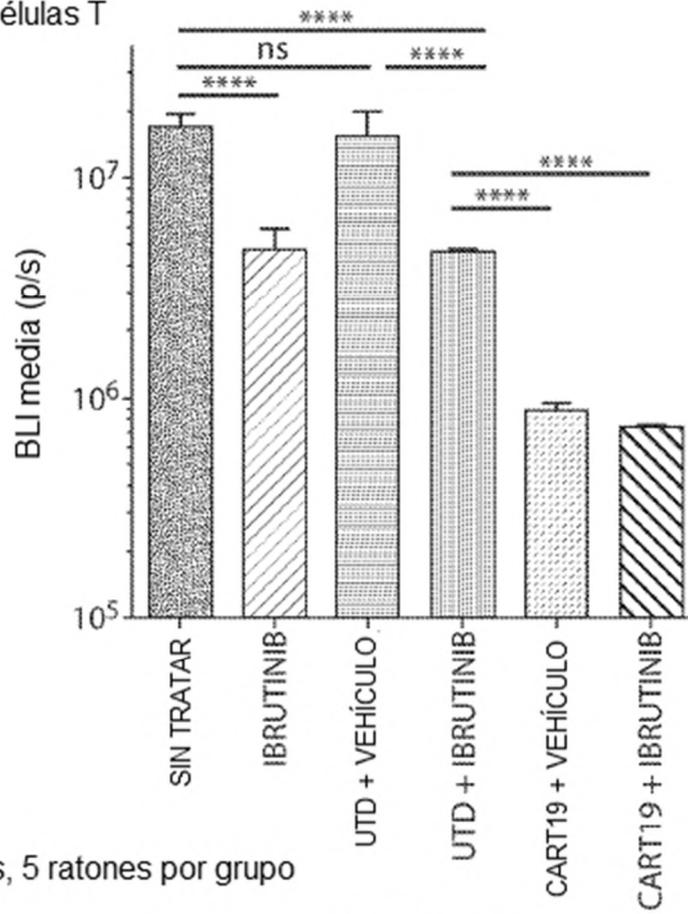


FIG. 23

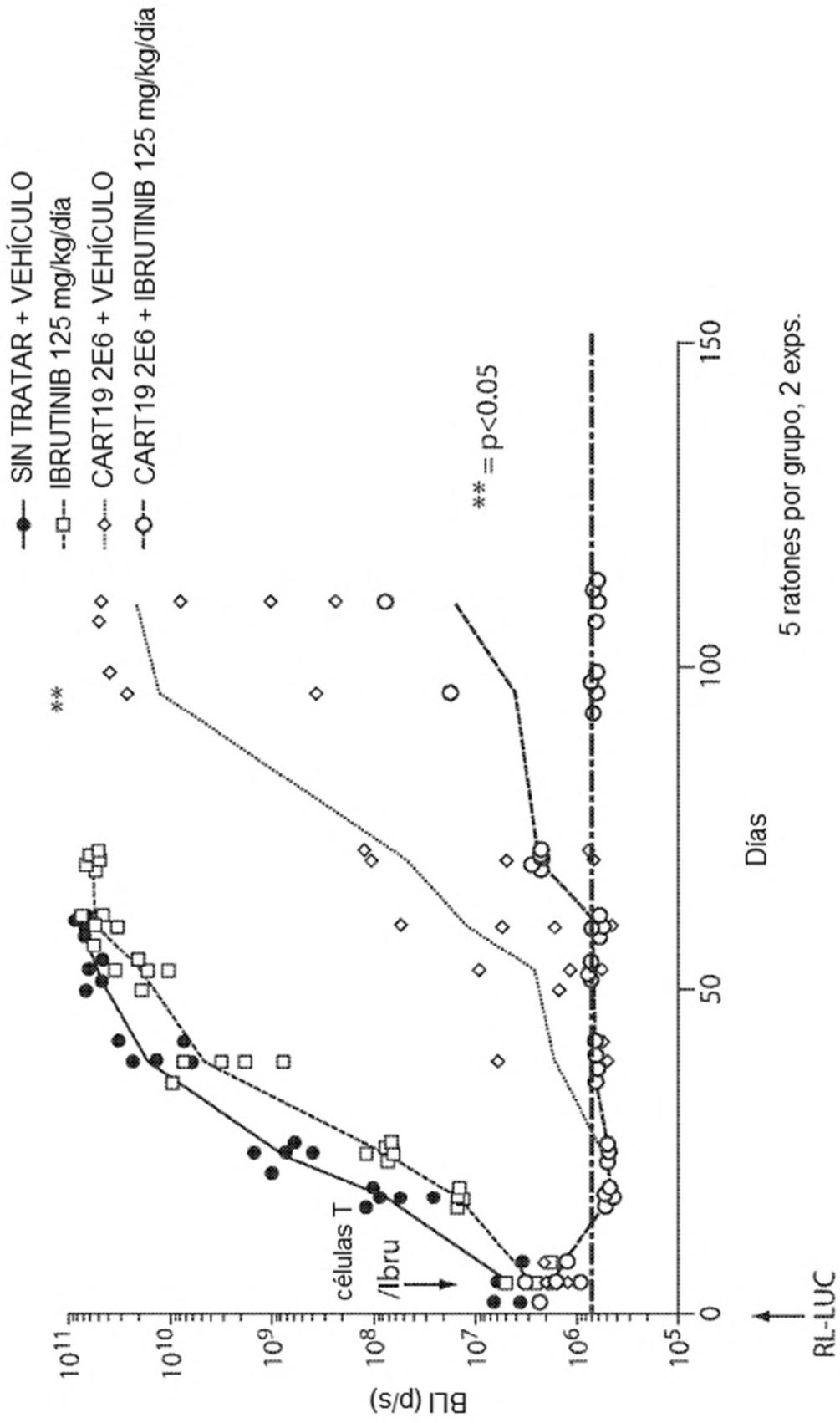


FIG. 24

citoquinas Th1

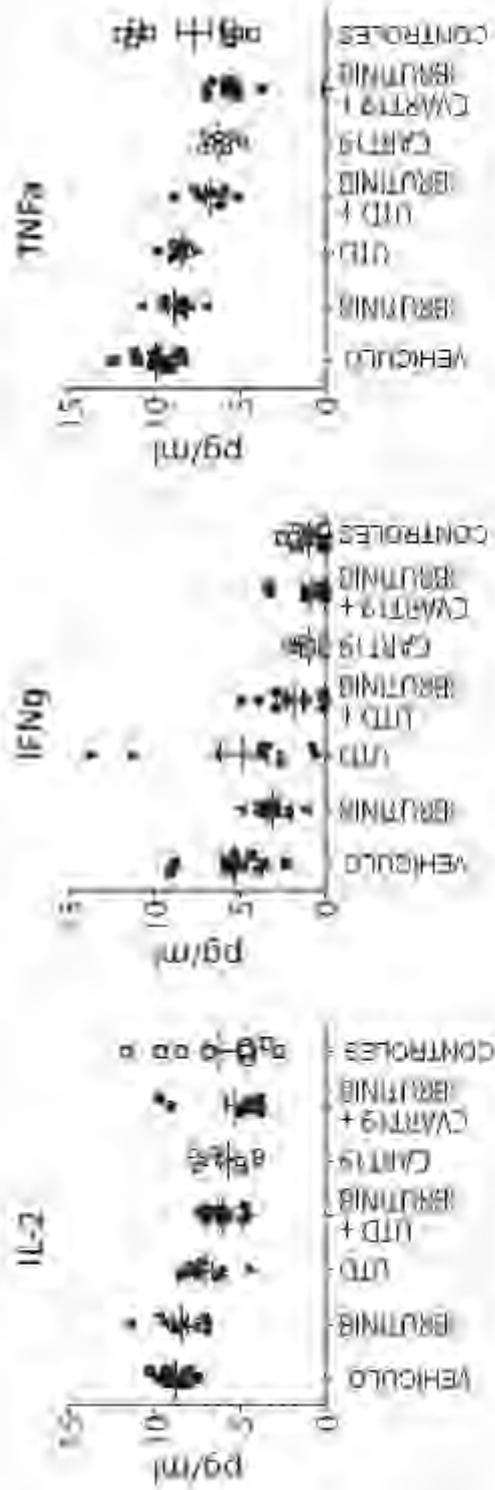


FIG. 25A

citoquinas Th2

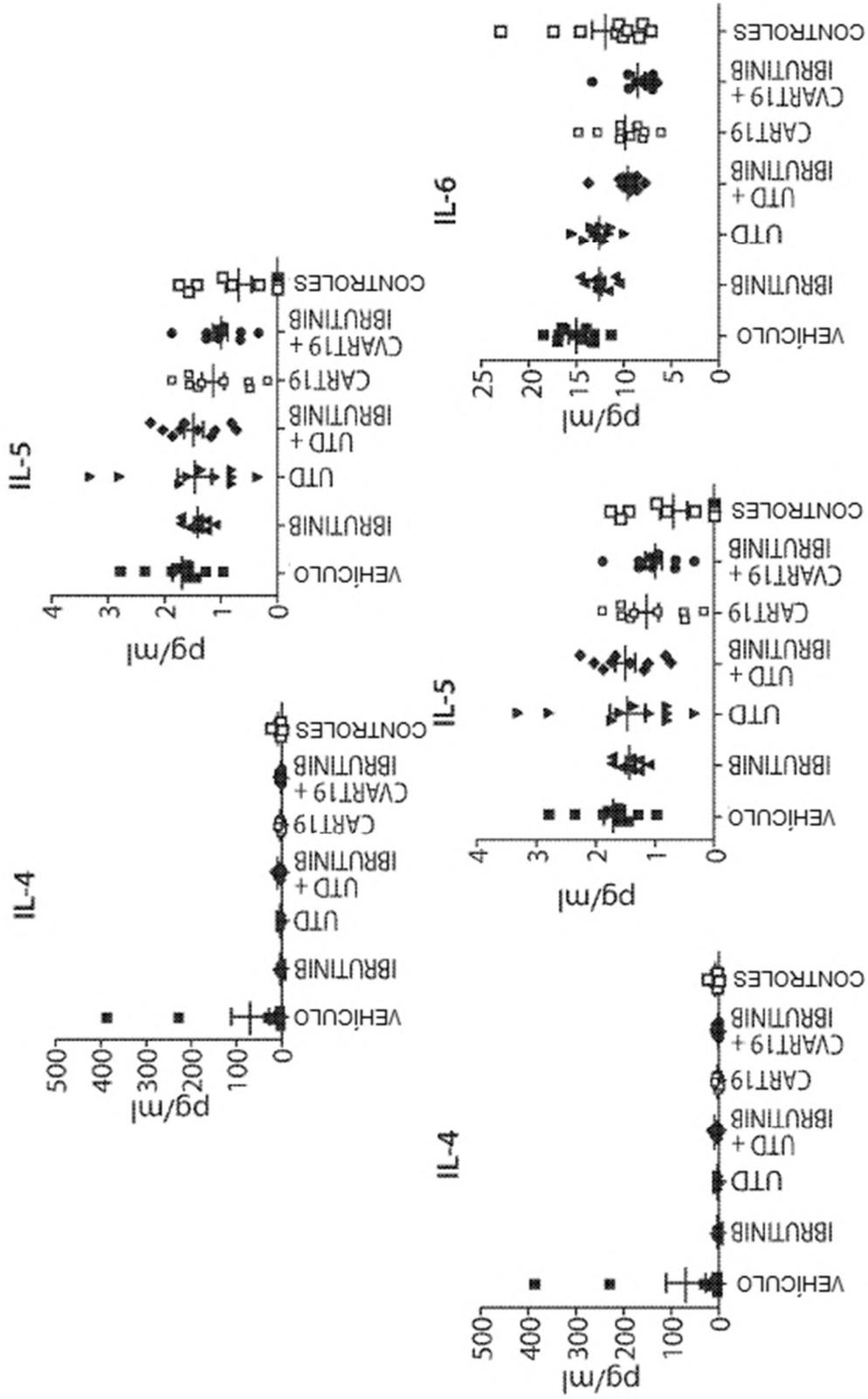
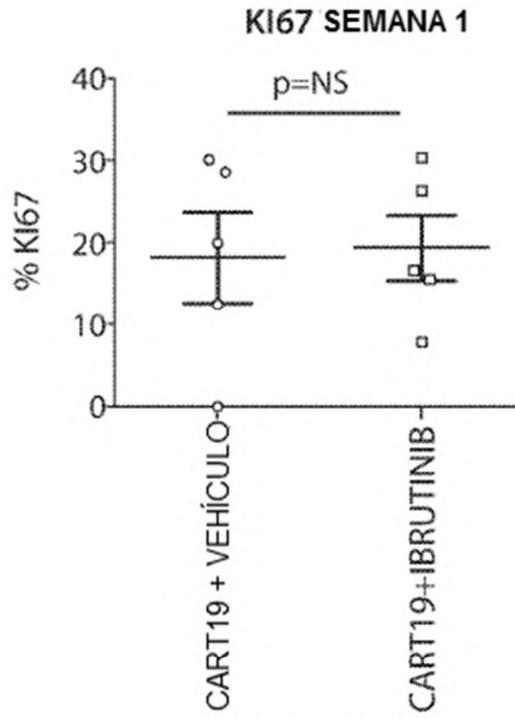
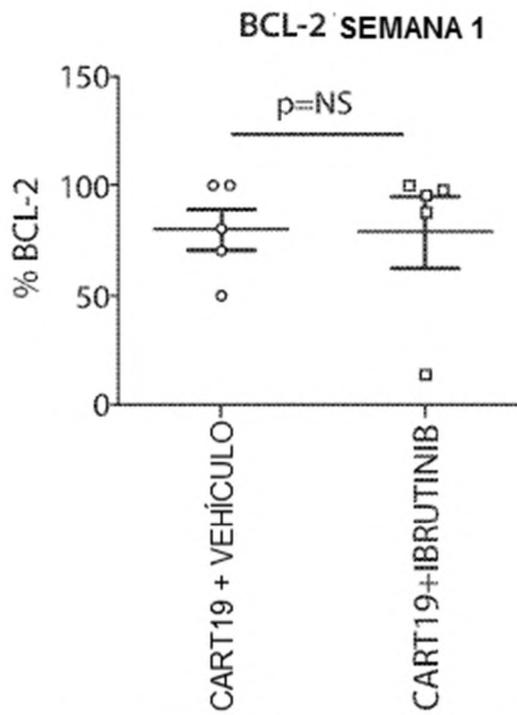


FIG. 25B



**FIG. 25C**



células T PB, 1 semana después de la infusión

**FIG. 25D**