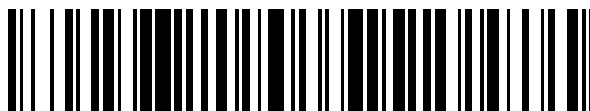


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 400**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2009** **E 09793553 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2358751**

54 Título: **Proteína CD20 truncada, delta CD20**

30 Prioridad:

18.11.2008 FR 0806444

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

05.10.2016

73 Titular/es:

ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG (EFS)
(100.0%)

20 avenue du Stade de France
93218 La Plaine Saint Denis, FR

72 Inventor/es:

FERRAND, CHRISTOPHE;
DESCHAMPS, MARINA;
HENRY, CAROLE;
TIBERGHIE, PIERRE;
BORG, CHRISTOPHE y
ROHRlich, PIERRE-SIMON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 585 400 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

Proteína CD20 truncada, delta CD20

5 La presente invención se refiere, en particular, a una proteína resultante de un corte y empalme alternativo del gen codificante de CD20, a las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de la proteína según la invención, a una forma mutada del gen codificante de CD20 así como fármacos, herramientas de diagnóstico, métodos de diagnóstico y métodos terapéuticos que utilizan la proteína y las secuencias de ácidos nucleicos según la invención.

10 La proteína CD20 expresada en los linfocitos B se codifica por un gen que pertenece a una familia localizada en el cromosoma 11 en la región q12. Esta región define un grupo de genes denominado MS4A (para subfamilia A con 4 dominios transmembrana), con 12 subgrupos designados de MS4A1 a MS4A12. Este grupo de genes se extiende sobre 600 Kb. La totalidad del gen CD20 abarca 41,17 Kb dividido en 8 exones separados por 7 intrones.

15 El ARN premensajero CD20 posee un tamaño de 14,95 Kb con una secuencia 5' no traducida (5' UTR) de 416 pb. La región 3' UTR posee 2.291 pb seguida por una extensión polyA y correspondería a una secuencia reguladora. La secuencia codifica potencialmente una proteína de 297 aminoácidos (AA) con un peso molecular predictivo de 33,0 KDa. Se han identificado diferentes sitios de corte y empalme en la región 5' UTR, específicamente en el exón 1, generando tres formas de transcritos de diversos tamaños que oscilan entre 2,8, 2,6 y 3,4 Kb.

20 No obstante, las diferentes formas de transcritos codificantes de la proteína CD20 con un peso molecular de 33KD; mediante membrana de Western e inmunoprecipitación, han demostrado la presencia de 3 isoformas de 33, 34,5 y 36 kD que no se corresponden con las variantes cortadas y empalmadas sino con las modificaciones post-transcripcionales, mediante fosforilación. Esta proteína constituye una región muy hidrófoba, con 4 segmentos transmembrana (AA 68 a 84), que define un dominio extracelular (AA codificados por el exón VI) y un dominio intracelular (AA codificados por el exón III, V, VII y VIII).

25 Aunque es muy utilizado como marcador de linfocitos B de sangre periférica, en técnicas de caracterización de la población linfocitaria o de diagnóstico de determinadas patologías o hemopatías B, la función de la proteína CD20 es, a fecha de hoy, apenas conocida. No obstante, la estructura proteica de la molécula CD20 humana o murina es similar a otras proteínas, tales como rodopsina, proteínas de unión de hendidura o determinados receptores adrenérgicos, todos implicados en la transducción de señales, lo que permite considerar un papel similar de esta proteína. La porción intracelular de esta proteína contiene numerosas secuencias de fosforilación y se asocia a las tirosina quinasas de la familia de src (Fyn, Lyn, Lck).

35 Los estudios funcionales *in vitro* y en modelos murinos con exclusión génica (KO) para CD20, revelaron que esta proteína estaba implicada en el transporte intermembranal de Ca⁺⁺. La unión de un Ac anti-CD20 a esta molécula induce asimismo un aumento de los oncogenes c-Myc y B-Myb, un aumento de la fosforilación de las proteínas intracelulares, un aumento de CD18, CD58 y moléculas del CMH clase II así como una activación de la tirosina quinasa que induce una adhesión de las células B. Estas funciones atribuidas a la proteína CD20 siguen siendo objeto de controversia debido a que el desarrollo y la función de células B en un modelo murino KO para CD20 se describieron como normales y no presentan anomalías fenotípicas particulares.

40 Se ha asignado otra función a la proteína CD20, que es la regulación del ciclo celular en la diferenciación de los linfocitos B (LB) y su activación/maduración en células plasmáticas. En la ontogénesis de los linfocitos B, CD20 se expresa en grandes cantidades en la superficie de las células pre-B (ausente en las pro-B), tras la reorganización de los genes codificantes de las cadenas pesadas de las Ig, con una expresión membrana persistente hasta un estadio terminal de células B maduras. CD20 no se expresa en las células madre hematopoyéticas, en las células pro-B y en las células plasmáticas, a excepción de un pequeño contingente de células, en determinadas circunstancias patológicas que podrían corresponder a plasmoblastos. Por último, cabe recordar que el ligando de CD20 es desconocido, lo que dificulta también la determinación de su función.

45 La expresión en la superficie de los linfocitos B permite la caracterización de esta población en citometría de flujo o la utilización en las técnicas de purificación inmunomagnética. La expresión de la molécula CD20 en la mayoría de las células B, implicadas en las patologías malignas representa de hecho una diana terapéutica de selección por varios motivos:

- marcador presente en LB y ausente en células madre y células plasmáticas,
- se expresa en grandes cantidades en la superficie celular,
- 60 - no se secreta o libera en la circulación tras la proteólisis,
- tras la fijación de anti-CD20, el complejo CD20/Ac no se internaliza.

70 Rituximab (Rx, nombre comercial: MabThera™) es un anticuerpo quimérico murino humanizado contra el antígeno CD20. Es activo contra las células malignas que presentan el antígeno CD20, es decir, en los linfomas foliculares de estadio III-IV y en los linfomas no Hodgkin agresivos difusos en células B grandes, CD20 positivos. Se utiliza

asimismo, asociado o no a la quimioterapia, y con carácter más experimental en otras patologías, como por ejemplo, determinadas enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus o artritis reumatoide.

5 Se seleccionó la porción Fc de IgH humana por su capacidad para fijar el complemento y causar citotoxicidad de tipo CCDA (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Los factores que influyen en la eficacia son diversos: densidad de expresión en superficie de CD20, difusión del anticuerpo, captura del anticuerpo anti-CD20 terapéutico, unión anticuerpo/diana, polimorfismo del receptor FcγR3.

10 La presente invención se basa en el descubrimiento de un corte y empalme alternativo del gen codificante de CD20 que da lugar a la expresión de una forma truncada de CD20. Este polipéptido (es decir, delta CD20 o ΔCD20) se elimina total o parcialmente de la parte transmembrana de CD20 natural (o CD20 n) que no permite el anclaje de delta CD20 a la membrana de los linfocitos B (*Blood*, vol. 112, n.º 11, 16 de noviembre de 2008, página 526).

15 Los solicitantes resaltaron que la expresión de delta CD20 se relacionó con la presencia de determinadas patologías. Es más, también se puso de manifiesto que el nivel de expresión de delta CD20 se relaciona con la evolución de estas patologías. Se trata más particularmente de patologías relacionadas con una disfunción de los linfocitos B (también conocidas como hemopatías B) que representan 85 a 90 % de las hemopatías linfoides. Incluyendo, entre otros, linfomas foliculares (LF), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA), linfoma de células de manto (LM), linfomas de células B, mieloma, enfermedad de Waldenström (EW).

20 Así, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico que comprende una secuencia idéntica a la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 17. Según un modo de realización muy preferente, dicha sonda oligonucleótida en una secuencia idéntica a la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 17.

25 En el contexto de la presente invención, el término "sustancialmente idéntica" se refiere a dos secuencias con más de 90 %, preferentemente 95 %, incluso más preferentemente 99 %, de manera muy preferentemente, 100 % de homología.

30 En el contexto de la presente invención, el término "polipéptido" se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende o no comprende modificaciones post-traduccionales. Preferentemente, el polipéptido según la invención se obtiene por síntesis o por ingeniería genética, en este último caso, se habla de proteína recombinante.

35 En el contexto de la presente invención, el término "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere en particular a las secuencias de ADN o ARN, naturales o sintéticas. Preferentemente, la secuencia de ácidos nucleicos según la invención es sintética u obtenida por ingeniería genética. Según otro modo de realización preferente, se trata de una secuencia de ácidos nucleicos completa o parcialmente purificada.

40 Los vectores recombinantes son muy conocidos por el experto en la materia, en particular, permiten la producción de proteínas recombinantes y/o la multiplicación de una secuencia de ácidos nucleicos. Numerosos vectores recombinantes se disponen en la técnica anterior, pueden citarse especialmente plásmidos y vectores virales. De este modo, según un modo de realización preferente, el vector recombinante según la invención se selecciona del grupo que comprende plásmidos y vectores virales.

45 Según un primer modo de realización, el vector recombinante según la invención es un vector viral. Los vectores virales se conocen adecuadamente por el experto en la materia y ya se utilizan clínicamente en seres humanos (p. ej., VVA, adenovirus, retrovirus). En la mayoría de los casos, se trata de un vector que comprende todo o parte del genoma de un virus modificado para integrar una secuencia exógena. Según un modo de realización preferente, el vector viral según la invención se selecciona del grupo que consiste en vectores de adenovirus, vectores de retrovirus, vectores de poxvirus, vectores que proceden del virus del herpes, vectores que proceden de virus adenoasociados y vectores que proceden de alfavirus. La presente invención se refiere igualmente a partículas virales que comprenden los vectores recombinantes según la invención.

50 Preferentemente, el vector recombinante según la invención se asocia a uno o una pluralidad de compuestos que facilitan su introducción en una célula huésped. Los compuestos que facilitan la introducción de un vector en una célula huésped se conocen adecuadamente por el experto en la materia y algunos se disponen comercialmente, también se hablará del mismo modo de agente de transfección. En un modo de realización muy preferente, el compuesto que facilita la introducción de un vector recombinante según la invención en una célula huésped se selecciona del grupo que comprende lípidos catiónicos, sales de calcio, polímeros catiónicos y polipéptidos.

55 En el contexto de la presente solicitud, el término "elemento necesario para la expresión en una célula huésped" se refiere a las secuencias de ácidos nucleicos que permiten la traslación y la traducción de una secuencia de ácidos nucleicos así como las secuencias de ácidos nucleicos que permiten aumentar dichas traducciones y traslaciones. Según un modo de realización preferente, el elemento necesario para la expresión en una célula huésped se selecciona del grupo que comprende intrones, sitios de poliadenilación y promotores.

60

En el contexto de la presente invención, el término célula huésped se refiere, en particular, a células procariotas y eucariotas. Entre estas células, pueden citarse bacterias, levaduras, células de insectos (p. ej., sf9) y células de animales (p. ej., CHO, 293, PERC6). La presente invención también se refiere a una célula huésped que comprende un vector recombinante según la invención.

5 El término "muestra biológica" se refiere a todos los fluidos o tejidos que contienen linfocitos B del paciente. Preferentemente, la muestra biológica es una muestra de sangre o de médula ósea del paciente.

10 El proceso de la invención puede aplicarse con una muestra biológica sin procesar (es decir, extraída sin haber sufrido modificaciones), pero también después de tratar la muestra biológica con todos los métodos que estime conveniente el experto en la materia. Entre estos tratamientos pueden citarse, la lisis de eritrocitos, el aislamiento de células mononucleares (p. ej., aislamiento en Ficoll) y/o la adición de moléculas que permiten la conservación de la muestra biológica (p. ej., antiproteasas). Técnicas tales como la lisis de eritrocitos y el aislamiento de células mononucleares permiten, en particular, aumentar la proporción de linfocitos B con respecto a otras células presentes en la muestra biológica. Así, según un modo de realización preferente, el proceso de diagnóstico según la invención comprende además una etapa que permite aumentar la proporción de linfocitos B con respecto a otras células presentes en la muestra biológica.

20 Con respecto al polipéptido, puede tratarse de la proteína antes o después de las modificaciones post-traduccionales y completa o escindida. El proceso se refiere a la detección completa o parcial del polipéptido, por lo que de este modo es posible detectar solo una parte del ARNm o polipéptido, siempre que el nivel de expresión de esta parte sea representativo de la expresión de la totalidad de la molécula.

25 En la presente solicitud, el término "nivel de expresión" se refiere a la cantidad de delta CD20 expresada por las células. La medición del nivel de expresión puede realizarse de manera cuantitativa o semicuantitativa, de hecho, no es necesario conocer la cantidad exacta de delta CD20, expresada por las células, sino simplemente determinar si esta cantidad es significativamente superior a una norma. Esta norma puede determinarse fácilmente por el experto en la materia utilizando un conjunto de individuos sanos y midiendo el nivel de expresión de delta CD20 en las células de estos individuos. En caso de que el proceso según la invención revele un nivel de expresión de delta CD20 en las células de los pacientes superior al nivel de expresión normal, dicho paciente padecerá probablemente una disfunción de los linfocitos B.

35 Según un modo de realización preferente, la medición del nivel de expresión del polipéptido según la invención es la medición del nivel de expresión de ARNm codificante de dicho polipéptido. Las técnicas que permiten medir la cantidad de ARNm codificante específicamente de una molécula se conocen adecuadamente por el experto en la materia. Entre estas técnicas pueden citarse RT-PCR cuantitativa, RT-PCR semicuantitativa, membrana de Northern y la técnica de chips de ADN (en inglés "*microarrays*"). La construcción y la producción de sondas y oligonucleótidos necesarios para la aplicación de estas técnicas se hallan dentro del alcance del experto en la materia. Entre estos oligonucleótidos, pueden citarse más particularmente los descritos por SEQ ID NO: 14 a SEQ ID NO: 17, que son también objeto de la presente invención. Por consiguiente, según un modo de realización aún más preferente, la medición del nivel de expresión de ARNm codificante del polipéptido según la invención se realiza por RT-PCR cuantitativa, RT-PCR semicuantitativa, RT-PCR cuantitativa en tiempo real, membrana de Northern o por la técnica de chips de ADN.

45 Según otro modo de realización preferente, dicha medición del nivel de expresión de un polipéptido según la invención y/o de un ARNm codificante de un polipéptido según la invención es la medición del nivel de expresión de un polipéptido según la invención y/o de un ARNm codificante de un polipéptido según la invención en el interior de los linfocitos B.

50 Según un modo de realización preferente, el proceso de diagnóstico según la invención es un proceso de diagnóstico de una patología relacionada con una disfunción de uno o una pluralidad de linfocitos B del paciente. Según un modo de realización muy preferente, la patología relacionada con una disfunción de uno o una pluralidad de linfocitos B se selecciona del grupo que comprende hemopatías B, linfomas foliculares (LF), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA), linfoma de células de manto (LM), linfomas de células B, mieloma, y enfermedad de Waldenström (EW).

60 En el trasplante de órganos sólidos, incluyendo el trasplante de riñón, la pérdida de los injertos alogénicos sigue siendo un problema importante. El papel de los mecanismos de los aloanticuerpos del donante en el rechazo hiperagudo se conoce adecuadamente y se domina parcialmente, al igual que los rechazos precoces y tardíos relacionados con las células T. No obstante, los tratamientos que afectan al compartimento linfocitario T tienen un impacto reducido en la supervivencia a largo plazo de los injertos, lo que sugiere otros mecanismos efectores diana.

65 El corte y empalme del gen CD20 identificado, genera transcritos eliminados cuya secuencia permanece en la fase de lectura. La transcripción de la forma cortada y empalmada de ARNm o la traducción en la proteína pueden interferir con la expresión de la proteína normal CD20 y alterar su expresión en la superficie, lo que puede modular la eficacia del tratamiento con Rituximab. Recientemente se ha descrito en la bibliografía, o la adquisición de

resistencia a un anticuerpo anti-CD20 (Rituximab) en líneas celulares de linfomas se asocia a los mecanismos de regulación pre- y post-transcripcional o fenómenos epigenéticos. Por consiguiente, la proteína delta CD20 constituye pues una nueva diana terapéutica para mejorar la eficacia del tratamiento con Rituximab y evitar fenómenos de escape y recaída.

5 En el trasplante de riñón, un estudio del transcriptoma de alto rendimiento, en pacientes con rechazo agudo ha permitido definir un grupo de genes característicos de la población de linfocitos B, característica de determinados tipos de rechazo agudo, normalmente no distinguibles por microscopía óptica. Estudios complementarios con técnicas de inmunohistoquímica han confirmado una fuerte presencia de linfocitos B CD20+ que infiltran el injerto. Finalmente, se demostró la persistencia de células CD20+ que infiltran el injerto renal post-tratamiento con Rituximab, mientras que se eliminó el conjunto de linfocitos B circulantes.

15 A raíz de estos trabajos, los equipos han descrito estudios que se refieren al tratamiento con anticuerpo anti-CD20 (Rituximab) en el caso de un trasplante renal o cardíaco en pacientes con rechazo agudo precoz. En el caso con mayor número de rechazo agudo resistente al tratamiento con corticosteroides, ATG y plasmaféresis, los resultados han sido alentadores con una supervivencia de los injertos al 85 % a 2 años.

20 Generalmente, en el trasplante de órganos sólidos, existe un interés creciente en el compartimento linfocitario B, implicado en la producción de autoanticuerpos. Entre los agentes orientados selectivamente a esta población de linfocitos B, Rituximab muestra naturalmente su interés por inhibir la respuesta B, de forma preventiva (pre-trasplante) como tardía (se orienta selectivamente a células B de memoria). La utilización del proceso de diagnóstico según la invención (p. ej., en fragmentos de biopsia o muestras de orina no invasivas) y nuestra estrategia de inmunoterapia orientada selectivamente a la proteína Δ CD20 son útiles para predecir el rechazo agudo y mejorar el tratamiento con Rituximab.

25 De este modo, según un modo de realización muy preferente, la patología relacionada con una disfunción de uno o una pluralidad de linfocitos B es el rechazo agudo al injerto.

30 Así, según otro modo de realización preferente, el proceso de diagnóstico según la invención es un proceso para evaluar la eficacia de un tratamiento que comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20. Según un modo de realización muy preferente, dicho anticuerpo anti-CD20 es Rituximab.

La presente solicitud se refiere también a un kit que permite aplicar el proceso de diagnóstico según la invención.

35 La presente invención también se refiere a la utilización de un kit de diagnóstico según la invención para la detección de una patología relacionada con una disfunción de uno o una pluralidad de linfocitos B. Según un modo de realización preferente, dicha patología relacionada con una disfunción de uno o una pluralidad de linfocitos B se selecciona del grupo que comprende hemopatías B, linfomas foliculares (LF), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA), linfoma de células de manto (LM), linfomas de células B, mieloma y enfermedad de Waldenström (EW). Según otro modo de realización preferente, dicha patología relacionada con una disfunción de uno o una pluralidad de linfocitos B es el rechazo agudo al injerto.

45 La presente invención también se refiere a la utilización de un kit de diagnóstico según la invención para la evaluación de la eficacia de un tratamiento que comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20. Según un modo de realización preferente, dicho anticuerpo anti-CD20 es Rituximab.

50 Delta CD20 es una diana ideal para una estrategia de inmunoterapia (vacunación). Más particularmente, esta estrategia de inmunoterapia resulta útil en el contexto de las patologías asociadas con el tratamiento que utiliza un anticuerpo anti-CD20 (p. ej., Rituximab) a fin de evitar resistencias y mejorar el tratamiento. De hecho, los inventores han demostrado por membrana de Western, un aumento de la señal generada por la proteína truncada cuando la resistencia a rituximab, inducida *in vitro* (línea B con presión de selección con Rituximab), se relaciona con el aumento de la señal obtenida por RT-PCR cuantitativa a partir de ARNm de las mismas poblaciones. Esto significa que las células que expresan la mayor parte de delta CD20 se evaden y resisten al tratamiento convencional con Rituximab. La proteína truncada, delta CD20 es una diana proteica potencial para una respuesta celular citotóxica T. Del mismo modo, los ARNm cortados y empalmados, también descritos, son una diana interesante, para las tecnologías de oligonucleótidos antisentido o enfoques de ARN de silenciamiento (ARNsi). El fin de estos 2 últimos enfoques es permitir la extinción *in vivo* de este corte y empalme alternativo.

60 La vacunación o inmunoterapia peptídica es un enfoque terapéutico que actualmente es objeto de gran interés en el contexto de prevención o tratamiento de cánceres. Su principio se basa en la inmunización con péptidos que reproducen epítopos T de antígenos tumorales reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (LTC), que desempeñan un papel importante en la eliminación de células cancerosas que expresan estos antígenos en su superficie.

65 Los LTC no reconocen los antígenos proteicos enteros, sino fragmentos peptídicos de los mismos, presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) expresadas en la superficie de diferentes células. Estos fragmentos peptídicos constituyen los epítopos T.

- 5 La presentación de estos péptidos es el resultado de un procedimiento complejo, denominado "procesamiento del antígeno", que consta de 3 etapas principales: 1/degradación citosólica de antígenos por un complejo multienzimático denominado proteosoma, 2/translocación de péptidos a partir de esta degradación en el retículo endoplasmático (RE) por los transportadores TAP, 3/asociación de estos péptidos con el CMH para formar complejos estables de péptido/CMH, que se exportarán a la superficie celular.
- 10 Los epítomos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH I) poseen generalmente 8 a 11 aminoácidos, y se reconocen por las células T CD8+, que representan el constituyente principal de la respuesta citotóxica.
- 15 La identificación de estos epítomos, y especialmente (dado el papel esencial de la respuesta CD8+ en la citotoxicidad) de los presentados por CMH I, constituye, por consiguiente, una etapa esencial para el desarrollo de inmunoterapias antitumorales.
- 20 Numerosos antígenos tumorales capaces de inducir una respuesta de LTC se conocen en la actualidad. Algunos de los epítomos T de estos antígenos se han identificado, y la eficacia de las vacunas basadas en péptidos que reproducen estos epítomos T se ha demostrado en muchos casos.
- 25 Tras el descubrimiento de un nuevo corte y empalme alternativo del gen CD20 humano (delta CD20) y la detección de una proteína codificada por este ARNm truncado, el solicitante ha reflejado el impacto de dicha diana en inmunoterapia anti-tumoral. De hecho, los resultados obtenidos muestran un papel de esta proteína diana (no se expresa en los linfocitos B de donantes sanos) en la oncogénesis así como su implicación en la resistencia al tratamiento con anticuerpos anti-CD20 (Rituximab).
- 30 La puesta en relieve de la proteína delta CD20 y la inducción de una respuesta citotóxica T contra un péptido que se superpone en la zona de unión de corte y empalme permite aplicar la inmunoterapia mediante la vacunación además de tratamientos convencionales (anticuerpo anti-CD20 (Rituximab)) de las patologías asociadas a una disfunción de los linfocitos B o rechazo agudo del trasplante. Esta vacunación puede realizarse directamente con un péptido, o por medio de un vector recombinante codificante de dicho péptido.
- 35 Así, la presente invención también se refiere a la utilización de un polipéptido definido a continuación, una secuencia de ácidos nucleicos definida a continuación, un vector recombinante que comprende la secuencia de ácidos nucleicos definida a continuación para la preparación de un fármaco. Según un modo de realización preferente, dicho polipéptido comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que comprende 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: 13. Según un modo de realización aún más preferente, dicho polipéptido consiste en un polipéptido con una secuencia seleccionada del grupo que comprende 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: 13.
- 40 La presente invención también se refiere a la utilización de una secuencia de ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que comprende 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: 13 para la preparación de un fármaco. Según un modo de realización preferente, la utilización de una secuencia de ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido con una secuencia que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que comprende 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: 13, para la preparación de un fármaco.
- 45 Según un modo de realización aún más preferente de estas utilidades para la preparación de un fármaco, dicho polipéptido comprende al menos una secuencia, tal como la SEQ ID NO: 9. Según un modo de realización muy preferente, la utilización según la invención se caracteriza por que dicho polipéptido consiste en un polipéptido con una secuencia, tal como SEQ ID NO: 9.
- 50 Según un modo de realización preferente, dicho fármaco sirve para mejorar la eficacia de un tratamiento que comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20. Según un modo de realización aún más preferente, dicho anticuerpo anti-CD20 es Rituximab.
- 55 Según un modo de realización preferente, dicho fármaco para el tratamiento o la prevención de hemopatías B, linfomas foliculares (LF), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA), linfoma de células de manto (LM), linfomas de células B, mieloma y enfermedad de Waldenström (EW).
- 60 La presente invención también se refiere a un polipéptido con una secuencia seleccionada del grupo que comprende 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: 13.
- 65 Otro enfoque puede ser una transferencia génica codificante del anticuerpo según la invención, redirigiendo de este modo los linfocitos T contra esta proteína. El desarrollo de un anticuerpo monoclonal contra esta proteína permitirá

identificar en paralelo las secuencias codificantes de las regiones hipervariables (CDR3) de las cadenas ligera y pesada de la Ig. Las secuencias identificadas pueden transfectarse entonces a las células T por transferencia génica; el acoplamiento con un gen suicida permite controlar la respuesta T anti- Δ CD20 aunque se limitará a los T activados tumorales que expresan esta forma de proteína. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a la utilización de un anticuerpo según la invención o una secuencia de ácidos nucleicos codificantes de dicho anticuerpo o un vector que comprende dicha secuencia de ácidos nucleicos para la preparación de un fármaco, y preferentemente para la preparación de un fármaco para el tratamiento de patologías cuyo listado se relaciona con una disfunción de los linfocitos B como se describe en la presente solicitud.

CD20, es tanto un marcador membrana, puesto que se expresa en la superficie de las células B, como un gen de "susceptibilidad", ya que codifica la molécula diana del tratamiento con anticuerpo anti-CD20 (Rituximab) en determinadas hemopatías. Estas 2 propiedades pueden utilizarse en terapia génica para modificar *ex vivo* (p. ej., por vía retroviral) o *in vivo* células T (que normalmente no expresan CD20). Esto resulta útil para modular y controlar las complicaciones post-aloinjerto de médula ósea, que son responsables de los linfocitos T (LT). Por consiguiente, tras la modificación génica, las células pueden seleccionarse (p. ej., por un sistema inmunomagnético), en base a la expresión de CD20 (no expresadas normalmente por los LT) y pueden orientarse selectivamente *in vivo* por un anticuerpo anti-CD20 (Rituximab) en caso de aparición de complicaciones (enfermedad del injerto contra el huésped o *Graft versus Host Disease*: EICH).

Si se tiene interés en utilizar el gen CD20 en los protocolos de modificaciones génicas como marcador seleccionable y como gen de susceptibilidad, varios estudios han mostrado una inestabilidad de la expresión de este gen bajo el promotor LTR de retrovirus que se caracteriza por una expresión débil incompatible con su utilización como gen de susceptibilidad. La producción de un corte y empalme alternativo del gen CD20 puede ser origen de la modulación de la expresión. Además se ha sido capaz de demostrar la presencia de transcritos alternativos en las líneas de empaquetado de las secuencias retrovirales transfectadas con un vector que transporta el ADNc de CD20 "longitud completa". Por consiguiente, esta línea va a generar partículas retrovirales Δ CD20 que pueden infectar células diana pero sin expresión de CD20 en la superficie, lo que limita la eficacia de la transducción retroviral. Por otra parte, las células diana transducidas van a expresar la forma cortada y empalmada de los transcritos CD20, que puede alterar su sensibilidad a Rituximab.

De este modo, el descubrimiento de un corte y empalme alternativo, y sitios donantes y aceptores relativos a este corte y empalme, permite producir una secuencia de ácidos nucleicos codificantes de CD20 natural y comprenden modificaciones en dichos sitios donantes y/o aceptores para evitar dicho corte y empalme alternativo. Así, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico codificante de CD20 caracterizada por que no comprende un sitio de corte y empalme alternativo. Según un modo de realización preferente, dicha secuencia comprende una secuencia, tal como SEQ ID NO: 5 y más preferentemente, dicha secuencia consiste en una secuencia, tal como SEQ ID NO: 5. La presente invención también se refiere a vectores recombinantes como se han definido previamente que comprenden dicha secuencia de ácidos nucleicos. La presente invención también se refiere a partículas virales que comprenden dichos vectores recombinantes, dichos vectores recombinantes asociados con uno o una pluralidad de compuestos que facilitan su introducción en una célula huésped, tales como se han definido previamente así como células huésped (como se han definido previamente) que comprenden dicho vector recombinante. La presente invención también se refiere a la utilización de dicha secuencia de ácidos nucleicos o dicho vector recombinante para la preparación de un fármaco, preferentemente para la preparación de un fármaco para la mejora de la eficacia de un tratamiento que comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20, y aún más preferentemente dicho anticuerpo anti-CD20 es Rituximab.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos, secuencias de ácidos nucleicos, anticuerpos y/u oligonucleótidos según la invención y un tampón farmacéuticamente aceptable.

EXPERIENCIAS

1. Puesta en relieve del corte y empalme alternativo del gen codificante de CD20.

Con el fin de clonar el ADNc codificante de CD20 en un esqueleto plasmídico retroviral, se amplificó por RT-PCR a partir de ARN extractos de la línea B DAUDI, el segmento correspondiente a la totalidad de la región codificante (CDS) de la proteína CD20, utilizando 2 cebadores que abarcan los codones "de iniciación o *start*" y "de terminación o *stop*", respectivamente.

La electroforesis de los productos de PCR reveló 2 bandas distintas, una con un tamaño esperado de 894 pb y la otra con un tamaño inferior a 393 pb y con intensidad idéntica.

La secuenciación y el alineamiento en CNIB GenBank revelaron una secuencia que corresponde al fragmento codificante del gen CD20, eliminado en su parte central de 501 pb, con conservación de codones de "inicio" y "terminación". El análisis de la delección en la proteína muestra que la parte transmembrana se elimina prácticamente por completo lo que es desfavorable para un ancla de esta proteína en la superficie membrana de las células.

La proteína truncada posee una secuencia de 131 aminoácidos con un peso molecular predictivo de 15 kD e incluye el dominio C-terminal citoplásmico, una pequeña parte del primer dominio transmembrana y el extremo del dominio N-terminal intracitoplasmático. La proteína truncada potencial no se ancla a la membrana por ausencia de expresión de 4 segmentos transmembrana, como se ha podido demostrar a través de imágenes por microscopía confocal, por transfección de líneas celulares con un vector que expresa una proteína de fusión CD20 n/PVF o Δ CD20/PVF. La proteína Δ CD20 n/PVF o CD20/PVF se expresó en células eucariotas 293T tras la transfección con un vector de expresión pcDNA3.1 CT topo (Invitrogen). La proteína PVF se clonó en la fase de lectura de la secuencia de CD20 (Δ o N). La revelación de la proteína PVF se realizó por excitación directa (color verde) y la proteína CD20 n por un anticuerpo antiCD20 acoplado a TIRTC (color rojo). De este modo, el marcado es citoplásmico en las células transfectadas con la forma truncada de CD20 mientras que se observa una colocalización esencialmente membranal de marcas verdes y rojas correspondientes a PVF y CD20 n. Esto confirma que la expresión de Δ CD20 se limita al citoplasma.

El análisis de la secuencia natural codificante del gen CD20 (CD20 N) utilizando los programas predictivos de los sitios de corte y empalme, sitios donantes y aceptores de corte y empalme (software NNSPLICE v0.9 - http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.htm) mostró la presencia de un sitio donante (SD) y un sitio aceptor (SA) críptico, correspondiente exactamente a la secuencia codificante del gen CD20 delecionado (Δ CD20). Investigaciones más detalladas con otros paquetes de programas (NetGene 2 - <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) ayudaron a resaltar un sitio de empalme, situado en una veintena de pares de bases del sitio aceptor.

1. Expresión de la proteína Δ CD20

a. Detección por membrana de Western

A partir de líneas celulares de origen B, se investigó por membrana de Western, con anticuerpos disponibles anti-CD20 que reconocen la parte C-terminal de la proteína (Thermo Fischer, n.º RB9013), la presencia de una proteína truncada (sin parte transmembrana, pero citoplasmática) codificada por los transcritos "cortados y empalmados". Por consiguiente, se ha podido demostrar, además de la banda esperada correspondiente a la proteína CD20 natural, la presencia de una banda de tamaño esperado (~17KD) correspondiente a la proteína Δ CD20. Esta proteína no se expresa en las líneas T.

2. Δ CD20: biomarcador molecular de diagnóstico y/o pronóstico de hemopatías B o complicaciones (rechazo agudo, linfomas) post-aloinjerto renal

a. Transcritos alternativos Δ CD20y hemopatías B

Se ha experimentado, con un ensayo de PCR cualitativa, la amplificación total de la secuencia codificante (flCD20 PCR) de otras líneas obtenidas a partir de hemopatías B de diferentes tipos (Burkitt, LLA pre-B, VEB B transformada) y se ha mostrado que la forma corta del transcrito CD20 estaba presente en todas las líneas B y ausente en las líneas T. A continuación, se desarrolló una herramienta de PCR sensible y específica (PCR Δ CD20), mediante el diseño de un cebador que incluye el sitio de unión de este corte y empalme. Esta nueva herramienta permite poner de relieve únicamente la forma corta de ARNm y de este modo evitar los fenómenos de competencia en PCR, incompatibles con una gran sensibilidad.

Con esta herramienta de PCR más eficiente, se investigó la forma corta de CD20 en CMSP o para ser más sensible en las células B CD19+ o CD20+ de 5 donantes sanos sin ser capaz de detectarla. La investigación específica del transcrito truncado, gracias a nuestra herramienta sensible de PCR mostró una señal positiva en las líneas y una señal negativa en CMSP, lo que sugiere la presencia de este mecanismo de corte y empalme en las células transformadas por VEB, en las células malignas y ausencia en las células B normales. Esta forma truncada de ARN CD20 es pues la firma de un estado de activación de las células B asociado con el fenotipo maligno.

b. Cuantificación en el diagnóstico de Δ CD20 en los diferentes tipos de hemopatías B

A fin de ilustrar la posibilidad de utilizar la cuantificación de los transcritos Δ CD20 en el diagnóstico de ciertas hemopatías, se ha aplicado nuestro ensayo de RT-PCRc en diferentes tipos de hemopatías B. La cuantificación de 2 formas (longitud completa y truncada) se realizó contra un intervalo de diluciones en serie, de cantidades conocidas de plásmidos convencionales que poseen las formas n o Δ de CD20. El cálculo de la relación $R = [\Delta$ CD20/(CD20 n + Δ CD20)] x 100 permite expresar la cantidad relativa de transcrito CD20 con respecto a la forma natural. Se ha podido también demostrar una expresión diferencial de estos transcritos alternativos en diferentes hemopatías B. Se ha cuantificado la forma cortada y empalmada de Δ CD20 [expresada en % de Δ CD20: $R = (\Delta$ CD20/CD20 n + Δ CD20) x 100] en las líneas VEB B transformadas *in vitro* (2,9 ± 4,51 %, n=6), en células CD19+ purificadas de amigdalectomías (9 ± 2,2 %, n=7) y blastos B producidos *in vitro* (activación ligando FLT3) (14 ± 7,8 %, n=5). De forma interesante, se cuantificó Δ CD20 en 3,6 ± 5,1 % en LLA B (n=27), 3,9 ± 5,3 % en linfomas foliculares (n=5); 2,9 ± 4,5 % en linfomas de células de manto (n=6); 3,2 ± 2,2 % en linfomas de alto grado (n=5); y 0,1 ± 0,2 % en LLC B (n=8).

c. Δ CD20: Marcador de enfermedad residual (MER)

Otra posibilidad es utilizar también nuestro ensayo de cuantificación mediante PCR en tiempo real para controlar la eficacia del tratamiento (quimioterapia asociada o no con Rituximab - Rx, por ejemplo). Este ensayo es ideal para hemopatías que no presentan marcadores moleculares o fenotipos característicos. La cinética de la cuantificación de Δ CD20 se comparó con la expresión de los marcadores moleculares convencionales, tales como los transcritos BCR/ABL (p190) y ciclina D1, respectivamente, en el caso de LLA B y linfoma de células de manto. Se ha demostrado una correlación entre los marcadores habituales (ciclina D1 y BCR/ABL p190) y Δ CD20.

3. La proteína Δ CD20, potencial diana terapéutica

a. Resistencia a un anticuerpo anti-CD20 (Rituximab)

Se estableció *in vitro* resistencias a Rx a partir de líneas B, exponiéndolas a diferentes dosis y tiempos. En ensayos de sensibilidad *in vitro*, se permitió verificar la adquisición de la resistencia.

Curiosamente, se ha demostrado por membrana de Western una intensificación de la señal de la forma truncada de la proteína CD20 en función de la adquisición de la resistencia a Rx de la población. Específicamente, se cuantificó el ARNm codificante de Δ CD20 en las células de pacientes que padecen linfomas foliculares (n=3) o linfoma de células de manto (n=3). Se observó que la adquisición de resistencia a Rituximab era, en cada caso, relacionada con un aumento de la cantidad de ARNm codificante de Δ CD20 (promedio x 3,38).

b. Construcción de oligopéptidos específicos de Δ CD20.

Por consiguiente, a partir de la traducción de la secuencia de ARNm Δ CD20, se utilizó la base SYFPEITHI (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) para designar los péptidos que se superponen (AA30 a AA39) en la zona de unión de corte y empalme alternativo y en consecuencia específicos de la forma Δ CD20). Gracias a una herramienta predictiva de escisión por la proteasoma (<http://paproc.de>), se han destacado 2 péptidos (n.º 4 RMS y n.º 7 SLE) potencialmente inmunógenos interesantes ya que potencialmente se preparan por enzimas del proteasoma y se restringen a HLA-A*0201.

Los péptidos correspondientes a estas secuencias se sintetizaron mediante MILLEGEN (LABEGE, Francia), después se disolvieron en DMSO al 20 % y se almacenaron a -80 °C.

La afinidad de unión de los péptidos identificados de este modo para la molécula del CMH relevante, así como la estabilidad del complejo péptido/molécula del CMH I se verificó *in vitro* (datos no mostrados).

c. Inducción de una respuesta T citotóxica mediante vacunación peptídica

La inmunogenicidad de péptidos Δ CD20 se evaluó por la generación de LTC en ratones transgénicos HLA-A2/DR1 y con exclusión génica (KO) para H-2 clase I y II.

Los ratones (4 por grupo) se inmunizan con conjuntos de 2 o 3 péptidos (2 inyecciones en la base de la cola en intervalos de 8 días) con: 50 μ g de cada péptido, 100 μ g de péptido auxiliar (péptido 20 mer obtenido a partir de pp65 específico de CMV), todo coemulsionado con adyuvante incompleto de Freud.

Siete días tras la segunda inmunización, los bazo de los ratones se extirpan y los esplenocitos se vuelven a estimular *in vitro* con 4 μ g/ml de cada péptido por separado. Al quinto día de cultivo, las poblaciones que responden se ensayan para determinar una citotoxicidad específica. Las células cuya citotoxicidad resultó concluyente, se vuelven a estimular *in vitro* en intervalos semanales con el fin de obtener LTC específicos.

Las células RMA-S se utilizan como dianas para estudiar la citotoxicidad. Estas células diana se cargan con 10 μ g/ml del péptido de ensayo, o un péptido de control irrelevante, a 37 °C durante 90 minutos y luego se marcan con 100 μ Ci de ⁵¹Cr durante 90 minutos, después se lavan tres veces. Los esplenocitos se cultivan en placas de 96 pocillos con fondo en V (3x10³ células/pocillo en 100 μ l de RPMI 1640 + suero de ternera fetal al 10 %). A continuación, se añaden 100 μ l de células efectoras (relación de células efectoras/células diana = 30:1; 10:1; 3:1 y 1:1) a los pocillos y las placas se incuban a 37 °C durante 4 horas. Tras la incubación, se recogen 50 μ l de sobrenadante, se transfieren a placas específicas (Lumaplate) y se mide la radiactividad en un contador γ . El porcentaje de lisis específica se calcula mediante la fórmula: [(liberación de ⁵¹Cr experimental - liberación de ⁵¹Cr espontánea)/(liberación de ⁵¹Cr máxima - liberación de ⁵¹Cr espontánea)] X 100.

Tres de cada 4 ratones del grupo de inmunización A han desarrollado claramente una respuesta T citotóxica contra el péptido n.º 4 y no hay respuesta alguna contra un tercer péptido BMLF1, específico para VEB, lo que indica la especificidad de la respuesta.

Estos resultados muestran que la inmunización con el péptido RMS genera LTCs que destruyen las dianas RMA5-HHD cargadas con el mismo péptido, pero no las células cargadas con el péptido irrelevante.

5 Estos trabajos muestran claramente que se podría obtener una respuesta LTC anti- Δ CD20 que puede utilizarse para mejorar el tratamiento con anticuerpos anti-CD20 y prevenir o eliminar la persistencia de linfocitos B tumorales CD20+ (que expresan la proteína Δ CD20).

10 4. La producción por mutagénesis dirigida de una secuencia codificante CD20 no puede sufrir cortes y empalmes alternativos.

15 Por consiguiente, se propuso mutar la secuencia natural del gen CD20 humano, con el fin de limitar la formación de estos transcritos alternativos. La mutación del sitio aceptor con el fin de modificar la secuencia nucleotídica y conservar la fase de lectura y en consecuencia la secuencia de aminoácidos - mantiene el AA Gln, codificado por el codón CAG o CAA. La mutación se realizó en el nucleótido 612 (coordinado a partir de la primera base del codón de inicio ATG): -nt612G> A. Tras la mutagénesis dirigida, se pudo comprobar, mediante secuenciación, la mutación de un solo par de bases en el sitio aceptor. Por último, se pudo demostrar que la secuencia del gen CD20 mutado (CD20 mut) ya no generaba transcrito alternativo. Un análisis de citometría de flujo de la expresión de CD20 demuestra que la expresión se mantiene y que la proteína se expresa eficazmente en la membrana.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG (EFS)

25 <120> Proteína CD20 truncada, delta CD20

<130> EFS001-WO-1

<150> FR 08/06444

<151> 18-11-2008

30 <160> 17

<170> Patent In versión 3.5

35 <210> 1

<211> 393

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 1

```

atgacaacac ccagaaattc agtaaatggg actttcccgg cagagccaat gaaaggccct      60
attgctatgc aatctggtcc aaaaccactc ttcaggagga tgtcttcact ggaacttgta      120
atagctggca tcgttgagaa tgaatggaaa agaacgtgct ccagacccaa atctaacata      180
gttctcctgt cagcagaaga aaaaaaagaa cagactattg aaataaaaga agaagtggtt      240
gggctaactg aaacatcttc ccaaccaaag aatgaagaag acattgaaat tattccaatc      300
caagaagagg aagaagaaga aacagagacg aactttccag aacctcccca agatcaggaa      360
tcctcaccaa tagaaatga cagctctcct taa                                     393
    
```

45 <210> 2

<211> 130

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 2

ES 2 585 400 T3

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
 1 5 10 15
 Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
 20 25 30
 Arg Met Ser Ser Leu Glu Leu Val Ile Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu
 35 40 45
 Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser
 50 55 60
 Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile Glu Ile Lys Glu Glu Val Val
 65 70 75 80
 Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu
 85 90 95
 Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe
 100 105 110
 Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser
 115 120 125
 Ser Pro
 130

- <210> 3
- <211> 1915
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 3

ES 2 585 400 T3

agcgatttca tcttcaggcc tggactacac cactcacccct cccagtgtgc ttgagaaaca 60
 aactgcaccc actgaactcc gcagctagca tccaaatcag cccttgagat ttgaggcctt 120
 ggagactcag atcctgaaca agagagaaca aaatctctac tttgatggaa cttccattct 180
 gtggggaaga gactgacaat aagcaattaa ataaataaga actcagcagt aggccttgcc 240
 tcagatccaa ggtcactcgg aagaggccat gtctaccctc aatgacactc atggaggaaa 300
 tgctgagaga agcattcaga tgcattgacac aaggtaagac tgccaaaaat cttgttcttg 360
 ctctcctcat tttgttattt gttttatttt taggagtttt gagagcaaaa tgacaacacc 420
 cagaaattca gtaaattgga ctttcccggc agagccaatg aaaggcccta ttgctatgca 480
 atctggtcca aaaccactct tcaggaggat gtcttactg gtgggcccc a gcaaagctt 540
 cttcatgagg gaatctaaga ctttgggggc tgtccagatt atgaatgggc tcttccacat 600
 tgccctgggg ggtcttctga tgatcccagc agggatctat gcacccatct gtgtgactgt 660
 gtggtaccct ctctggggag gcattatgta tattatttcc ggatcactcc tggcagcaac 720
 ggagaaaaac tccaggaagt gtttgggtcaa aggaaaaatg ataatgaatt cattgagcct 780
 ctttgcctgc atttctggaa tgattcttct aatcatggac atacttaata ttaaaatttc 840
 ccatttttta aaaatggaga gtctgaattt tatttagagct cacacacat atattaacat 900
 atacaactgt gaaccagcta atccctctga gaaaaactcc ccatctacc aatactgta 960
 cagcatacaa tctctgttct tgggcatttt gtcagtgatg ctgatctttg ctttcttcca 1020
 ggaacttgta atagctggca tctgtgagaa tgaatggaaa agaactgtct ccagacccaa 1080
 atctaacata gttctcctgt cagcagaaga aaaaaagaa cagactattg aaataaaaga 1140
 agaagtgggt gggctaactg aaacatcttc ccaaccaaag aatgaagaag acattgaaat 1200
 tattccaatc caagaagagg aagaagaaga aacagagacg aactttccag aacctccca 1260
 agatcaggaa tcctcaccaa tagaaaatga cagctctcct taagtgattt cttctgtttt 1320
 ctgtttcctt ttttaacat tagtgttcat agcttccaag agacatgctg actttcattt 1380
 cttgaggtag tctgcacata cgcaccacat ctctatctgg cttttgcatg gagtgaccat 1440
 agctccttct ctcttacatt gaatgtagag aatgtagcca ttgtagcagc ttgtgtgtgc 1500
 acgcttcttc ttttgagcaa ctttcttaca ctgaagaaag gcagaatgag tgcttcagaa 1560
 tgtgatttcc tactaacctg ttccttggat aggcctttta gtatagtatt ttttttgtc 1620

 attttctcca tcaacaacca gggagactgc acctgatgga aaagatatat gactgcttca 1680
 tgacattcct aaactatctt tttttatct cacatctacg tttttggtgg agtccctttt 1740
 gcatcattgt ttaaggatg ataaaaaaaa ataacaacta gggacaatac agaaccatt 1800
 ccatttatct ttctacaggg ctgacattgt ggcacattct tagagttacc acaccccatg 1860
 agggaagctc taaatagcca acacccatct gttttttgta aaaacagcat agctt 1915

5 <210> 4
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 4

ES 2 585 400 T3

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
 1 5 10 15
 Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
 20 25 30
 Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
 35 40 45
 Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
 50 55 60
 Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
 65 70 75 80
 Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile
 85 90 95
 Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
 100 105 110
 Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
 115 120 125
 Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
 130 135 140
 His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
 145 150 155 160
 Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
 165 170 175
 Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
 180 185 190
 Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
 195 200 205

ES 2 585 400 T3

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
 210 215 220
 Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
 225 230 235 240
 Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
 245 250 255
 Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
 260 265 270
 Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
 275 280 285
 Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
 290 295

5 <210> 5
 <211> 893
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> gen mutado artificialmente, que codifica a CD20, que ya no contiene sitio aceptor para un corte y empalme alternativo

<400> 5

```

atgacaacac ccagaaattc agtaaatggg actttcccgg cagagccaat gaaaggccct      60
attgctatgc aatctggtcc aaaaccactc ttcaggagga tgtcttcaact ggtgggcccc      120
acgcaaagct tcttcatgag ggaatctaag actttggggg ctgtccagat tatgaatggg      180
ctttccaca ttgccctggg gggctctctg atgatcccag cagggatcta tgcacccatc      240
tgtgtgactg tgtggtaccc tctctgggga ggcattatgt atattatttc cggatcactc      300
ctggcagcaa cggagaaaaa ctccaggaag tgtttggtca aaggaaaaat gataatgaat      360
tcattgagcc tctttgctgc catttctgga atgattcttt caatcatgga catacttaat      420
attaaaattt cccatttttt aaaaatggag agtctgaatt ttattagagc tcacacacca      480
tatattaaca tatacaactg tgaaccagct aatcccctctg agaaaaactc cccatctacc      540
caatactggt acagcataca atctctgttc ttgggcattt tgtcagtgat gctgatcttt      600
gccttcttcc aagaacttgt aatagctggc atcgttgaga atgaatggaa aagaacgtgc      660
tccagaccca aatctaacat agttctcctg tcagcagaag aaaaaaaga acagactatt      720
gaaataaaag aagaagtggg tgggctaact gaaacatctt cccaaccaa gaatgaagaa      780
gacattgaaa ttatccaatc caagaagagg aagaagaaga aacagagacg aactttccag      840
aacctcccca agatcaggaa tcctcaccaa tagaaaatga cagctctcct taa              893
    
```

15 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 6

Leu Phe Arg Arg Met Ser Ser Leu Glu
1 5

5 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 7

Phe Arg Arg Met Ser Ser Leu Glu Leu
1 5

15 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido sintético

25 <400> 8

Arg Arg Met Ser Ser Leu Glu Leu Val
1 5

30 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 9

Arg Met Ser Ser Leu Glu Leu Val Ile
1 5

40 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 10

50 **Met Ser Ser Leu Glu Leu Val Ile Ala**
1 5

55 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 585 400 T3

<220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 11
 5
Ser Ser Leu Glu Leu Val Ile Ala Gly
1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 12
 15
Ser Leu Glu Leu Val Ile Ala Gly Ile
1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 13
 20
Leu Glu Leu Val Ile Ala Gly Ile Val
1 5

<210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido en sentido específico de deltaCD20
 <400> 14
 gatgtcttca ctggaact 18

<210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido específico de CD20 humano
 <400> 15
 ttaaggagac tgtcatttc t 21

<210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> oligonucleótido en sentido específico de las formas deltaCD20 y CD20 (n)

ES 2 585 400 T3

<400> 16
gagccaatga aaggccctat t 21

5 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido específico de delta CD20

<400> 17
agctattaca agttccagtg 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit de diagnóstico, caracterizado por que comprende al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia idéntica a la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 17.
2. El kit de diagnóstico según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende al menos un oligonucleótido con una secuencia idéntica a la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 17.
- 10 3. Utilización *in vitro* de un kit de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para la detección de una patología relacionada con una disfunción de uno o una pluralidad de linfocitos B.
- 15 4. La utilización *in vitro* de un kit de diagnóstico según la reivindicación 3, caracterizada por que la patología relacionada con una disfunción de uno o una pluralidad de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en hemopatías B, linfomas foliculares (LF), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA), linfoma de células de manto (LM), linfomas de células B, mieloma y enfermedad de Waldenström (EW).
- 20 5. Utilización *in vitro* de un kit de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para la evaluación de la eficacia de un tratamiento que comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20.
- 25 6. Utilización *in vitro* de un kit de diagnóstico según la reivindicación 5, caracterizada por que el anticuerpo anti-CD20 es Rituximab.
7. Utilización de un polipéptido que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que comprende 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: 13, para la preparación de un fármaco.
- 30 8. Utilización de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo que comprende 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: 13, para la preparación de un fármaco.
- 35 9. Utilización de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que comprende 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: 13, para la preparación de un fármaco.
- 40 10. La utilización según la reivindicación 7 u 8, caracterizada por que dicho polipéptido comprende al menos una secuencia, tal como SEQ ID NO: 9.
- 45 11. La utilización según la reivindicación 10, caracterizada por que dicho polipéptido consiste en un polipéptido que tiene una secuencia, tal como SEQ ID NO: 9.
12. Utilizaciones según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 para mejorar la eficacia de un tratamiento que comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20.
13. Utilización según la reivindicación 12, caracterizada por que el anticuerpo anti-CD20 es Rituximab.
- 50 14. Un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que comprende 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: 13.
15. Una secuencia de ácido nucleico que codifica CD20, caracterizada por que comprende una secuencia, tal como SEQ ID NO: 5.
- 55 16. La secuencia según la reivindicación 15, caracterizada por que consiste en una secuencia, tal como SEQ ID NO: 5.
- 60 17. Un vector recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16 bajo el control de uno o una pluralidad de elementos necesarios para su expresión en una célula huésped.
18. El vector recombinante según la reivindicación 17, caracterizado por que se selecciona del grupo que comprende los plásmidos y los vectores virales.
- 65 19. El vector recombinante según la reivindicación 18, caracterizado por que es un vector viral seleccionado del grupo que comprende vectores de adenovirus, vectores de retrovirus, vectores de poxvirus, vectores que proceden del virus del herpes, vectores que proceden de virus adenoasociados y vectores que proceden de alfavirus.

20. El vector recombinante según la reivindicación 18, caracterizado por que se asocia con uno o una pluralidad de compuestos que facilitan su introducción en una célula huésped.
- 5 21. El vector recombinante según la reivindicación 20, caracterizado por que el compuesto que facilita su introducción en una célula huésped se selecciona del grupo que comprende lípidos catiónicos, sales de calcio, polímeros catiónicos y polipéptidos.
- 10 22. El vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, caracterizado por que el elemento necesario para su expresión en una célula huésped se selecciona del grupo que comprende intrones, sitios de poliadenilación y promotores.
23. Utilización de una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16 o un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22 para la preparación de un fármaco.
- 15 24. Utilizaciones según la reivindicación 23 para mejorar la eficacia de un tratamiento que comprende la utilización de un anticuerpo anti-CD20.
25. Utilización según la reivindicación 24, caracterizada por que el anticuerpo anti-CD20 es Rituximab.