

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 730**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 5/078** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2012 PCT/EP2012/054805**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012 WO12123590**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2012 E 12712611 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2686417**

54 Título: **Preparados celulares agotados en lo que respecta a TCRalfa/beta**

30 Prioridad:

**17.03.2011 DE 102011001380**  
**07.06.2011 EP 11168949**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.11.2016**

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)**  
**Friedrich-Ebert-Strasse 68**  
**51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**HANDGRETINGER, RUPERT y**  
**HUPPERT, VOLKER**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 588 730 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

Preparados celulares agotados en lo que respecta a TCRalfa/beta

- 5 El presente invento se refiere a unos preparados celulares agotados en lo que respecta a TCRalfa/beta, que tienen unas células positivas para TCR gamma/delta, así como a su producción.

## Introducción

10 En Europa se llevan a cabo anualmente más de 31.000 trasplantes de células madre, de los cuales aproximadamente 13.000 son alógenos y 18.000 autólogos (Baldomero H, Gratwohl M, Gratwohl A, Tichelli A, Niederwieser D, Madrigal A, Frauendorfer K. The EBMT activity survey 2009: trends over the past five years. [Examen de la actividad de EBMT 2009: tendencias a lo largo de los pasados cinco años.] Bone Marrow Transplant. [Trasplante de médula ósea.] 28 de febrero de 2011). Esto está adquiriendo cada vez más  
15 importancia en el tratamiento de enfermedades hematológicas, oncológicas, inmunológicas y genéticas (Zintl y colaboradores, Correction of fatal genetic diseases using bone marrow transplantation. [Corrección de enfermedades genéticas fatales usando un trasplante de médula ósea.] Kinderarztl Prax. 1991 Ene-Feb; 59(1-2):6-9; Zintl, Bone marrow transplantation in childhood. [Trasplante de médula ósea en la niñez.] Kinderarztl Prax. 1988 Jun; 56(6):259-64; Down JD, Mauch PM. The effect of combining cyclophosphamide with total-body irradiation on donor bone marrow engraftment. [El efecto de combinar ciclofosfamida con una irradiación total del cuerpo sobre un crecimiento del injerto de médula ósea de un donante.] Transplantation. 1991 Jun; 51(6):1309-11) y constituye para muchas de estas enfermedades la única posibilidad de curación a largo plazo (Eyrich y colaboradores, A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. [Una comparación prospectiva de la reconstitución inmunitaria en receptores pediátricos de células madre de sangre periférica CD34+ seleccionados positivamente procedentes de donantes no emparentados frente a receptores de médula ósea no manipulada procedente de donantes emparentados.] Bone Marrow Transplant. 2003 Ago; 32(4):379-90).

30 Las complicaciones principales del trasplante de células madre resultan sobre todo a partir de la reacción del injerto frente al receptor (Graft-versus-host-disease, GvHD ó GvHR = enfermedad de un injerto frente a un anfitrión), de un injerto defectuoso de las células madre trasplantadas, de la toxicidad del acondicionamiento y de las infecciones, sometidas a terapia debido a una reconstitución inmunológica retardada o incompleta.

35 Con un régimen de acondicionamiento reducido, en el caso de un trasplante alógeno se pudo disminuir la incidencia de la mortalidad asociada con la terapia. Junto a la reducción de unos potenciales efectos secundarios para el receptor que están asociados con una quimioterapia, mediante una reducida supresión de inmunidad posterior al trasplante se favorece tendencialmente el efecto inmunológico del trasplante contra el tejido maligno. Este efecto del injerto contra el tumor es mediado en particular por células T y NK del donante. A pesar del  
40 acondicionamiento reducido, no aumenta la progresión del tumor (Valcárcel y colaboradores, Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies. [Régimen de acondicionamiento convencional frente al de intensidad reducida para el trasplante alógeno de células madre con malignidades hematológicas.] Eur J Haematol. 2005 Feb;74(2):144-51; Strahm y colaboradores. Reduced intensity conditioning in unrelated donor transplantation for refractory cytopenia in childhood. [Acondicionamiento de intensidad reducida en un trasplante de un donante no emparentado para citopenia refractaria en la niñez.] Bone Marrow Transplant. 2007 Ago; 40(4): 329-33). Con el fin de evitar una mortalidad aumentada, por lo tanto, después de un trasplante alógeno es necesario restablecer otra vez el sistema inmunitario tan rápidamente como sea posible con el fin de hacer posible un control del tumor y de las infecciones. Esto se ha de equilibrar con la aparición de una GvHD, que, en el caso de una retirada temprana de la supresión de inmunidad, se favorece la utilización de demasiadas células T alorreactivas o en el caso de una diferencia antigénica demasiado grande, y se generan mortalidad y morbilidad.

## 1) TCD pasiva (enriquecimiento en lo que respecta a CD34)

55 Hasta ahora, las pacientes y los pacientes, que requerían un trasplante de células madre, se trataban con un preparado celular a base de células positivas para CD34 (células madre) como una conveniente terapia comparativa. De esta manera se agotan las células T, que desempeñan un cometido decisivo en el caso de la GvHD, no obstante, con las células T, pero también con las células NK se pierden unos factores indispensables (poblaciones de células efectoras), que desempeñan un cierto cometido en la curación.

60 Por el concepto de "reacción de un injerto frente a un anfitrión" (GvHR; acrónimo del inglés Graft-versus-Host-Reaction; enfermedad de un injerto frente a un anfitrión, en inglés: Graft-versus-Host-Disease (GvHD)) se entiende una reacción inmunológica, que puede aparecer después de un trasplante alógeno de médula ósea o de células madre (Jacobsohn DA, Vogelsang GB: Acute graft versus host disease. Orphanet J Rare Dis. 2007 Sep 4; 2:35).

En el caso de la GvHR reaccionan contra el organismo receptor sobre todo los linfocitos T contenidos en injerto] de un donante. Por consiguiente, ellas, vista desde un punto de vista inmunológico, es una reacción de los linfocitos del donante a los antígenos ajenos del paciente.

- 5 Se establece diferencia entre una GvHD (aGvHD) aguda y una GvHD crónica (cGvHD), pudiendo resultar la forma crónica 100 días después del trasplante a partir de la GvHD aguda o como una GvHD *de novo*.

De acuerdo con el esquema de Seattle, la forma aguda y la forma crónica se subdividen en grados. En la piel, el intestino y el hígado, la GvHD se manifiesta a través de exantemas y ampollas sobre la superficie del cuerpo, diarreas, oclusión intestinal (íleo) y un nivel aumentado de la bilirrubina. Para la aGvHD, a partir de la suma de los lugares de manifestación y de la gravedad de la manifestación resulta una subdivisión desde el grado 0 hasta el grado IV. Con el fin de evitar una aGvHD se pueden disponer unas medidas profilácticas. [Entre éstas se cuentan la administración de agentes supresores de inmunidad tales como metotrexato (MTX), ciclosporina A (CsA), corticosteroides o la combinación de estos medicamentos. (Martino R, Romero P y colaboradores: "Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation. [Comparación de los clásicos criterios de Glucksberg y del Índice de Severidad para graduar una enfermedad del injerto frente al anfitrión aguda a continuación de un trasplante de células madre hermanas idénticas en lo que respecta al HLA], International Bone Marrow Transplant Registry." Bone Marrow Transplant 1999; 24(3): Páginas 283-287 y Wikipedia, Graft-versus-Host-Reaktion).

El riesgo de desarrollar una GvHD depende estrechamente de la compatibilidad, que es determinada por el antígeno leucocitario humano (HLA). Existe un riesgo especialmente alto de padecer una aGvHD en el caso de una donación ajena no emparentada y de una donación incompatible con un HLA. En el caso de un trasplante alógeno de donantes hermanados idénticos en lo que respecta al HLA, sin embargo, a pesar de una prevención óptima, aproximadamente un 35-60 % de los pacientes desarrolla una GvHD aguda con un grado de pronunciamiento desde ligero hasta mediano, a pesar de la administración de unos medicamentos supresores de inmunidad; aproximadamente un 10 % de ellos padece una GvHD difícil de controlar (Kanda Y, Chiba S: "Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000) [Trasplante alogeneico de células madre hematopoyéticas a partir de miembros de una familia distintos de hermanos idénticos en lo que respecta al HLA" Blood 2003; 102(4): Páginas 1541-1547).

Una considerable proporción (aproximadamente 30 - 65 %) de los pacientes desarrolla una GvHD crónica, que a largo plazo constituye uno de los efectos secundarios y las causas mortales más frecuentes después de un trasplante de células madre (Ringden y colaboradores, The graft-versus-leukemia effect using matched unrelated donors is not superior to HLA-identical siblings for hematopoietic stem cell transplantation. [El efecto de injerto frente a leucemia usando donantes no emparentados coincidentes no es superior al de hermanos idénticos en lo que respecta al HLA para un trasplante de células madre hematopoyéticas] Blood. 2009 Mar 26; 113(13): 3110-8; Ratanatharathorn y colaboradores, Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation . [Estudio de la fase III que compara metotrexato y tacrolimus (prograf, FK506) con metotrexato y ciclosporina para la profilaxia de la enfermedad de un injerto frente a un anfitrión después de un trasplante de células madre hermanas idénticas en lo que respecta al HLA] Blood. 1998 Oct 1;9 2(7): 2303-14.) perjudica persistentemente a la calidad de vida, así como retrasa la vuelta al puesto de trabajo (Wong y colaboradores, Long-term recovery after hematopoietic cell transplantation: predictors of quality-of-life concerns. [Recuperación a largo plazo después de un trasplante de células madre hematopoyéticas: predictores de preocupaciones sobre la calidad de vida] Blood. 2010 Mar 25;115(12):2508-19.; Sutherland y colaboradores, Quality of life following bone marrow transplantation: a comparison of patient reports with population norms. [Calidad de vida después de un trasplante de médula ósea: una comparación de informes de los pacientes con normas de población] Bone Marrow Transplant. 1997 Jun;19(11):1129-36).

Adicionalmente, no sólo la profilaxia, sino también el tratamiento de la GvHD requiere la administración de supresores de inmunidad, que pueden causar unos considerables efectos secundarios, p.ej. ciertos efectos secundarios de corticosteroides tales como la diabetes, la necrosis avascular, el síndrome de Cushing o unos efectos secundarios de CSA/tacrolimus tales como daños en los riñones, alta presión sanguínea, parestesias y en general infecciones de cualquier tipo (Wong y colaboradores, Long-term recovery after hematopoietic cell transplantation: predictors of quality-of-life concerns. [Recuperación a largo plazo después de un trasplante de células madre hematopoyéticas: predictores de preocupaciones sobre la calidad de vida] Blood. 2010 Mar 25; 115(12):2508-19; Sutherland y colaboradores, Quality of life following bone marrow transplantation: a comparison of patient reports with population norms. [Calidad de vida después de un trasplante de médula ósea: una comparación de informes de los pacientes con normas de población] Bone Marrow Transplant. 1997 Jun; 19(11): 1129-36; Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. [Enfermedad de un injerto frente a un anfitrión] Lancet. 2009 May 2;373(9674):1550-61).

**Reconstitución de la inmunidad**

Otra desventaja del método de tratamiento actual es la reconstitución de la inmunidad retardada, es decir la reconstitución retardada de un sistema inmunitario que funciona o respectivamente un sistema hematopoyético en pacientes trasplantados. El sistema inmunitario requiere para la reconstitución aproximadamente 1 hasta 2 años.

5 En este período de tiempo existe un riesgo fuertemente aumentado de enfermarse o respectivamente de morir por unas infecciones que ponen en peligro la vida, sobre todo unas infecciones víricas, bacterianas o fúngicas (Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P y colaboradores Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. [Trasplante de megadosis de células progenitoras CD34(+) de sangre periférica purificada a partir de donantes parentales no coincidentes en HLA en niños] Bone Marrow Transplant 2001;27:777-83 und Platzbecker U, Ehninger G, Bornhauser M. Allogeneic transplantation of CD34+ selected hematopoietic cells: clinical problems and current challenges. [Trasplante alogeneico de células hematopoyéticas seleccionadas por CD34+: problemas clínicos y desafíos actuales] Leuk Lymphoma 2004;45:447-53).

15 La causa de esto reside en el hecho de que con el enriquecimiento de unas células madre positivas para CD34, se pierden todas las células T, las células NK y otras poblaciones celulares acesorias, que podrían ayudar en el caso de la reconstitución de la inmunidad o respectivamente de la reconstitución del sistema hematopoyético.

20 La regeneración de las células T después de un trasplante y, por consiguiente, después la reconstitución de la inmunidad, transcurre en dos rutas. La denominada ruta central es dependiente del timo y presupone un timo intacto. Las células T, que han abandonado el timo tan sólo hace poco tiempo, apuntan a una recuperación del sistema inmunitario. Las determinaciones del ciclo de excisión del receptor de células T (TREC) y de células T no maduras con el antígeno superficial CD45RA se adecuan para la preparación. La ruta periférica de la reconstitución de las células T es dependiente del timo y muy importante, puesto que muchos regímenes de acondicionamiento dañan al timo. La expansión de los linfocitos T maduros, que son transferidos con el trasplante, garantiza la reconstitución del sistema inmunitario.

30 Unos trasplantes seleccionados por CD34+, en los cuales las células T no son transferidas a los pacientes, tienen por consiguiente un comienzo retardado de la reconstitución del sistema inmunitario (Sutherland y colaboradores, Reconstitution of naive T cells and type 1 function after autologous peripheral stem cell transplantation: impact on the relapse of original cancer. [Reconstitución de células T ingenuas y función del tipo 1 después de un trasplante autólogo de células madre periféricas: impacto sobre la recaída de un cáncer original] Transplantation. 2002; 73: 1336-9; Rutella y colaboradores, Immune reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of interleukin-15 on T-cell survival and effector functions. [Reconstitución inmunitaria después de un trasplante autólogo de células progenitoras de sangre periférica: efecto de la interleucina-15 sobre la supervivencia de células T y funciones efectoras] Exp Hematol. 2001; 29:1503-16; Heining y colaboradores, Lymphocyte reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study including 148 patients. [Reconstitución de linfocitos después de un trasplante alogeneico de células madre hematopoyéticas, un estudio retrospectivo que incluye a 148 pacientes.] Bone Marrow Transplant. 2007; 39: 613-22). La baja tasa de GvHD en el caso de estos trasplantes se establece con una reconstitución de la inmunidad fuertemente retardada. A partir de esto resulta como el punto débil actual la reconstitución de la inmunidad retardada, es decir el restablecimiento retardado de un sistema inmunitario que está funcionando, que está asociada con un riesgo aumentado de infecciones letales potenciales.

45 Recaída

Otra desventaja del agotamiento de células T es el riesgo aumentado, de que la enfermedad que constituye la causa del trasplante de células madre (en la mayoría de los casos una leucemia), después de unos trasplantes de células madre CD34 se presente otra vez más frecuentemente (Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM y colaboradores, Graft-versus leukemia reactions after bone marrow transplantation. [Reacciones de injerto frente a leucemia después de un trasplante de médula ósea] Blood 1990;75:555-62), también por la eliminación de las células NK (en inglés "natural killer cells", células asesinas naturales), que tienen un efecto anti-leucémico (Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M y colaboradores Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer [Explotación de células NK alorreactivas en una inmunoterapia adoptiva de un cáncer], Curr Opin Immunol 2005;17:211-7).

**2) TCD activa (agotamiento en lo que respecta a CD3)**

Hace poco se utilizaron unos preparados celulares CD3 agotados, en los cuales se había agotado las células T; en los que, no obstante, todavía están contenidas/os en el injerto las células NK, los monocitos, los granulocitos y las precursoras de células madre negativas para CD34. Ciertamente el riesgo de una GvHD y de una muerte temprana asociada con la terapia (en inglés "early treatment related mortality", TRM) había disminuido un poco, no obstante también estos preparados celulares condujeron a un aumento medible de la tasa de supervivencia (Lee CK, DeMagalhaes-Silverman M y colaboradores: "Donor T-lymphocyte infusion for unrelated allogeneic bone marrow transplantation with CD3+ T-cell-depleted graft. [Una infusión de linfocitos T de un donante para un trasplante alogeneico de médula ósea emparentado con un injerto agotado en lo que respecta a células T CD3+] "

Bone Marrow Transplant 2003; 31(2): Páginas 121-128 y Wikipedia, Graft-versus-Host-Reaktion) o a una reconstitución mejorada de la inmunidad.

5 Bethge y colaboradores (Haploidentical allovenic hematopoietic cell transplantation trasplante alogeneico in adults using CD3/CD 19 depletion and reduced intensity conditioning: An update, [Trasplante alogeneico de células hematopoyéticas haploidénticas en adultos usando el agotamiento de CD3/CD 19 y el acondicionamiento con intensidad reducida: Una puesta al día], Blood Cells, Molecules and Diseases [Células sanguíneas, moléculas y enfermedades] 490, 1, 13-19) describen el agotamiento de unas células positivas para CD3/CD19.

## 10 Resumen del invento

En un primer aspecto, el invento se refiere a una composición, en particular a una composición farmacéutica, que tiene una población de células obtenible a partir de médula ósea o de sangre. Conforme al invento, la población de células se agota de células positivas para TCR alfa/beta (TCR = un receptor de células T). Por consiguiente, en la composición (farmacéutica) se encuentran unas células T, que son positivas para el TCR gamma/delta, pero que contienen sólo pocas o casi ninguna célula(s), en el mejor de los casos, ninguna célula, positiva para TCR alfa/beta.

20 Por el concepto de agotamiento se entiende en el presente contexto un empobrecimiento significativo de células procedentes de una población de células. Así, un agotamiento puede ser definido como un empobrecimiento de un tipo de células (que puede ser definido por la presencia de p.ej. un marcador de la superficie celular, tal como TCRalfa/beta o CD19) en por lo menos 2 escalones logarítmicos preferentemente por lo menos 3 escalones logarítmicos, especialmente se prefiere en por lo menos 4 escalones logarítmicos (p.ej. 4,6 escalones logarítmicos), de la manera más preferida en por lo menos 4 hasta 5 escalones logarítmicos.

25 La eliminación según escalones logarítmicos es como sigue: 1 log = 90 % de eliminación de las células perturbadoras, 2 log = 99 %, 3 log = 99,9 % y 4 log = 99,99 %. Los modos para el cálculo de la potencia de separación son conocidos por un experto en la especialidad y se han descrito p.ej. en la obra de Bosio y colaboradores, Isolation and Enrichment of Stem Cells, Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology [Aislamiento y enriquecimiento de células madre, avances en ingeniería bioquímica y biotecnología], Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

30 Un tal agotamiento se efectúa a través del marcador superficial de TCR alfa/beta y opcionalmente a través de CD19. El agotamiento se puede efectuar con cualquier método conocido en el estado de la técnica, p.ej. un rebozamiento (en inglés "panning") una elutriación o una separación magnética de células. Se prefiere un agotamiento mediante una separación celular magnética (p.ej. CliniMACS, Miltenyi Biotec GmbH) debido a la alta eficiencia de agotamiento.

40 La población de células obtenible a partir de sangre es en particular un preparado celular, que se obtiene mediante una aféresis de leucocitos o una punción de médula ósea. De manera preferida, el preparado celular se obtiene de un donante sano, que previamente había sido tratado con medicamentos movilizadores de células madre.

45 De manera preferida, la población de células de esta composición (farmacéutica) también se ha agotado en lo referente a células positivas para CD19. Esto da lugar a que la población de células no contenga ninguna célula B. De este modo se suprime una posible transferencia del virus de Epstein Barr (EBV) a los pacientes que reciben la composición farmacéutica y se tiene que administrar menos cantidad de o ningún supresor(es) de inmunidad).

50 En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica, la composición tiene además por lo menos un vehículo o un material aditivo farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos o materiales aditivos son conocidos por un experto en la especialidad.

55 La composición farmacéutica se puede administrar contra enfermedades cancerosas, tales como, por ejemplo, leucemias y otras enfermedades, p.ej. leucemias mieloides agudas, leucemias linfáticas agudas, agranulocitosis, B-talasemia, el error congénito (HHS) así como también contra tumores sólidos (p.ej. un neuroblastoma, sarcomas, etc.), en cuyo caso está indicado un trasplante alógeno, o se ha de esperar un efecto terapéutico de preparados celulares agotados en lo que respecta al TCR alfa/beta.

60 Además, en el caso de un trasplante alógeno se tienen que transferir suficientes células CD34+ (desde por lo menos 2 hasta 4 millones por kg de peso corporal del receptor), con el fin de conseguir una buena reconstitución de la formación de sangre, y se deberían de administrar menos que 25.000 células T positivas para TCR alfa/beta por kg de peso corporal del receptor, cuando se tenga que prescindir de una supresión de inmunidad. Las células B, que son eliminadas mediante un agotamiento en lo que respecta a CD19 a partir del injerto, deberían de estar contenidas en la menor cantidad posible, o deberían ser eliminadas in vivo posteriormente en el receptor mediante p.ej. la administración in vivo de un anticuerpo anti-CD19, cuando se deba de reducir el riesgo de una infección causada por EBV y de las complicaciones que aparecen con ella.

La cantidad de la población agotada de células, que se ha de administrar a un paciente humano, se sitúa típicamente en  $2 \times 10^{10}$  hasta  $1 \times 10^{11}$  linfocitos.

5 En otro aspecto, el invento se refiere a una utilización de una población de células obtenible a partir de médula ósea o de sangre para la producción de una composición farmacéutica, estando la población de células agotada en lo que respecta a células positivas para TCR alfa/beta y teniendo células positivas para TCR gamma/delta.

10 En otro aspecto, la descripción se refiere a una utilización de la composición farmacéutica para la reconstitución del sistema hematopoyético de un ser humano después de un trasplante de células madre y/o de médula ósea. Esta reconstitución es manifiestamente más rápida en comparación con la reconstitución conocida hasta ahora (p.ej. con una médula ósea inalterada o con células madre positivas para CD34, procedentes de médula ósea o de sangre o respectivamente de sangre movilizada, procesada, después de una leucoaféresis) y conduce por consiguiente a un consumo más pequeño de transfusiones de componentes de la sangre, a la posibilidad de una renuncia completa, o a una reducción de medicamentos supresores de inmunidad, y conduce por consiguiente a unos efectos secundarios más pequeños, a menos infecciones, y a una mortalidad disminuida del receptor del trasplante.

20 En otro aspecto, el invento se refiere a un procedimiento, en particular a un procedimiento in vitro, para la producción de una población de células. El procedimiento tiene las siguientes etapas:

- Puesta a disposición de médula ósea o de sangre de un donante (por lo tanto una población, que tiene, entre otras, unas células positivas para TCR alfa/beta y unas células positivas para TCR gamma/delta) y
- agotamiento de células positivas para TCR alfa/beta a partir de la población de células.

25 De manera preferida, en el procedimiento se efectúa el agotamiento de células positivas para TCR alfa/beta mediante un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos, dirigido contra el TCR alfa/beta. Con ayuda de una de las secuencias de proteínas o de nucleótidos de acuerdo con las SEQ ID Nos 4 hasta 14 del receptor TCR alfa/beta (véanse la Tabla 1 y el protocolo de secuencias) se puede producir un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos, o un derivado o un conjugado de éstos, dirigido contra el TCR alfa/beta, y se puede utilizar éste para el agotamiento de células positivas para TCR alfa/beta.

30 En una forma de realización preferida, el procedimiento tiene adicionalmente la siguiente etapa:

- Agotamiento de células positivas para CD19 a partir de la población de células. Esta etapa se puede llevar a cabo cronológicamente antes de, después de o simultáneamente con el agotamiento de células positivas para TCR alfa/beta a partir de la población de células.

35 En el procedimiento, el agotamiento de las células positivas para CD19 se puede efectuar mediante un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos, dirigido contra CD19. Con ayuda de una de las secuencias de proteínas o nucleótidos (las SEQ ID NOs 1 hasta 3) del marcador superficial CD19 (véanse la Tabla 1 y el protocolo de secuencias) se puede producir un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos, o un derivado o un conjugado de éstos, dirigido contra CD19, y se puede utilizar éste para el agotamiento de células positivas para CD19.

40 El estado de la técnica permite a un experto en la especialidad, conociendo las secuencias de proteínas o de nucleótidos para TCR alfa/beta y CD19 (conocidas en el estado de la técnica), producir un anticuerpo, un fragmento que fija antígenos, o unos derivados o conjugados de éstos, con los métodos conocidos (véase p.ej. Köhler, G. & Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. [Cultivos continuos de células fusionadas que segregan un anticuerpo con especificidad previamente definida] En: Nature, 256, 495-497; Shirahata S, Katakura Y, Teruya K. (1998): Cell hybridization, hybridomas, and human hybridomas. [Hibridación de células, hibridomas, e hibridomas] En: Methods in cell biology [Métodos en biología celular], 57, Páginas 111-145; Cole SP, Campling BG, Atlaw T, Kozbor D, Roder JC. (1984): Human monoclonal antibodies. [Anticuerpos monoclonales humanos] En: Molecular and cellular biochemistry [Bioquímica molecular y celular], 62, Páginas. 109-120).

45 Tabla 1: Denominaciones y SEQ ID NOs de las secuencias humanas de proteínas o respectivamente nucleótidos del marcador superficial CD19 y de las subunidades del receptor TCR alfa/beta (TCRA/TRBC). Para la subunidad del receptor TCR beta (TRBC) se indican en cada caso dos secuencias de proteínas y de ADNc. El primer aminoácido en la SEQ ID NO 11 -E" (corresponde a "GAG" en la SEQ ID NO 13) se sitúa en un sitio de empalme y por lo tanto posiblemente es variable. En la secuencia proteínica SEQ ID NO 10 y en la correspondiente secuencia de nucleótidos, no se indican por lo tanto el aminoácido o respectivamente los nucleótidos.

60

SEQ ID NO.	Denominación	Tipo de la secuencia
1	CD19_Humano	secuencia proteínica
2	ADNc de CD19_Humano	secuencia de nucleótidos
3	Secuencia genómica de CD19_Humano	secuencia de nucleótidos
4	TCRA_Humano	secuencia proteínica
5	TCRA_Humano_CDS	secuencia de nucleótidos
6	Secuencia genómica de TCRA_Humano	secuencia de nucleótidos
7	TRBC1_Humano	secuencia proteínica
8	TRBC1_Humano_CDS	secuencia de nucleótidos
9	Secuencia genómica de TRBC1_Humano	secuencia de nucleótidos
10	TRBC2_Humano)	secuencia proteínica
11	TRBC2_Humano_2	secuencia proteínica
12	TRBC2_Humano_CDS	secuencia de nucleótidos
13	TRBC2_Humano_CDS_2	secuencia de nucleótidos
14	Secuencia genómica de TRBC2_Humano	secuencia de nucleótidos

5 En otro aspecto, la descripción se refiere a una utilización de un procedimiento descrito para la reconstitución de la defensa inmunitaria o respectivamente del sistema hematopoyético de un ser humano dentro del marco de un trasplante de células madre o de médula ósea.

10 La descripción se refiere además a la utilización de una población de células obtenida a partir de médula ósea o la sangre, estando agotada la población de células en lo que respecta a las células que expresan TCR alfa/beta, a saber para la reconstitución de la defensa inmunitaria de un ser humano en el marco de un trasplante de médula ósea. Tal como se ha descrito más arriba, en el caso de esta utilización también se han agotado las células positivas para CD19.

15 En otro aspecto, el invento se refiere a una utilización de un anticuerpo o de un fragmento que fija antígenos, dirigido contra TCR alfa/beta y/o TCR alfa/beta, y de un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos, dirigido contra CD19 para la producción in vitro de una población de células, que está agotada en lo que respecta al TCR alfa/beta y/o a CD19, y que tiene células positivas para TCR gamma/delta.

20 En otro aspecto, la descripción se refiere a un estuche para la producción de una población de células, que están agotadas en lo que respecta a TCR alfa/beta y/o CD19, y que tienen células positivas para TCR gamma/delta. Un tal estuche tiene un anticuerpo o un fragmento de éste, que fija antígenos, dirigido contra TCR alfa/beta y/o un anticuerpo dirigido contra CD19 o un fragmento de éste que fija antígenos.

25 En otro aspecto, el invento se refiere asimismo a una utilización del estuche descrito para la producción de una población de células, que es negativa para TCR alfa/beta y CD19 y que tiene células positivas para TCR gamma/delta. La población de células puede tanto presentarse in vitro y estar destinada a finalidades científicas, o puede presentarse como una composición farmacéutica, eventualmente con un soporte farmacéuticamente aceptable y/o un aditivo.

30 **Descripción detallada del invento**

**Ventajas del invento**

35 A pesar de los mejoramientos conseguidos en los últimos años, el trasplante de células madre sigue estando vinculado con una morbilidad agudamente aumentada y con una mortalidad inicial condicionada por el trasplante. Los complicaciones principales del trasplante de células madre resultan sobre todo a partir de las reacciones de rechazo (enfermedad de un injerto frente a un anfitrión) y su terapia, de la lenta reconstitución de la inmunidad o respectivamente de la reconstitución del sistema hematopoyético y de las infecciones resultantes a partir de esto después de un trasplante así como de la toxicidad del acondicionamiento.

40 Mediante la utilización de unas células agotadas en lo que respecta al TCR alfa/beta o de unas células agotadas en lo que respecta al TCR alfa/beta y al CD19 (población celular agotada) es posible manipular el injerto hematológico de células madre de tal manera que las complicaciones principales después de un trasplante de células madre, es decir la enfermedad de un injerto frente a un anfitrión, así como la lenta reconstitución de la inmunidad después de un trasplante de células madre, y reducir considerablemente la predisposición a contraer infecciones que persiste durante largo tiempo, que está vinculada con aquélla, frente a infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, con un desenlace potencialmente letal.

45 Al mismo tiempo, permanece conservada la reactividad del injerto frente al tumor de la mezcla de células, es decir que no se debe de esperar ningún riesgo aumentado de una recaída para el paciente. Otra ventaja es un crecimiento estable del injerto, (el denominado en inglés "engraftment").

50

Mediante la considerable reducción de las mencionadas complicaciones principales es posible reducir fuertemente o prescindir casi completamente de los medicamentos, que se emplean usualmente para el tratamiento de estas complicaciones, y que provocan en parte unos considerables efectos secundarios (y causan unos altos costes). Mediante la renuncia de los agentes supresores de inmunidad medicamentosos para la profilaxia de una GvHD se pueden evitar efectos secundarios tales como p.ej. infecciones (sepsis, candidosis, Herpes simplex, etc.), que resultan de la represión medicamentosa del sistema inmunitario.

Como consecuencia de ello, por un lado se puede mejorar considerablemente la calidad de vida del paciente, así como el éxito de la terapia, y simultáneamente se pueden reducir los costos para el tratamiento. A los medicamentos más arriba mencionados pertenecen unos medicamentos para la profilaxia de una GvHD tales como p.ej. el micofenolato mofetilo, que se emplea como profilaxia de una GvHD.

Junto a la reducción de infecciones y de la GvHD, la población agotada de células hace posible la utilización de un regimen de acondicionamiento reducido (RIC). En el caso de un trasplante alógeno, los regímenes de acondicionamiento reducidos pueden disminuir la incidencia de una mortalidad asociada a la terapia y se pueden emplear cuando pueda ser aprovechado el efecto inmunológico del injerto contra el tejido maligno. Este efecto del injerto contra un tumor es mediado en particular por células T y NK del donante, y por ello no es empleable en el caso de unos preparados de células madre que están enriquecidos en lo que respecta a CD34.

En este sentido se presenta una considerable utilidad adicional en comparación con la(s) terapia(s) comparativa(s) conveniente(s), puesto que se alcanza un gran mejoramiento, persistente y no alcanzado hasta ahora en lo que respecta a la terapia comparativa conveniente, de la utilidad relevante para la terapia, en particular una curación de la enfermedad, una considerable prolongación del tiempo de supervivencia, una ausencia a largo plazo de síntomas graves y la amplia evitación de efectos secundarios graves.

El aprovechamiento de la estrategia de agotamiento en lo que respecta al TCR alfa/beta da como resultado una más temprana reconstitución de la inmunidad, con unos valores de más que 100 células CD4 / $\mu$ l en el transcurso de 6 semanas después del trasplante, en comparación con 10 meses, tal como se ha informado por Aversa y colaboradores (Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. [Tratamiento de una leucemia aguda de alto riesgo con células madre agotadas en lo que respecta a células T procedentes de donantes emparentados con un haplotipo HLA plenamente no coincidente] N Engl J Med. 1998 Oct 22;339(17):1186-93.)

### Resultados técnicos

Los cursos de empobrecimiento llevados a cabo (Depletion runs o respectivamente depletion) con CliniMACS TCR $\alpha\beta$ -Biotin (de Miltenyi Biotec GmbH) confirman que es muy robusta la eficiencia del empobrecimiento con un empobrecimiento logarítmico promedio de 4,6 (Figura 1).

La CD19 es una molécula superficial sobre células T. El concepto de células positivas para CD19 significa, que una molécula que fija al CD19, p.ej. un anticuerpo, al que la molécula de CD19 se puede fijar específicamente sobre la superficie de las células T.

El TCR alfa/beta es una molécula superficial sobre células T. El concepto de "células positivas para TCR alfa/beta" significa que una molécula que fija al TCR alfa/beta, p.ej. un anticuerpo, al que la molécula de TCR alfa/beta se puede fijar específicamente sobre la superficie de las células T.

"Anticuerpo" significa un anticuerpo monoclonal, policlonal (Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" [Anticuerpos, un manual de laboratorio], CSH Press, Cold Spring Harbor, USA) que se fija a una molécula, o un derivado de este anticuerpo, que conserva la capacidad de fijación o que la conserva en lo esencial. Unos derivados preferidos de este anticuerpo son unos anticuerpos quiméricos que comprenden, por ejemplo, unos anticuerpos quiméricos en una región variable del ratón o de la rata y una región constante humana. El concepto de "anticuerpo" comprende asimismo un anticuerpo bifuncional o biespecífico y unas construcciones artificiales de anticuerpos tales como Fvs (scFv) procedentes de cadenas individuales o de proteínas de fusión con anticuerpos. El concepto "scFv" (acrónimo del inglés single chain Fv Fragment = fragmento Fv de cadena individual) es conocido por un experto en la especialidad y preferido puesto que el fragmento puede ser producido recombinantemente.

El anticuerpo puede ser humano o humanizado. El concepto de "anticuerpo humanizado" significa que por lo menos un sitio de fijación al anticuerpo (complementary determining region (CDR), región determinante de complementariedad) tal como p.ej. la CDR3 y de manera preferida todas los 6 CDRs fueron intercambiadas por unas CDRs de un anticuerpo humano con la especificidad deseada. Opcionalmente, la(s) región/regiones no humana(s) constante(s) del anticuerpo se reemplazaron por a) una(s) región/regiones constante(s) de un anticuerpo humano. Unos métodos para la producción de anticuerpos humanizados se han descrito p.ej. en el documento de solicitud de patente europea EP 0239400 A1 y en el documento de solicitud de patente internacional WO 90/07861 A1.

El concepto de "fragmento que fija antígenos" designa a un fragmento del concepto "anticuerpo", definido más arriba, tal como p.ej. unas cadenas ligeras y pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')<sub>2</sub>. Un fragmento que fija antígenos puede comprender una región variable de la cadena ligera y una región variable de la cadena pesada, pero no necesariamente ambas a la vez.

**Resultados clínicos**

Dentro del marco de unos ensayos terapéuticos fueron tratados 11 pacientes. 8 pacientes con un trasplante agotado en lo que respecta al TCRαβ de un donante haploidéntico y 3 pacientes con un trasplante de un donante no emparentado adaptado (en inglés "matched unrelated donor").

A causa del muy robusto agotamiento y por consiguiente del pequeño número de células de las células T TCRαβ<sup>+</sup> en el injerto no se tuvo que administrar ninguna profilaxia de GvHD en forma de unos medicamentos supresores de inmunidad después del trasplante tales como p.ej. MMF o CsA.

La enfermedad de un injerto frente a un anfitrión se había reducido en los pacientes tratados (Figura 2). En todos los casos, solamente la piel fue afectada por los síntomas de la GvHD, y los síntomas se presentaron sólo provisionalmente. Un 36 % de los pacientes mostraron una GvHD de grado I, y un 18 % de ellos mostraron una GvHD de grado II. No se observó ninguna GvHD de grado III. Esto es especialmente digno de mención puesto que después del trasplante no se administró ninguna profilaxia de la GvHD en forma de medicamentos supresores de inmunidad. En el caso de 10 de los 11 pacientes el injerto creció entre los días 7 y 9.

En todos los pacientes se observó una reconstitución de la inmunidad fuertemente acelerada. Tal como se puede ver en la Figura 1, la reconstitución de la inmunidad con unas poblaciones celulares agotadas en lo que respecta a TCRαβ/CD19 fue manifiestamente más rápida que con células agotadas en lo que respecta a CD3/CD19 (injertos).

Se representa la reconstitución de la inmunidad hasta la consecución de >200 células/μl después del trasplante de unas células madre de sangre periférica (N = 11) agotadas en lo que respecta a TCRαβ/CD19, en comparación con células madre de sangre periférica enriquecidas en lo que respecta a CD34 (testigo histórico, N = 13). Los datos acerca de la reconstitución de la inmunidad después de un trasplante de células madre con células enriquecidas en lo que respecta a CD34 se dedujeron de la siguiente publicación: Br J Haematol. 2001 Aug;114(2):422-32.

En todos estos pacientes se puede observar una muy rápida reconstitución de la inmunidad, que es totalmente sorprendente y no era explicable hasta ahora, puesto que la reconstitución se efectúa también manifiestamente con más rapidez que en el caso de la administración de una médula ósea no manipulada, que contiene todas las células reconstituyentes de la inmunidad del donante, y por lo tanto, en el caso de una médula ósea no manipulada debería haberse esperado en realidad una reconstitución de la inmunidad más rápida que en el caso de la administración de un preparado celular agotado en lo que respecta a TCR alfa/beta y CD19, que contiene menos células reconstituyentes de la inmunidad.

La Figura 5 muestra la reconstitución de la inmunidad de un paciente en el caso de tres trasplantes consecutivos de células madre. El primer trasplante de células madre lo recibió el paciente de un donante MUD con una médula ósea no manipulada, el segundo se recibió de un donante haploidéntico con células madre de sangre periférica (PBSC) agotadas en lo que respecta a CD3/CD19. En ambos casos no tuvo lugar ninguna reconstitución del sistema inmunitario. Tan sólo cuando el paciente recibió un tercer trasplante de células madre con PBSCs del padre que están agotadas en lo que respecta a TCR alfa/beta y CD19, se efectuó una muy rápida reconstitución de la inmunidad.

En contra de lo esperado, la GvHD no había aumentado en los casos del trasplante de TCR alfa/beta y de CD19 (Figura 2). En este caso, se ha de tomar en cuenta que sólo la piel había sido afectada por la GvHD y que los síntomas de la GvHD sólo se presentaron provisionalmente, a pesar de que no se añadió ninguna supresión de inmunidad al tratamiento.

La causa de la rápida reconstitución de la inmunidad podrían ser las células de TCR gamma/delta, que están contenidas en un preparado celular agotado en lo que respecta a TCR alfa/beta en el injerto, pero no en el caso de un injerto de células madre positivas para CD34

**Trasplante de células madre y médula ósea**

En el caso de un trasplante de médula ósea, al donante se le extrae desde el hueso pélvico bajo una anestesia general aproximadamente un litro de una mezcla de médula ósea y sangre.

En el caso de la extracción de células madre desde la sangre, se administra al paciente a lo largo de varios días una sustancia similar a una hormona propia del cuerpo, que estimula la producción de las células madre y su

transferencia desde la médula ósea a la circulación sanguínea. Los métodos para el tratamiento previo del donante y para la extracción de las células madre de médula ósea y de sangre constituyen un estado de la técnica y son conocidos por un experto en la especialidad.

## 5 Evolución

El objetivo del trasplante de células madre sanguíneas consiste en proveer al receptor de una población de células madre sanas, que se diferencien para dar células sanguíneas. De esta manera se reemplazan las células defectuosas o patológicas del receptor (*Beers y Berkow 2000*). En el caso del trasplante alógeno, el tejido procede de un donante sano. Éste puede ser un gemelo homocigótico (en inglés identical sibling twin), un hermano idéntico en lo que respecta al HLA (en inglés identical sibling), un miembro de la familia que no es idéntico en lo que respecta al HLA (en inglés mismatched related donor) un (donante haploidéntico) o un donante no emparentado compatible en lo que respecta al HLA. El objetivo principal del trasplante alógeno es reemplazar al sistema hematopoyético enfermo o defectuoso, tal como p.ej. la médula ósea del receptor, totalmente por un sistema hematopoyético funcional sano (entre otros el sistema inmunitario). El trasplante de células madre puede efectuarse, no obstante, también con células autólogas es decir propias del paciente.

### Donante (IdSib, MUD, donante haploidéntico)

Como donante de primera elección se considera un hermano o una hermana idéntico(a) en lo que respecta a los antígenos de histocompatibilidad relevantes HLA-A, B, C, DRB1 y DQB1 (en inglés Identical Sibling = IdSib). No obstante éste/ésta sólo se puede encontrar en aproximadamente un 30 %, de tal manera que en su lugar se tiene que buscar un donante no emparentado (en inglés matched unrelated donor, MUD) idéntico en lo que respecta al HLA (*Ottinger y colaboradores, 2001*). Puesto que distan mucho de conocerse todos los antígenos de histocompatibilidad y sólo puede ensayarse un número restringido de alelos, en el caso de un donante ajeno idéntico tiene que partirse de una peor coincidencia que en el caso del donante hermano.

Sigue quedando todavía una considerable parte sin ningún donante. Para estos pacientes se puede utilizar unos donantes emparentados, que solamente coinciden con el donante en un haplotipo de sus alelos de HLA, es decir que son haploidénticos.

Los injertos de donantes no emparentados (MUD) son utilizados con la mayor frecuencia para trasplantes de células madre hematopoyéticas (*Blood 2003; 101(4): 1630-6*).

### MUD: Injerto no manipulado

En el caso de los injertos no manipulados en el MUD Setting (ajuste de MUD), la complicación principal es la GvHD. Las formas graves de la GvHD se han de clasificar como peligrosas para la vida y requieren una terapia masiva con sustancias supresoras de inmunidad, para las que se describen unas tasas de respuesta de aproximadamente 40 % (*Vogelsang y colaboradores, 2003*). LA GvHD aguda de grado II-IV: V:33 %; C: 51 % y la de grado III-IV: V:11.7 %; C: 24,5 % (*Finke y colaboradores, Lancet, 2009*).

Alternativamente, se utilizó un injerto enriquecido en CD34 en el MUD Setting, con el fin de reducir la GvHD y de evitar los efectos secundarios utilizados con la necesaria profilaxia de la GvHD. La desventaja de esto es la retardada reconstitución de la inmunidad con todas las consecuencias..

### Trasplante propiamente dicho

El trasplante propiamente dicho se divide en dos fases. Con el acondicionamiento mediante una quimioterapia y/o una radioterapia, el sistema inmunitario del receptor es destruido, para que él no rechace a la médula ósea o respectivamente a las células madre transferidas o respectivamente trasplantadas. Es decir, que el receptor es preparado previamente para tolerar el injerto. Cuanto mejor se consiga esto, tanto menor será el riesgo de que el trasplante no se arraigue o sea rechazado. Según sea la intensidad del acondicionamiento se perseguirá el objetivo de aniquilar en el paciente a las células leucémicas o malignas que hayan quedado todavía. El trasplante se efectúa por vía intravenosa en el día 0. Hasta el arraigue o crecimiento (en inglés engraftment) del injerto y de la extinción de las toxicidades inmediatas, el paciente permanece por regla general en un puesto organizado de manera especial. Después del arraigue del trasplante y de la extinción de las toxicidades inmediatas, durante los primeros tres meses es necesaria una vigilancia estrecha. La intensidad de la vigilancia depende grandemente del tipo de donante y de las complicaciones y se convierte de una manera continua en el cuidado posterior regular, que dura toda la vida.

### Indicaciones

Todas las indicaciones, que hacen necesario un trasplante alógeno de células madre, pueden ser tratadas con la población de células conforme al invento o respectivamente con la composición farmacéutica. Todas las enfermedades malignas y no malignas, congénitas y adquiridas, graves, del sistema hematopoyético constituyen fundamentalmente unas indicaciones para un trasplante alógeno de células madre. A éstas se agregan las enfermedades malignas, que responden a una intensificación de las dosis de la quimioterapia o de la radioterapia.

Ciertos agentes supresores de inmunidad tales como la ciclosporina, los corticosteroides, los antimetabolitos y los anticuerpos antilinfocitarios monoclonales se emplean hoy en día de manera rutinaria, con el fin de poder controlar mejor a la GvHD.

**Agotamiento de las células madre TCR $\alpha$ / $\beta$ <sup>+</sup>**

El agotamiento de TCR $\alpha$ / $\beta$ <sup>+</sup> se ha descrito p.ej. en Chaleff y colaboradores, *Cytotherapy*, 2007, 9, 746-754 o como en el correspondiente protocolo de la entidad Miltenyi Biotec GmbH.

5

**Agotamiento combinado de células TCR $\alpha$ / $\beta$ <sup>+</sup>/ CD19<sup>+</sup>**

El producto de la leucoaféresis se diluye con el tampón CliniMACS<sup>®</sup> PBS/EDTA (con HSA hasta una concentración final de 0,5 % (p/v) antes de una marcación magnética. El producto de la leucoaféresis se diluye hasta un volumen 3 veces mayor que el del producto de la leucoaféresis sin sobrepasar un volumen máximo de

10

Las células son centrifugadas a 200xg durante 15 min. a la temperatura ambiente (desde +19 °C hasta +25 °C). El material sobrenadante se desecha. El peso óptimo para la marcación es de 88 g ( $\pm$  5 g). El sedimento se resuspende y se determina el peso. Las células se marcan con CliniMACS<sup>®</sup> TCR $\alpha$ / $\beta$ -biotina y con el reactivo CliniMACS<sup>®</sup> CD19, con un recipiente (con una capacidad de 7,5 ml) CliniMACS<sup>®</sup> TCR $\alpha$ / $\beta$ -biotina y con un recipiente (con una capacidad de 7,5 ml) CliniMACS<sup>®</sup> CD19. Los recipientes se almacenan a +2 °C hasta +8 °C y se utilizan en frío. Las células y los reactivos se mezclan, el período de tiempo de incubación es de 30 min a 25 rpm y a la temperatura ambiente (desde +19 °C hasta +25 °C).

15

El producto de la leucoaféresis y el tampón se mezclan y se sacuden ligeramente, seguido por una centrifugación a 300xg durante 15 min., sin freno, a la temperatura ambiente (desde +19 °C hasta +25 °C). El material sobrenadante se desecha. El sedimento se resuspende y se lava. Se añade un tampón hasta que se haya alcanzado un peso de aproximadamente 190 g para la marcación magnética con las células marcadas con TCR $\alpha$ / $\beta$ -biotina con el reactivo CliniMACS<sup>®</sup> anti-biotina. Los reactivos CliniMACS<sup>®</sup> anti-biotina (7,5 ml) enfriados a +2 °C hasta +8 °C se añaden a las células, se incuban durante 30 min. con un ligero sacudimiento de las células a 25 rpm y a la temperatura ambiente (desde +19 °C hasta +25 °C).

20

25

El producto de la leucoaféresis y 500 ml de tampón se sacuden ligeramente y se mezclan, luego se centrifugan a 300xg durante 15 min., sin freno, a la temperatura ambiente (desde +19 °C hasta +25 °C). El material sobrenadante se desecha, el sedimento se resuspende hasta que se hayan alcanzado los 150 g. Se recomienda mantener una concentración máxima de  $0,4 \times 10^9$  células por ml.

30

El programa DEPLETION 3.1 se inicia en el instrumento CliniMACS<sup>® plus</sup> y se siguen las instrucciones tal como se indican por parte del fabricante Miltenyi Biotec GmbH. Después de que se haya finalizado la separación automática, se determina la concentración de las células. Después de la separación automática, las células se han agotado en lo que respecta a TCR alfa/beta y CD19 en aproximadamente 3 hasta 5 escalones logarítmicos. El preparado celular agotado en lo que respecta a TCR alfa/beta y CD19, que se ha obtenido de esta manera, se puede utilizar para el trasplante, después de que hubiera sido recogido en una solución apropiada para el trasplante. Tales soluciones son conocidas por un experto en la especialidad.

35

40

**Figuras**

**Figura 1:** Reconstitución de la inmunidad después de un trasplante de células madre hasta alcanzar > 200 células/ $\mu$ l.

45

Se representa la reconstitución de la inmunidad hasta alcanzar > 200 células/ $\mu$ l después del trasplante de unas células madre de sangre periférica agotadas en lo que respecta a TCR $\alpha$  $\beta$ /CD19 (N = 11) en comparación con unas células madre de sangre periférica enriquecidas en lo que respecta a CD34 (testigo histórico, N = 13). Los datos acerca de la reconstitución de la inmunidad después del trasplante de células madre con unas células madre enriquecidas en lo que respecta a CD34 se dedujeron de la siguiente publicación: *Br J Haematol.* 2001; 114: 422-32.

50

**Figura 2: GvHD después del trasplante de células madre**

Incidencia de la GvHD aguda en el caso de pacientes con unos injertos haploidénticos agotados en lo que respecta a TCR  $\alpha$  $\beta$ /CD19. Grupos comparativos (testigos históricos): pacientes con unos injertos haploidénticos enriquecidos con CD34 y pacientes con una médula ósea no manipulada de donantes ajenos idénticos y con metotrexato/CsA para la profilaxia de la GvHD. Los datos de los grupos comparativos se dedujeron de la referencia de Lang y colaboradores 2007, *Zeitschrift für Regenerative Medizin*, Nr. 1: 32-39. "Grados" = estadio

55

60

**Figura 3 (A y B): Análisis de la diversidad del repertorio  $\beta$  del receptor de células T para la confirmación de la reconstitución de células T dependiente del timo**

Se muestra a modo de ejemplo el resultado del análisis de la diversidad del repertorio de TCR $\beta$  mediante la técnica CDR3 Spectratyping para la medición de la reconstitución de células T dependiente del timo en el caso de un paciente en el día 12 (Figura 3A) y en el día 33 (Figura 3B). La región CDR3 del receptor de células T es la

65

única región hipervariable no codificada en la línea germinal. Esta región del TCR $\alpha\beta$  se produce en el timo, entre otras cosas, mediante una recombinación. El método se ha descrito en Bone Marrow Transplant. 2008 Oct; 42 Suppl 2: S54-9.

5 **Figura 4: Círculos de excisión del receptor de células T (TRECs) en la sangre periférica para la cuantificación de las células T que proceden del timo.**

10 Se muestra a modo de ejemplo el resultado de la determinación de los círculos de excisión del receptor de células T (TRECs) en la sangre periférica para la confirmación de que, después del trasplante, se habían producido células T en el timo. Este método se empleó en muchos estudios después del trasplante con el fin de estimar la actividad del timo. El método se ha descrito en Zhonghua Yi Xue Zab Zhi. 2007 Ago 28;87(32):2265-7, "treshold cycle C(t)" = Ciclo de umbral C(t), "not depleted" = no agotado, "pre TX" = pre TX (trasplante)

15 **Figura 5 (A, B y C):** Resultados clínicos en el caso de niños. Análisis comparativo de la regeneración de las células T de un paciente.

1º injerto: médula ósea no manipulada de un donante MUD (2008)

20 2º injerto: PBSC de la madre, agotadas en lo que respecta a CD3/CD19 (2009)

3º injerto: PBSC del padre, agotadas en lo que respecta a TCR $\alpha\beta$ /CD19 (9 meses después del 2º trasplante)

25 Los gráficos muestran (de izquierda a derecha) la concentración de células positivas para CD3 (A), de células positivas para CD4 (B) y de células positivas para CD8 (C) en diversos momentos después del trasplante de médula ósea (células / microlitro).

**Ejemplo: Trasplante**

30 Once pacientes fueron trasplantados, cinco de ellos con el diagnóstico de una leucemia linfática aguda (ALL), tres pacientes con el diagnóstico de una leucemia mieloide aguda (AML), un paciente con el diagnóstico de una agranulocitosis, un paciente con el diagnóstico de una beta-talasemia, un paciente con el diagnóstico de un error congénito (HHS). Cinco de los pacientes ya habían recibido anteriormente un trasplante de células madre, otros tres ya habían recibido anteriormente dos o respectivamente tres trasplantes de células madre.

35 En ningún paciente se efectuó una supresión de inmunidad después del trasplante.

**Ejemplo: Donante MUD**

40 Un paciente con beta-talasemia, un paciente con ALL y un paciente con error congénito recibieron material de donante de un donante MUD con un preparado celular agotado en lo que respecta a TCR alfa/beta y agotado en lo que respecta a CD19.

**Ejemplo: GvHD crónica**

45 Un paciente, que recibió material de un donante haploidéntico desarrolló una GvHD crónica con una evolución moderada.

Ninguno de los pacientes, que recibieron material de un donante MUD, desarrolló una GvHD crónica.

50 **Lista de secuencias**

<110> Miltenyi Biotec GmbH

<120> Separaciones de células agotadas en lo que respecta a TCRalfa/beta

<130> MIL017WO

55 <150> DE102011001380.6  
< 151> 2011-03-17

<150> EP11168949.3  
< 151> 2011-06-07

<160> 14

ES 2 588 730 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 556

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 1

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met  
 1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp  
 20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln  
 35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu  
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile  
 65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu  
 85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr  
 100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp  
 115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro  
 130 135 140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala  
 145 150 155 160

ES 2 588 730 T3

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro  
 165 170 175  
 Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro  
 180 185 190  
 Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser  
 195 200 205  
 Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser  
 210 215 220  
 Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp  
 225 230 235 240  
 Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala  
 245 250 255  
 Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu  
 260 265 270  
 Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly  
 275 280 285  
 Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu  
 290 295 300  
 Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg  
 305 310 315 320  
 Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val  
 325 330 335  
 Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu  
 340 345 350  
 Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala  
 355 360 365  
 Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp  
 370 375 380  
 Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly  
 385 390 395 400  
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu



ES 2 588 730 T3

ccaaagaccg cctgagatc tgggagggag agcctccgtg tctcccaccg agggacagcc 600  
 tgaaccagag cctcagccag gacctcacca tggcccctgg ctccacactc tggctgtcct 660  
 gtggggtacc cctgactct gtgtccaggg gccccctctc ctggaccat gtgcaccca 720  
 aggggcctaa gtcattgctg agcctagagc tgaaggacga tgcgccggcc agagatatgt 780  
 gggtaaatgga gacgggtctg ttgttgcccc gggccacagc tcaagacgct gaaagtatt 840  
 attgtcaccg tggcaacctg accatgtcat tccacctgga gatcactgct cggccagtac 900  
 tatggcactg gctgctgagg actggtggct ggaaggtctc agctgtgact ttggcttacc 960  
 tgatcttctg cctgtgttcc cttgtgggca ttcttcatct tcaaagagcc ctggtcctga 1020  
 ggaggaaaag aaagcgaatg actgaccca ccaggagatt cttcaaagt acgcctcccc 1080  
 caggaagcgg gccccagaac cagtacggga acgtgctgtc tctcccaca cccacctcag 1140  
 gcctcggacg cgcccagcgt tgggccgag gcctgggggg cactgccccg tcttatggaa 1200  
 acccgagcag cgacgtccag gcgatggag ccttggggtc ccggagcccg ccgggagtgg 1260  
 gccagaaga agaggaaggg gagggctatg agaacctga cagtgaggag gactccgagt 1320  
 tctatgagaa cgactccaac cttgggcagg accagctctc ccaggatggc agcggctacg 1380  
 agaacctga ggatgagccc ctgggtcctg aggatgaaga ctcttctcc aacgtgagt 1440  
 cttatgagaa cgaggatgaa gagctgacct agccggtcgc caggacaatg gacttctga 1500  
 gcctcatgg gtcagcctgg gaccccagcc gggaagcaac ctccctgggg tcccagtcct 1560  
 atgaggatat gagaggaatc ctgtatgcag cccccagct ccgctccatt cggggccagc 1620  
 ctggaccaa tcatgaggaa gatgcagact cttatgagaa catggataat cccgatgggc 1680  
 cagaccagc ctggggagga gggggccgca tgggcacctg gagcaccagg tgatcctcag 1740  
 gtggccagcc tggatctcct caagtccca agattcacac ctgactctga aatctgaaga 1800  
 cctcgagcag atgatgcaa cctctggagc aatgttgctt aggatgtgtg catgtgtgta 1860  
 agtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtataca tgccagtgac acttccagtc cccttgtat 1920  
 tccttaaata aactcaatga gctcttcaa tcctaaaaa aaaaa 1965

<210> 3  
 <211> 7828  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 accatgcccg gctaattttt tttttttttt ttgagaagga gtctatgtgc ccagcattgt 60  
 tctagagcac ttgcaattag tggagaacaa cacggctctc actccaaggg gctcacatc 120  
 ttgtgcagaa aacagaaatg aacaaataaa cacacaagat catttcccgt ggtagtgaga 180  
 gctgggatga aaataaaaca gcgtggcagg gaggaggaac gtgtgtgtg tctggagggt 240

5

ES 2 588 730 T3

tcctggagaa tggggcctga ggcgtgacca ccgccttctt ctctgggggg actgcctgcc 300  
 gccccgcag acacccatgg ttgagtgcc tccaggtccc tgctgcccc agcatcccct 360  
 gcgcgaagct gggtagcccc gagagtctga ccaccatgcc acctcctcgc ctctcttctt 420  
 tcctcctctt cctcaccccc atggaagtca ggcccagagga acctctagtg gtgaaggtgg 480  
 aaggtatgtc caaagggcag aaaggaaggt gattgaggct ggaaacttga gttgtggctg 540  
 ggtgtccttg gctgagtaac ttacctctc tgagcctcca ttttcttatt tgtaaaattc 600  
 aggaaagggg tggaaaggact ctgccggctc ctccaactcc agcttttggg gtctctgct 660  
 ctataacctg gtgtgaggag tcggggggct tggaggtccc cccacccat gccacacct 720  
 ctctccctct ctctccacag agggagataa cgctgtgctg cagtgcctca aggggacctc 780  
 agatggcccc actcagcagc tgacctggtc tcgggagtcc ccgcttaaac ctttcttaa 840  
 actcagcctg gggctgccag gcctgggaat ccacatgagg cccctggcca tctggctttt 900  
 catcttcaac gtctctcaac agatgggggg cttctacctg tgccagccgg ggcctctctc 960  
 tgagaaggcc tggcagcctg gctggacagt caatgtggag ggcagcgggt agggccgggc 1020  
 tggggcaggg gcagggagg agaaaggagg ccacatgga cagaagaggt ccgcggccac 1080  
 aatggagctg gagagagggg ctggagggat tgagggcga actcggagct aggtgggcag 1140  
 actcctgggg cttcgtggct tcagtatgag ctgcttctct tccctctacc tctcactgtc 1200  
 ttctctctct ctgcgggtct ttgtctctat ttatctctgt ctttgagtct ctatctctct 1260  
 ccctctcctg ggtgtctctg catttggttc tgggtctctt cccaggggag ctgttccggt 1320  
 ggaatgttct ggacctaggt ggcctgggct gtggcctgaa gaacaggtcc tcagagggcc 1380  
 ccagctcccc ttccgggaag ctcatgagcc ccaagctgta tgtgtgggcc aaagaccgcc 1440  
 ctgagatctg ggagggagag cctccgtgtc tcccaccgag ggacagcctg aaccagagcc 1500  
 tcagccaggg tatggtgatg actggggaga tgccgggaag cgggggtcca gagacagagg 1560  
 ggaggggaaa ctgaagaggt gaaaccctga ggatcaggct ttctctgtct tatctctccc 1620  
 tgtcccagac ctacccatgg cccctggctc cacactctgg ctgtcctgtg gggtaacccc 1680  
 tgactctgtg tccaggggcc ccctctcctg gacctatgtg caccccaagg ggcctaagtc 1740  
 attgctgagc cttagagctga aggacgatcg cccggccaga gatatgtggg taatggagac 1800  
 gggctctgtg ttgccccggg ccacagctca agacgctgga aagtattatt gtcaccgtgg 1860  
 caacctgacc atgtcattcc acctggagat cactgctcgg ccaggtagag tttctctcaa 1920  
 ctgggaggca tctgtgtggg ggtactggga agaagtggaa gccagtcaat cttagattcc 1980  
 cccaaccoga gggctactcc cagcctcacc ccaaaccoca acttccacac agaactga 2040  
 ctccaagtct ttcttttttt tgacagagtc tcgctctgtt gcctaggctg gagtgcagtg 2100  
 gtgccatctt gtcttggctc actgcaacct ccgcctccca ggttcaagtg attcccctgc 2160

ES 2 588 730 T3

ctcagcctcc tgagtagctg ggattacagc tgcccaccac cacgcctggc taatTTTTTT 2220  
TTTTTTTT agacggagtc ttgcactgtc acccaggctg gagtgcagtg gcacgatctc 2280  
agctcactgc aacctccacc ttccaggttc aagtgattct cctgcctcag cctccccagt 2340  
agctgggatt aaagcctggc taatTTTTTT tgtatTTTTa gtagagatgg ggTTTcatta 2400  
tgttggccag gctggtctca aactcctgac ctctgtatcc acccgcctcg gcctcccaaa 2460  
gtgctgggat tacagacatg agccacaggc cggggccaag cctaattttg tattTTTTagT 2520  
agagatgggg tttctccctg ttggaccagg ctggtcttga actcctgact tcaggtgatc 2580  
tgcctgcctt ggcctcccaa agtactggga ttacaggcat aagccaccgc acctggccta 2640  
gacttcaagt ctttcttccc tcgcttccaa gacactactt ttctgggtct tcacctacca 2700  
ttgcttgccg ctgcccacca gcttgggtgg agtcttcctt cctccccaac tcctcactct 2760  
tggagccctg ggccctcttc ttatccctgt ctgcacactt tcctatttga acttgactct 2820  
caatggcttc ttgggtcacc atgccttggT gactctattc caggctccat actcagccat 2880  
ctcctgtgcc atttgatatc ccatggacac ctcaggctca acagatacaa aatcaaaactc 2940  
aatgtcttcc ccaagtatag tcttcttggT ggcccagtgT aagcagaggg caccaccacc 3000  
tgctccctcg cccaggtcaa gaacctgggc atccttcttt ttctctaccc cgtccaacaa 3060  
actggtcaca gtgttctgcc aattctctct ccatgcaatc ctatcatgct atcctaactg 3120  
caattcacia acccaacccc aactttcact ccaaacttga tccaagcaat gtgtgggatc 3180  
ccaactgtaa ccttgcaaac tcaactctgc ccttcacttt gaccgtgact atccttaatt 3240  
gcagcaggaa actgatcatt atgctcccct caatccacac attgcctctg agtacagcca 3300  
tggtttgtcc acgatttgtc caaagacact gccccatgct ctgtgccagg gtctgtgaca 3360  
atccctgacc tcctgggaca tggctcctta gagagaggag agcctttctc acagcttggg 3420  
actttgagtc tgtgtctttt ttttttctt gagacggagt tttgctgtgg ttgccaggc 3480  
tggagtgcag tgatctcggc tcaactgaaac ctccgcctcc cgggttcaaa cgattctcct 3540  
gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca ggcaccacc accatgcca gctaatTTTT 3600  
ttgtatTTTT agtagagatg gggtttcacc atgttggcca ggctggctc gaactcctga 3660  
cctcaggtga tccaccgcc tttgcctccc aaagtgtgg gattacaggc gtcaaccacc 3720  
gcgcccggcc gagtctgtgt ctgctctctg tgcctcagac ttgcggttcc ttgagatctc 3780  
aggattggga cgtaagatgc cagcctgggg tcctctgtctc atagcccctt cccctagta 3840  
ctatggcact ggctgtgag gactggtggc tgggaaggtct cagctgtgac tttggcttat 3900  
ctgatcttct gcctgtgttc ccttgtgggc attcttcac ttc aaagagg tgagtcatgt 3960  
ccccagtggg tctgtccaaa ccctactcca tcttccccag gataagccgg ctctggccag 4020

ES 2 588 730 T3

tctgacaacc atctttcttt cctcccatcc ctcccttcaa gaccccagaa tctgttctc 4080  
cccagtcttc ctctagcctc cctcaaactt cccaagcctc ttgcaatfff tttttttttt 4140  
ttgagacagg gtctcattct gtcaccccag ctggagtgca gtggcacaat ctgagctcac 4200  
tgtaacctct gcctcccagg cttaagtgat tcttgtgctt cagcctcccg agtacctggg 4260  
actacaagtg tatgccacca caccgggcca attttttata ttttttagtag agacgaggtt 4320  
tcaccatggt ggccagactg gtctcgaact cttgacctca aatgatccgc ccacctcggc 4380  
ctcccaaagt gctgggatta caggcaacgag ccaccgcgcc cgtccgcctc gcaattttaa 4440  
ctcctgtctc ctttgttgaa ccaagtgacc tcccagcac ctggccccac aaatcctcac 4500  
cctgccaagc agccccctct ctgatcacgc cctttaactc ccaccagccc tggtcctgag 4560  
gaggaaaaga aagcgaatga ctgaccccac caggaggtaa tgcaaccagt gcaccccgcg 4620  
gtaacacctc ccacctcac tttatgcctt gcacttactg tttcctctgc ccaggggttc 4680  
tttgcctcgt ctctactggt tcaaatactg cccaacctca aagcccagct ccaaagctac 4740  
ctcctctgtg aagaactcct tggaaatgat catctcagac tcctctattg gctgtcccag 4800  
cacaagtgat cacgtttaac ttctgaaggc ctggacagaa tcttgagtgg gtccgccatt 4860  
ccattccaag tcggccctca ccgtgcactt cctctctctc cgcagattc ttcaaagtga 4920  
cgcctcccc aggaagcggg ccccagaacc agtacgggaa cgtgctgtct ctccccacac 4980  
ccacctcagg cctcggttaag aggcaccgcc cctccagcct atagctccgc ccagatccg 5040  
gggctccacc cccactctcc tcatccctcc aatccgctgt gcgccaagcc ttctggagct 5100  
cggaaactccg cccccggggc ggggagtccc gccagctat gagccccgcc tctagaacca 5160  
gaccccgcct ccagggctca gagccaagcc cccaggacc agagcctgaa gtogtaatca 5220  
agagcagaac ttcgccccag aactgaaggc ctcgcccta gatttagatt ccgccccagg 5280  
gttcaaggcc gggttcctag acccagagtc cattcgcaga gcccaaaaca tctcttccc 5340  
gtgccccgcc gcgcggacce tttagccttga ccgccccat ctctctgac ccgctcttac 5400  
aatgcccctc tcaccaggac gcgcccagcg ttgggcccga ggccctgggg gcactgcccc 5460  
gtcttatgga aaccgagca gcgacgtcca ggcgatgga gccttgggg cccggagccc 5520  
gccgggagtg ggtgaatgac tgggagaggg aagggtcgtt cccacatgg agggggttg 5580  
agcggctctgt ggcccgaata gtggactggg ccctggagga gagggggcat gactcggttc 5640  
cccatcccc tccccaaacc cccaggccca gaagaagagg aaggggaggg ctatgaggaa 5700  
cctgacagtg aggaggactc cgagttctat gagaacgact ccaacctgg gcaggaccag 5760  
ctctcccagg gtaaggctgc cctccccgt ggccccccac ctctgcggtg gcctgtggac 5820  
tcccattgac accctcctt ctccaccaga tggcagcggc tacgagaacc ctgaggatga 5880  
gcccctgggt cctgaggatg aagactcctt ctccaacggt aacttggggc ctttgtggga 5940

ES 2 588 730 T3

cctcagagac ttaggtgtaa ttgcagcgct gtgacactcc tagaaggggt ccctggagtt 6000  
 ctctctcttc tgccacagct gagtcttatg agaacgagga tgaagagctg acccagccgg 6060  
 tcgccaggac aatgggtgtg tgtgaggatg gcaacagtcc aggggggagg cggaggacac 6120  
 ctggaggcca ggaggaatag taacctcctt cttccctttc cagacttcct gagccctcat 6180  
 gggtcagcct gggaccccag ccggaagca acctccctgg gtgagagatg ctttcaatca 6240  
 gactgccttg cccagcttgg gtgacctggc ctcagctctg acaccagatc caactttgac 6300  
 ctgaccctga ccccaaacc gaaccaatc ctgtgactcc tctcacctca aactgagcc 6360  
 ccatccccc tcttgagccc catccccat cctgaccccc aatatttacc ccctccctaa 6420  
 ctgtgaatat caacaccgat cccaatgcag tatcagcctg gacttgatct ccacctcacc 6480  
 tcagccccag tgcagacctc aacttggacc ccagcttact ctgcagcttc ttcattgactc 6540  
 tgactccgac tccctccagt ttcttctttt tctttttctt ttttttgaga cggagtctcc 6600  
 ctctgttgcc caggctggag tgcagttgcc acctctgctt cctaggttca agcgattctc 6660  
 atgcctcagc ctctctgagta gctgggatta tagacgtttg ccaccacacc tggctaattt 6720  
 ttgtattttc agtagagaca gggtttcgcc atgttggcca gactggtctc caactcctgg 6780  
 cctctagtga tctgcccccc ttggcttccc aaagtctctg gattacaggc atgagccacc 6840  
 acgcccagcc cagttctgtt ctgaccctt tccttagcca taactaacc catatctaac 6900  
 cctgacccta cagctaactg gggcccaaaa ctcaatgcta accaaatcac cccttcccag 6960  
 cacagcatgg gtaatgctcc tcaccttctt ctgcccctca gtcttctctc ttaccgtagg 7020  
 ctgtacttcc catgccctag cctccaatc tccatcccc gcccaagcag ggtcccagtc 7080  
 ctatgaggat atgagaggaa tcctgtatgc agccccccag ctccgctcca ttcggggcca 7140  
 gcctggacc aatcatgagg aaggtgggtg cttctgccc tgtcccctgc tgtcccctgg 7200  
 gctgactttg ccttccagcc tacttccagt gccaccatg ttctcctcct ccctggctct 7260  
 atccagatgc agactcttat gagaacatgg ataatccca tgggccagac ccagcctggg 7320  
 gaggggggg ccgcatgggc acctggagca ccaggtgatc ctcaggtggc caggtgagct 7380  
 gggactgccc ctagggaag cggggaggga gggagatagg cacggatggc agtggctgct 7440  
 ggctttcagg gagggagagg gaacagggtt cctagggcct ggtgggcagg gggaggactg 7500  
 ctggaccct ccccatcacc gtttcttctg catagcctgg atctcctcaa gtcccaaga 7560  
 ttcacacctg actctgaaat ctgaagacct cgagcagatg atgccaacct ctggagcaat 7620  
 gttgcttagg atgtgtgcat gtgtgtaagt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtatacatgc 7680  
 cagtgacct tccagtcccc tttgtattcc ttaaataaac tcaatgagct cttccaatcc 7740  
 tatgaagtag tgccattgtg tgggaaggaa ggggaaggaaa gaaagggaag gaaagggaag 7800  
 ggaaggaaag gaagggaagg aaagcctg 7828

<210> 4  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 588 730 T3

<400> 4

Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser  
1 5 10 15

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln  
20 25 30

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys  
35 40 45

Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val  
50 55 60

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn  
65 70 75 80

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys  
85 90 95

Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn  
100 105 110

Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val  
115 120 125

Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
130 135 140

<210> 5

< 211> 426

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

5

<400> 5

cctaatatcc agaaccctga ccctgccgtg taccagctga gagactctaa atccagtgac 60

aagtctgtct gcctattcac cgattttgat tctcaaacia atgtgtcaca aagtaaggat 120

tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc 180

aacagtgctg tggcctggag caacaaatct gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac 240

agcattattc cagaagacac cttcttcccc agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg 300

gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg 360

ttccgaatcc tctcctgaa agtggccggg ttaaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg 420

tccagc 426

10

<210> 6

< 211> 3430

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

ES 2 588 730 T3

<400> 6  
ttcccgata aagcatgaga ccgtgacttg ccagcccac agagccccgc ccttgtccat 60  
cactggcatc tggactccag cctgggttg ggcaaagagg gaaatgagat catgtcctaa 120  
ccctgatcct cttgtcccac agatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga 180  
gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaacaaat 240  
gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aaactgtgct agacatgagg 300  
tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtg gcctggagca acaaactga ctttgcattg 360  
gcaaacgcct tcaacaacag cattattoca gaagacacct tttccccag ccaggtgaa 420  
ggcagctttg gtgccttcgc aggtgtttc cttgcttcag gaatggccag gttctgccca 480  
gagctctggc caatgatgac taaaactcct ctgattggcg gtctcggcct tatccattgc 540  
caccaaaacc ctctttttac taagaaacag tgagccttgc tctggcagtc cagagaatga 600  
cacgggaaaa aagcagatga agagaagtg gcaggagagg gcacgtggcc cagcctcagt 660  
ctctccaact gagttcctgc ctgcctgcct ttgctcagac tgtttgcccc ttactgctct 720  
tctaggcctc attctaagcc cttctccaa gtgctctc cttatttctc cctgtctgcc 780  
aaaaaatctt tcccagctca ctaagtcagt ctcaagcagt cactcattaa cccaccaatc 840  
actgattgtg ccggcacatg aatgcaccag gtgttgaagt ggaggaatta aaaagtcaga 900  
tgaggggtgt gccagagga agcaccattc tagttggggg agcccatctg tcagctggga 960  
aaagtccaaa taacttcaga ttggaatgtg ttttaactca gggttgagaa aacagccacc 1020  
ttcaggacaa aagtcaggga agggctctct gaagaaatgc tacttgaaga taccagccct 1080  
accaagggca gggagaggac cctatagagg cctgggacag gagctcaatg agaaaggaga 1140  
agagcagcag gcattgattg aatgaaggag gcagggcccg gtcacagggc cttctagggc 1200  
atgagagggg agacagtatt ctaagtaagc cagaaagctg ttgatcggct tcaagcaggg 1260  
aagggacacc taatttgctt ttcttttctt tttttttttt tttttttttt tttttttgag 1320  
atggagtttt gctcttggtg ccaggtctgg agtgcaatgg tgcattctgg ctactacaa 1380  
gcctctgcct ccaggttca agtgattctc ctgcctcagc ctccaagta gctgggatta 1440  
caggcaccca ccaccatgcc cggctaattt ttgtatttt tagtagagac aggtttcac 1500  
tatgttggcc aggtgtgtct cgaactcctg acctcaggtg atccaccgc ttcagcctcc 1560

ES 2 588 730 T3

caaagtgctg ggattacagg cgtgagccac cacacccggc ctgcttttct taaagatcaa 1620  
 tctgagtgct gtacggagag tgggttgtaa gccaaagagta gaagcagaaa gggagcagtt 1680  
 gcagcagaga gatgatggag gcctgggcac ggtggtggca gggaggtaac caacaccatt 1740  
 caggtttcaa aggtagaacc atgcagggat gagaaagcaa agaggggatc aaggaaggca 1800  
 gctggatttt ggcctgagca gctgagtcaa tgatagtgcc gtttactaag aagaaccaa 1860  
 ggaaaaaatt tggggtgcag ggatcaaac tttttggaac atatgaaagt acgtgtttat 1920  
 actctttatg gcccttgtca ctatgtatgc ctcgctgcct cattggactc tagaatgaag 1980  
 ccaggcagag cagggctctat gtgtgatggc acatgtggcc agggctatgc agacatgtac 2040  
 tttgtacaaa cagtgtatat tgagtaaata gaaatggtgt ccaggagccg aggtatcgtc 2100  
 ctgccagggc caggggctct ccctagcagg tgctcatatg ctgtaagtcc cctccagatc 2160  
 tctccacaag gaggcattga aaggctgtag ttgttcacct gcccaagaac taggaggtct 2220  
 ggggtgggag agtcagcctg ctctggatgc tgaaagaatg tctgtttttc cttttagaaa 2280  
 gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac aggtaagaca ggggtctagc 2340  
 ctgggtttgc acaggattgc cgaagtgatg aaccocgaat aaccctgcct ggatgagggg 2400  
 gtgggaagaa attagtagat gtgggaatga atgatgagga atggaaacag cgggtcaaga 2460  
 cctgcccaga gctgggtggg gtctctcctg aatccctctc accgtctctg actttccgtt 2520  
 ctaagcactt tgaggatgag tttctagctt caatagacca aggactctct cctaggcctc 2580  
 tgtattcctt tcaacagctc cactgtcaag agagccagag agagcttctg ggtggcccag 2640  
 ctgtgaaatt tctgagtccc ttagggatag ccctaaacga accagatcat cctgaggaca 2700  
 gccaaagagg tttgccttct ttcaagacaa gcaacagtac tcacataggc tgtgggcaat 2760  
 ggtcctgtct ctcaagaatc ccctgccact cctcacacc accctgggcc catattcatt 2820  
 tccatttgag ttgttcttat tgagtcatcc ttcctgtggc agcggaactc actaaggggc 2880  
 ccctctggac ccgaggtatt gtgaagataa attctgagca cctaccccat ccccagaagg 2940  
 gctcagaaat aaaataagag ccaagtctag tccggtgttc ctgtcttgaa acacaatact 3000  
 gttggccctg gaagaatgca cagaatctgt ttgtaagggg atatgcacag aagctgcaag 3060  
 ggacaggagg tgcaggagct gcaggcctcc cccaccagc ctgctctgcc ttggggaaaa 3120  
 ccgtgggtgt gtcctgcagg ccatgcaggc ctgggacatg caagccata accgctgtgg 3180  
 cctcttggtt ttacagatac gaacctaaac tttcaaaccc tgtcagtgat tgggttccga 3240  
 atcctcctcc tgaaagtggc cgggtttaat ctgctcatga cgctgcggct gtggtccagc 3300  
 tgaggtgagg ggccttgaag ctgggagtgg ggtttagggg cgcggtctc tgcgtgcac 3360  
 ctaagctctg agagcaaacc tcctgcagg gtcttgcttt taagtccaaa gcctgagccc 3420  
 accaaactct 3430

<210> 7  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 588 730 T3

<400> 7

Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro  
 1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
 20 25 30

Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn  
 35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys  
 50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu  
 65 70 75 80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys  
 85 90 95

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp  
 100 105 110

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg  
 115 120 125

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser  
 130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala  
 145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp  
 165 170 175

Phe

<210> 8

< 211> 531

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

5

<400> 8

gaggacctga acaaggtggt cccacccgag gtcgctgtgt ttgagccatc agaagcagag 60

atctcccaca cccaaaaggc cacactggtg tgcctggcca caggcttctt ccccgaccac 120

gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag gaggtgcaca gtggggtcag cacagacccg 180

cagcccctca aggagcagcc cgcctcaat gactocagat actgcctgag cagccgctg 240

agggtctcgg ccaccttctg gcagaacccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc 300

tacgggctct cggagaatga cgagtggacc caggataggg ccaaaccggt caccagatc 360

gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac tgtggcttta cctcgggtgc ctaccagcaa 420

ggggtcctgt ctgccacat cctctatgag atcctgctag ggaaggccac cctgtatgct 480

gtgctggtca gcgcccttgt gttgatggcc atggtcaaga gaaagattt c 531

ES 2 588 730 T3

<210> 9  
 < 211> 2042  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 9  
 tgcatacctag ggacagcata gaaaggaggg gcaaagtgga gagagagcaa cagacactgg 60  
 gatggtgacc ccaaaacaat gagggcctag aatgacatag ttgtgcttca ttacggccca 120  
 ttcccagggc tctctctcac acacacagag cccctaccag aaccagacag ctctcagagc 180  
 aacctggtct ccaaccctc ttccctttcc agaggacctg aacaaggtgt tcccaccgca 240  
 ggtcgctgtg tttgagccat cagaagcaga gatctcccac acccaaaagg ccacactggt 300  
 gtgcctggcc acaggcttct tccccacca cgtggagctg agctggtggg tgaatgggaa 360  
 ggaggtgcac agtggggtca gcacggacct gcagcccctc aaggagcagc ccgcccctca 420  
 tgactccaga tactgcctga gcagccgctt gagggctctc gccaccttct ggcagaacct 480  
 ccgcaaccac ttccgctgtc aagtccagtt ctacgggctc tcggagaatg acgagtggac 540  
 ccaggatagg gccaaaccgg tcaccagat cgtcagcgcc gaggcctggg gtagagcagg 600  
 tgagtggggc ctggggagat gcctggagga gattaggtga gaccagctac cagggaaaat 660  
 ggaaagatcc aggtagcaga caagactaga tccaaaaaga aaggaaccag cgcacacat 720  
 gaaggagaat tgggcacctg tggttcattc ttctccaga ttctcagccc aacagagcca 780  
 agcagctggg tcccctttct atgtggcctg tgtaactctc atctgggtgg tgcccccat 840  
 ccccctcagt gctgccacat gccatggatt gcaaggaaa tgtggctgac atctgcatgg 900  
 cagaagaaag gaggtgctgg gctgtcagag gaagctggtc tgggcctggg agtctgtgcc 960  
 aactgcaaat ctgactttac ttttaattgc ctatgaaaat aaggtctctc atttattttc 1020  
 ctctccctgc tttctttcag actgtggctt tacctcgggt aagtaagccc ttccttttcc 1080  
 tctccctctc tcatggttct tgacctagaa ccaagggcat aagaactcac agacactgga 1140

ES 2 588 730 T3

```

gggtggaggg tgggagagac cagagctacc tgtgcacagg taccacactg tccttcctcc      1200
gtgccaacag tgtcctacca gcaaggggtc ctgtctgcca ccatcctcta tgagatcctg      1260
ctaggggaagg ccaccctgta tgctgtgctg gtcagcgccc ttgtgttgat ggccatggta      1320
agcaggaggg caggatgggg ccagcaggct ggaggtgaca cactgacacc aagcacccag      1380
aagtatagag tccctgccag gattggagct gggcagtagg gagggaagag atttcattca      1440
ggtgcctcag aagataactt gcacctctgt aggatcacag tggagggtc atgctgggaa      1500
ggagaagctg gagtcaccag aaaacccaat ggatgttgat atgagcctta ctatttctgt      1560
ggtcaatggg ccctactact ttctctcaat cctcacaact cctggctctt aataaccccc      1620
aaaactttct cttctgcagg tcaagagaaa ggatttctga aggcagccct ggaagtggag      1680
ttaggagctt ctaacccgtc atggtttcaa tacacattct tcttttgcca gcgcttctga      1740
agagctgctc tcacctctct gcacccaat agatatcccc ctatgtgat gcacacctgc      1800
acactcacgg ctgaaatctc cctaaccag ggggacctta gcatgcctaa gtgactaaac      1860
caataaaaat gttctggtct ggcctgactc tgacttctga atgtctggat agctccttgg      1920
ctgtctctga actccctgtg actctcccca ttcagtcagg atagaaacaa gaggtattca      1980
aggaaaatgc agactcttca cgtaagaggg atgaggggcc caccttgaga tcaatagcag      2040
aa                                                                           2042

```

<210> 10  
<211> 179  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

```

<400> 10
Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
1           5           10           15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
          20           25           30

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
          35           40           45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
          50           55           60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
65           70           75           80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
          85           90           95

```

ES 2 588 730 T3

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp  
 100 105 110

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg  
 115 120 125

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser  
 130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala  
 145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp  
 165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 11

<211> 178

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 11

Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser  
 1 5 10 15

Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala  
 20 25 30

Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly  
 35 40 45

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu  
 50 55 60

Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg  
 65 70 75 80

Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln  
 85 90 95

Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg  
 100 105 110

Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala  
 115 120 125

ES 2 588 730 T3

Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala  
 130 135 140

Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val  
 145 150 155 160

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser  
 165 170 175

Arg Gly

5 <210> 12  
 < 211> 537  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

<400> 12  
 gaggacctga aaaacgtgtt cccacccgag gtcgctgtgt ttgagccatc agaagcagag 60  
 atctcccaca cccaaaaggc cactactggtg tgcttgcca caggcttcta ccccgaccac 120  
 gtggagctga gctggtgggt gaatggaag gaggtgcaca gtggggtcag cacagaccg 180  
 cagcccctca aggagcagcc cgcctcaat gactccagat actgcctgag cagccgctg 240  
 agggctctcg ccacctctg gcagaacccc cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc 300  
 tacgggctct cggagaatga cgagtggacc caggataggg ccaaacctgt caccagatc 360  
 gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac tgtggcttca cctccgagtc ttaccagcaa 420  
 ggggtcctgt ctgccaccat cctctatgag atcttgctag ggaaggccac cttgtatgcc 480  
 gtgctgttca gtgccctcgt gctgatggcc atggtcaaga gaaaggattc cagaggc 537

10 <210> 13  
 < 211> 534  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

<400> 13  
 gacctgaaaa acgtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc 60  
 tcccacacc aaaaggccac actggtgtgc ctggccacag gcttctacc cgaccagtg 120  
 gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagt gggtcagcac agaccgcag 180  
 cccctcaagg agcagcccgc cctcaatgac tccagatact gcctgagcag cgcctgagg 240  
 gtctcggcca ccttctggca gaacccccgc aaccacttcc gctgtcaagt ccagttctac 300  
 gggctctcgg agaatgacga gtggaccag gatagggcca aacctgtcac ccagatcgtc 360  
 agcggcaggg cctggggtag agcagactgt ggcttcacct ccgagtctta ccagcaaggg 420

15 gtcctgtctg ccaccatcct ctatgagatc ttgctaggga aggccacctt gtatgccgtg 480  
 ctggtcagtg ccctcgtgct gatggccatg gtcaagagaa aggattccag aggc 534

20 <210> 14  
 < 211> 2008  
 < 212> ADN  
 < 213> Homo sapiens

ES 2 588 730 T3

<400> 14  
atggcgtagt ccccaaagaa cgaggaccta gtaacataat tgtgcttcat tatggtcctt 60  
tcccggcctt ctctctcaca catacacaga gccctacca ggaccagaca gctctcagag 120  
caaccctagc cccattacct cttcccttc cagaggacct gaaaaacgtg tccccaccg 180  
aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca caccctaaaag gccacactgg 240  
tgtgcttggc cacaggcttc taccocgacc acgtggagct gagctggtgg gtgaatggga 300  
aggaggtgca cagtggggtc agcacagacc cgcagcccct caaggagcag cccgcctca 360  
atgactccag atactgcctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc tggcagaacc 420  
cccgaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat gacgagtgga 480  
cccagatag ggccaaacct gtcacccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg ggtagagcag 540  
gtgagtgggg cctggggaga tgcttgagg agattaggtg agaccagcta ccagggaaaa 600  
tggaagatc caggtagcgg acaagactag atccagaaga aagccagagt ggacaagggtg 660  
ggatgatcaa ggttcacagg gtcagcaaag cacggtgtgc acttccccca ccaagaagca 720  
tagaggctga atggagcacc tcaagctcat tcttcttca gatcctgaca ccttagagct 780  
aagctttcaa gtctccctga ggaccagcca tacagctcag catctgagtg gtgtgcatcc 840  
cattctcttc tggggtcctg gtttcctaag atcatagtga ccacttcgct ggcactggag 900  
cagcatgagg gagacagaac cagggctatc aaaggaggct gactttgtac tatctgatat 960  
gcatgtgttt gtggcctgtg agtctgtgat gtaaggctca atgtccttac aaagcagcat 1020  
tctctcatcc attttcttc cctgttttc tttcagactg tggcttcacc tccggttaagt 1080  
gagtctctcc ttttctctc tatctttcgc cgtctctgct ctcgaaccag ggcattggaga 1140  
atccacggac acagggcggt gagggagcc agagccacct gtgcacaggt acctacatgc 1200  
tctgttcttg tcaacagagt cttaccagca aggggtcctg tctgccacca tctctatga 1260  
gatcttgcta ggaagcca cttgtatgc cgtgctggc agtgccctcg tgctgatggc 1320  
catgtaagg aggaggtgg gatagggcag atgatggggg caggggatgg aacatcacac 1380  
atgggcataa agaatctca gagccagagc acagccta atatcctatc acctcaatga 1440  
aaccataatg aagccagact ggggagaaaa tgcagggaat atcacagaat gcatcatggg 1500  
aggatggaga caaccagcga gccctactca aattaggcct cagagccgc ctcccctgcc 1560

ctactcctgc tgtgccatag ccctgaaac cctgaaaatg ttctctcttc cacaggtcaa 1620  
gagaaaggat tccagaggct agctccaaaa ccatcccagg tcattcttca tctcaccba 1680  
ggattctcct gtacctgctc ccaatctgtg ttctaaaag tgattctcac tctgcttctc 1740  
atctcctact tacatgaata cttctctctt ttttctgttt ccctgaagat tgagctccca 1800  
acccccagt acgaaatag ctaaaccaat aaaaattgt gtgttgggccc tggttgcatt 1860  
tcaggagtgt ctgtggagt ctgctcatca ctgacctatc ttctgattta gggaaagcag 1920  
cattcgcttg gacatctgaa gtgacagccc tctttctctc caccatgc tgctttctcc 1980  
tgttcatcct gatggaagtc tcaacaca 2008

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica, que tiene una población de células obtenible a partir de médula ósea o de sangre, estando la población de células agotada de células positivas para TCR alfa/beta y de células positivas para CD19, y teniendo ella células positivas para TCR gamma/delta.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Un procedimiento para la producción de una población de células, que tiene células positivas para TCR gamma/delta, procedente de médula ósea o de sangre, y que tiene el agotamiento de células positivas para TCR alfa/beta y de células positivas para CD19.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agotamiento de células positivas para TCR alfa/beta se efectúa mediante un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos, dirigido contra TCR alfa/beta.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agotamiento de células positivas para CD319 se efectúa mediante un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos, dirigido contra CD19.
- 20 6. Una utilización de un anticuerpo o de un fragmento que fija antígenos, dirigido contra TCR alfa/beta y/o un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos dirigido contra CD19 para la producción in vitro de una población de células que está agotada en lo que respecta a TCR alfa/beta y CD19, y que tiene células positivas para TCR gamma/delta.
- 25 7. Una utilización de un estuche para la producción de una población de células, que está agotada en lo que respecta a TCR alfa/beta y CD19, y que tiene células positivas para TCR gamma/delta, que tienen un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos, dirigido contra TCR alfa/beta, y un anticuerpo o un fragmento que fija antígenos, dirigido contra CD19.