

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 060**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00	(2006.01)
C12N 5/0783	(2010.01)
A61K 35/14	(2015.01)
A61P 35/02	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 14/05	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012 PCT/US2012/061025**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13059593**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12781544 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2768863**

54 Título: **Receptores de antígenos quiméricos anti-CD22**

30 Prioridad:

20.10.2011 US 201161549516 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2018

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
Office of Technology Transfer National Institutes of Health 6001 Executive Boulevard, Suite 325
Msc 7600
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**ORENTAS, RIMAS J.;
MACKALL, CRYSTAL L. y
PASTAN, IRA H.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 654 060 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

Receptores de antígenos quiméricos anti-CD22

Antecedentes de la invención

5 El cáncer es un problema de salud pública. A pesar de los avances realizados en tratamientos tales como quimioterapia, el pronóstico de muchos cánceres, incluidas las neoplasias malignas hematológicas, puede ser deficiente. Por ejemplo, en el año 2000, en los Estados Unidos, se ha estimado que se esperaban más de 45.000 muertes por linfoma no Hodgkin y leucemia (Greenlee y col., *CA Cancer J. Clin.*, 50: 7-33 (2000)). En consecuencia, existe una necesidad insatisfecha de tratamientos adicionales para el cáncer, particularmente para neoplasias malignas hematológicas. James y col., *J. Immunol.*, 180 (10): 7028-38 (2008) desvelan dos TCR (Receptores de Linfocitos T, por las siglas del inglés *T cell receptor*) quiméricos específicos de CD22 que constan de un módulo de reconocimiento antigénico de fragmento variable monocatenario (scFv, *single chain Fv*), un espaciador Fc de IgG1, el dominio transmembrana CD4 y, como transductor de señal, el dominio citoplasmático CD3ζ. Las secuencias del fragmento scFv se obtuvieron de los anticuerpos monoclonales (mAb, *monoclonal antibodies*) específicos de CD22, RFB4 y HD39.

Breve resumen de la invención

15 La invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR, por las siglas del inglés *Chimeric Antigen Receptor*) que comprende un dominio de unión a antígeno de HA22, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de linfocito T; en el que el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 1, en el que el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 3.

Otras realizaciones de la invención proporcionan ácidos nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células, y composiciones farmacéuticas relacionadas con los CAR de la invención.

25 Las realizaciones adicionales de la invención proporcionan procedimientos para detectar la presencia de cáncer en un mamífero y procedimientos para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero.

Breve descripción de algunas vistas de los dibujos

30 La Figura 1 es un gráfico que muestra el % de lisis de células leucémicas marcadas con ⁵¹Cr por linfocitos T humanos efectoras transducidas con uno de los siguientes CAR: HA22 de segunda generación, versión 1 (■, cuadrado negro, SEQ ID NO: 15), HA22 de tercera generación (□, cuadrado blanco, SEQ ID NO: 16), BL22 segunda generación, versión 1 (●, círculo negro, SEQ ID NO: 19), BL22 de tercera generación (○, círculo blanco, SEQ ID NO: 20), HA22-SH de segunda generación, versión 1 (▲, triángulo negro, SEQ ID NO: 17), HA22-SH de tercera generación (△, triángulo blanco, SEQ ID NO: 18), transducción simulada (no transducida, X) o CAR específico de CD19 (*) a diversas relaciones de células efectoras con respecto a células diana (E: D). La relación E: D se muestra en el eje x y en el eje y se muestra el % de lisis de las células diana. La figura ilustra el análisis directo de la línea celular SEM y representa el perfil lítico observado para las otras líneas celulares ensayadas.

35 Las Figuras 2A-2B son gráficos que muestran el porcentaje de lisis de líneas celulares de leucemia diana KOPN8 (A) o NALM6 (B) por células efectoras transducidas con una de tres construcciones CAR diferentes de segunda generación, versión 1 anti CD22: HA22-CH2CH3 (■; cuadrados, SEQ ID NO: 15), BL22-CH2CH3, (▲; triángulo, SEQ ID NO: 19) o HA22-SH (secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina; X, SEQ ID NO: 17) a diversas proporciones entre E:D. Como control se incluyó el CAR anti CD19 (◆; rombo). El eje y indica el porcentaje de lisis de las células diana. El eje x muestra las proporciones entre E: D que se han normalizado según el porcentaje de transducción de cada construcción de CAR individual como se describe en el Ejemplo 4. Las líneas se dibujaron utilizando un ajuste de curva logarítmica en Excel (Microsoft).

45 Las Figuras 3A-3B son gráficos que muestran el porcentaje de lisis de líneas celulares de leucemia diana REH (A) o SEM (B) mediante células efectoras transducidas con una de las tres construcciones CAR diferentes de segunda generación, versión 1, anti CD22: HA22-CH2CH3 (■; cuadrados, SEQ ID NO: 15), BL22-CH2CH3, (▲; triángulo, SEQ ID NO: 19) o HA22-SH (secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina, X, SEQ ID NO: 17) a diversas proporciones entre E:D. Como control se incluyó el CAR anti CD19 (◆; rombo). El eje y indica el porcentaje de lisis de las células diana. El eje x muestra proporciones entre E: D que se han normalizado según el porcentaje de transducción de cada construcción de CAR individual como se describe en el Ejemplo 4. Las líneas se dibujaron utilizando un ajuste de curva logarítmica en Excel (Microsoft).

55 La Figura 4 es un gráfico que muestra el porcentaje de lisis de líneas celulares diana K562 (gris oscuro) REH (negro), SEM (blanco) o NALM6 (gris claro) por linfocitos T efectoras transducidas con un vector retroviral que expresa una de diversas construcciones CAR: HA 2ND (SEQ ID NO: 15); HA 3RD (SEQ ID NO: 16); HASH 2ND (SEQ ID NO: 17) o HASH 3RD (SEQ ID NO: 18). El eje x describe cada una de las poblaciones de células transfectadas que se somete a ensayo. Simulación: linfocitos T que se activaron y cultivaron como los otros grupos, pero que no se expusieron a sobrenadante retroviral (s/n) que contenía el vector CAR (no

transducido). Como control se utilizó el CAR anti CD19.

Las Figuras 5 A y 5B son gráficos que muestran el porcentaje de lisis de líneas celulares diana de leucemia que expresan CD22, REH (rombos), SEM (cuadrados), NALM6 (triángulos), OPN8 (X), Daudi (círculos), Raji (), o la línea celular diana de control negativo CD22, K562 (*) por linfocitos T efectores no transducidos (A, "simulación") o células efectoras transducidas con CAR HASH22 de segunda generación, versión 1, (SEC ID N°: 17) (B, "HASH 28z") a diversas proporciones entre E: D.

Las Figuras 6A-6D son gráficos que muestran el porcentaje de lisis de líneas celulares diana de leucemia que expresan CD22, REH (A), SEM (B), NALM-6 (C) o KOPN-8 (D) por linfocitos T efectores no transducidos (triángulos, "simulación") o células efectoras transducidas con CAR HA22 de segunda generación, versión 1, (círculos, HA22 28z, SEQ ID NO: 15) o CAR BL22 de segunda generación, versión 1, (cuadrados, BL22 28z, SEQ ID NO: 19) a diversas proporciones entre E: D.

Las Figuras 6E-6H son gráficos que muestran el porcentaje de lisis de líneas celulares diana de leucemia que expresan CD22, REH (E), SEM (F), NALM-6 (G) o KOPN-8 (H) por linfocitos T efectores no transducidos (triángulos, "simulación") o células efectoras transducidas con CAR HA22 de tercera generación (círculos, HA22 28BBz, SEQ ID NO: 16) o CAR BL22 de tercera generación (cuadrados, BL22 28BBz, SEQ ID NO: 20) a diversas proporciones E: D.

Las Figuras 6I-6L son gráficos que muestran el porcentaje de lisis de líneas celulares diana de leucemia que expresan CD22, REH (I), SEM (J), NALM-6 (K) o KOPN-8 (L) por linfocitos T efectores no transducidos (triángulos, "simulación") o células efectoras transducidas con CAR HA22 de segunda generación, versión 1, con (círculos, HA22 28z, SEQ ID NO: 15) o sin (cuadrados, HASH22 28z, SEQ ID NO: 17) un dominio CH2CH3, a diversas proporciones entre E: D.

La figura 7A es un gráfico que muestra señales bioluminiscentes (fotones/s/cm²/sr) generado por la reacción de luciferasa (transfectada en células de leucemia, que se inyectaron en ratones) con luciferina que se inyectó en los ratones, medida durante un período de tiempo de 30 días. Los ratones se trataron con linfocitos T de control ("simulación", no transducidos, ▼) o linfocitos T transducidos con CAR HASH22 de segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 17, cuadrados negros), CAR HASH22 de tercera generación (SEQ ID NO: 18, ▲), o CAR HA22SH de segunda generación, versión 2 (SEQ ID NO: 32, cuadrados blancos). Los valores más altos de fotones/s/cm²/sr indican mayor carga tumoral.

La Figura 7B es un gráfico que muestra el porcentaje de supervivencia de ratones tratados con linfocitos T de control ("simulación", no transducidos, círculos) o linfocitos T transducidos con CAR HASH22 de segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 17, cuadrados), CAR HASH22 de tercera generación (SEQ ID NO: 18, Δ), o HA22SH de segunda generación, versión 2 (SEQ ID NO: 32, ▽) durante 30 días. (Simulado frente a HA22SH 28z, p=0,001; simulado frente a HA22SH 28BBz, p=0,004; simulado frente a HA22SHBBz, p=0,001; HA22SH 28Z frente a HA22SH 28 BBz, p = 0,03, HA22SH 28z frente a HA22SH BBz, no significativo).

Las Figuras 8A-8D son gráficos que muestran unidades líticas calculadas como se describe en el Ejemplo 4 para células efectoras transducidas con uno de HA22 28z (SEQ ID NO: 15), HA22 28BBz (SEQ ID NO: 16), BL22 28z (SEQ ID NO: 19), BL22 28BBz (SEC ID N°: 20), HASH22 28z (SEC ID N°: 17), o HASH22 28BBz (SEC ID N°: 18) después de cultivo conjunto con las células diana REH (A), SEM (B), NALM-6 (C) o KOPN-8 (D).

Las Figuras 9A-9C son gráficos que muestran las cantidades de interferón (IFN)-γ (pg/ml) secretadas por linfocitos T que no se han transducido (simulación) o que se han transducido con uno de los siguientes CAR: HASH22 de segunda generación, versión 1 (HA22SH-28Z), HASH22 de segunda generación, versión 2 (HA22SH-BBZ) o HASH22 de tercera generación (HA22SH-28BBZ), anti CD19, después de cultivo conjunto con las líneas celulares de leucemia NALM6-GL (CD221ow) (A), Raji (CD22hi) (B) o K562 (CD22 negativo) (C).

Las Figuras 9D-9F son gráficos que muestran las cantidades de interleucina (IL)-2 (pg/ml) secretadas por linfocitos T que no se han transducido (simulación) o que se han transducido con uno de los siguientes CAR: HASH22 de segunda generación, versión 1, HASH22 de segunda generación, versión 2, o HASH22 de tercera generación, anti CD1, después de cultivo conjunto con las líneas celulares de leucemia NALM6-GL (CD221ow) (A), Raji (CD22hi) (B) o K562 (CD22 negativo) (C).

Las Figuras 9G-9I son gráficos que muestran las cantidades de factor de necrosis tumoral (TNF)-α (pg/ml) secretadas por linfocitos T que no se han transducido (simulación) o que se han transducido con uno de los siguientes CAR: HASH22 de segunda generación, versión 1, HASH22 de segunda generación, versión 2, o HASH22 de tercera generación, anti CD19, después de cultivo conjunto con las líneas celulares de leucemia NALM6-GL (CD221ow) (A), Raji (CD22hi) (B) o K562 (CD22 negativo) (C).

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona las siguientes realizaciones definidas en los apartados 1-21:

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno de HA22, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T, en el que el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1, en el que el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 3.
2. El CAR de acuerdo con el apartado 1, en el que el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 5.

3. El CAR de acuerdo con el apartado 1 o 2, que comprende adicionalmente una secuencia líder que comprende la SEQ ID NO: 7.
4. El CAR de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-3, que comprende adicionalmente un dominio de inmunoglobulina.
5. El CAR de acuerdo con el apartado 4, en el que el dominio de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 8, 9 o 36.
6. El CAR de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-5, en el que el dominio transmembrana comprende i) CD8 y o ii) CD28.
7. El CAR de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-6, en el que el dominio transmembrana comprende a) una secuencia de aminoácidos CD8 que comprende la SEQ ID NO: 10 o 33 y/o b) una secuencia de aminoácidos CD28 que comprende la SEQ ID NO: 11.
8. El CAR de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-7, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T comprende uno o más de i) CD28, ii) CD137 y iii) CD3 zeta.
9. El CAR de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-8, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T comprende una secuencia de aminoácidos CD28 que comprende la SEQ ID NO: 12.
10. El CAR de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-9, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T comprende una secuencia de aminoácidos CD137 que comprende la SEQ ID NO: 13 o 34.
11. El CAR de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-10, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T comprende una secuencia de aminoácidos CD3 zeta que comprende la SEQ ID NO: 14 o 35.
12. El CAR de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-8 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una cualquiera de SEQ ID NO: 15-18 y 32.
13. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el CAR de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1-12.
14. El ácido nucleico de acuerdo con el apartado 13, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21-23 y 38.
15. El ácido nucleico de acuerdo con el apartado 14, que comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 24-25 y 39.
16. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de los apartados 13-15.
17. Una célula hospedadora aislada que comprende el vector de expresión recombinante del apartado 16.
18. Una población de células que comprende al menos una célula hospedadora del apartado 17.
19. Una composición farmacéutica que comprende el CAR de uno cualquiera de los apartados 1-12, el ácido nucleico de uno cualquiera de los apartados 13-15, el vector de expresión recombinante del apartado 16, la célula hospedadora del apartado 17, o la población de células del apartado 18, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
20. Un procedimiento para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra que comprenda una o más células del mamífero con el CAR de uno cualquiera de los apartados 1-12, formando de ese modo un complejo, y
- (b) detectar el complejo, indicando la detección del complejo la presencia de cáncer en el mamífero.

21. El CAR de uno cualquiera de los apartados 1-12, el ácido nucleico de uno cualquiera de los apartados 13-15, el vector de expresión recombinante del apartado 16, la célula hospedadora del apartado 17, la población de células del apartado 18, o la composición farmacéutica del apartado 19, para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer en un mamífero que expresa CD22.

- 45 En el presente documento se desvelan receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden: a) un dominio de unión a antígeno de HA22, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T; o b) un dominio de unión a antígeno de BL22, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende i) CD28 y / o ii) CD137.

50 Un receptor de antígeno quimérico (CAR) es una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene los dominios de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, fragmento variable monocatenario (scFv)) unido a dominios de señalización de linfocitos T. Las características de los CAR incluyen su capacidad para redirigir la especificidad y reactividad de los linfocitos T hacia una diana seleccionada de una manera no restringida por MHC, aprovechando las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos monoclonales. El reconocimiento del antígeno no restringido por MHC otorga a los linfocitos T que expresan los CAR, la capacidad de reconocer el antígeno independientemente del procesamiento del antígeno, evitando así un mecanismo principal de escape del tumor. Además, como ventaja, cuando se expresan en linfocitos T, los CAR no forman dímeros con las cadenas alfa y beta del receptor de linfocitos T (TCR) endógeno.

60 Las frases "tiene especificidad antigénica" y "provoca una respuesta específica de antígeno" como se usan en el presente documento, significan que el CAR puede unirse específicamente a, y reconocer inmunológicamente, un antígeno, de tal manera que la unión del CAR con el antígeno provoca una respuesta inmunitaria.

Los CAR de la invención tienen especificidad antigénica por CD22. CD22 es un antígeno de linfocitos B restringido

por linaje que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig). CD22 se expresa en el 60-70% de los linfomas y leucemias de linfocitos B (p. ej., leucemia linfocítica crónica B, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt) y no está presente en la superficie celular en etapas tempranas del desarrollo de linfocitos B o en células madre. Vaickus y col., Crit. Rev. Oncol./Hematol., 1 1: 267 - 297 (1991); Bang y col., Clin. Cancer Res., 11: 1545 - 50 (2005).

Sin estar ligado a una teoría o mecanismo particular, se cree que al provocar una respuesta específica de antígeno anti CD22, los CAR de la invención proporcionan uno o más de lo siguiente: dirigirse y destruir células cancerosas que expresan CD22, reducir o eliminar células cancerosas, facilitar la infiltración de células inmunitarias al sitio (o sitios) tumoral(es) y mejorar/ampliar las respuestas contra el cáncer. Debido a que el CD22 no se expresa en etapas tempranas del desarrollo de linfocitos B o en células madre, se contempla que los CAR de la invención impidan de forma ventajosa y sustancialmente, el direccionamiento/destrucción de células madre y/o linfocitos B en los primeros estadios del desarrollo.

La divulgación proporciona un CAR que comprende un dominio de unión a antígeno de las inmunotoxinas HA22 o BL22. Las inmunotoxinas BL22 y HA22 son agentes terapéuticos que comprenden un scFv específico para CD22 fusionado a una toxina bacteriana. La inmunotoxina se une a la superficie de las células cancerosas y produce la muerte de las mismas. BL22 comprende un fragmento variable monocatenario estabilizado con disulfuro (dsFv) de un anticuerpo anti CD22, RFB4, fusionado a una forma truncada de 38 kDa de la exotoxina A de *Pseudomonas* (Bang y col., Clin. Cancer Res., 1 1: 1545-50 (2005)). HA22 (CAT8015, moxetumomab pasudotox) es una versión mutada, de mayor afinidad, de BL22 (Ho y col., J. Biol. Chem., 280 (1): 607-17 (2005)).

Los dominios de unión a antígeno de HA22 y BL22 se unen específicamente a CD22. Por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 7.541.034; 7.355.012 y 7.982.011, incorporadas en el presente documento como referencia en su totalidad, se desvelan secuencias adecuadas de dominios de unión a antígeno de HA22 y BL22. A este respecto, una realización preferida de la invención proporciona CAR que comprenden un dominio de unión a antígeno que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en, un fragmento variable monocatenario (scFv) del dominio de unión a antígeno de HA22 o BL22.

Cada uno de los dominios de unión a antígeno de HA22 y BL22 comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. La región variable de cadena ligera de HA22 o BL22 puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la SEQ ID NO: 1 o 2, respectivamente. La región variable de cadena pesada de HA22 o BL22 puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, la SEQ ID NO: 3 o 4, respectivamente. Por consiguiente, el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 1 o 2 y/o una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 3 o 4.

La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada pueden unirse mediante un enlazador. El enlazador puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos adecuada. El enlazador puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en la SEQ ID NO: 37.

El dominio de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. A este respecto, los dominios de unión a antígeno HA22 o BL22, comprendiendo cada uno una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, consisten en, o consisten esencialmente en, la SEC ID N°: 5 o 6, respectivamente.

El dominio de unión a antígeno comprende una secuencia líder. La secuencia líder puede posicionarse en el extremo amino de la región variable de la cadena ligera. La secuencia líder puede comprender cualquier secuencia líder adecuada. En una realización, la secuencia líder es una secuencia del receptor del factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) humanos. A este respecto, el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia líder que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 7. En una realización de la invención, mientras que la secuencia líder puede facilitar la expresión del CAR en la superficie de la célula, la presencia de la secuencia líder en un CAR expresado no es necesaria para que el CAR funcione. En una realización de la invención, tras la expresión del CAR en la superficie celular, la secuencia líder puede escindirse del CAR. Por consiguiente, en una realización de la invención, el CAR carece de una secuencia líder.

En una realización, el CAR comprende un dominio de inmunoglobulina. Preferiblemente, el dominio de inmunoglobulina es una secuencia de inmunoglobulina humana. En una realización, el dominio de inmunoglobulina comprende una secuencia de dominio de inmunoglobulina G (IgG1) CH2 y CH3 (CH2CH3). A este respecto, el CAR comprende un dominio de inmunoglobulina que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, la SEQ ID NO: 8. En una realización de la invención, el dominio de inmunoglobulina puede comprender una secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina. A este respecto, el CAR comprende un dominio de inmunoglobulina que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 9 o 36. Sin estar ligado a una teoría particular, se cree que el dominio CH2CH3 extiende el motivo de unión del scFv lejos de la membrana de las células que expresan CAR y pueden imitar con mayor precisión el tamaño y la estructura de dominio de un TCR nativo.

En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana. En una realización de la invención, el dominio transmembrana comprende i) CD8 y/o ii) CD28. En una realización preferida, CD8 y CD28 son

humanos. El CD8 o el CD28 pueden comprender menos que el total de CD8 o CD28, respectivamente. A este respecto, el CAR comprende a) un dominio transmembrana CD8 que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 10 o 33 y/o b) un dominio transmembrana CD28 que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 11.

5 En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende uno o más de i) CD28, ii) CD 137 y iii) CD3 zeta (ζ). En una realización preferida, el uno o más de CD28, CD137 y CD3 zeta son humanos. CD28 es un marcador de linfocitos T importante en la estimulación conjunta de linfocitos T. CD 137, también conocido como 4-1BB, transmite una fuerte señal coestimuladora a las linfocitos T, promoviendo la diferenciación y mejorando la supervivencia prolongada de los linfocitos T. CD3 ζ se asocia al TCR para producir una señal y contiene motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptora (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based motifs*). Uno o más de CD28, CD137 y CD3 zeta pueden comprender menos que la totalidad de CD28, CD137 o CD3 zeta, respectivamente. A este respecto, el dominio de señalización intracelular de linfocitos T comprende una o más de una secuencia de aminoácidos CD28 que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, la SEQ ID NO: 12; una secuencia de aminoácidos de CD137 que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 13 o 34; y/o una secuencia de aminoácidos CD3 zeta que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en las SEQ ID NO: 14 o 35.

En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana que comprende CD28 y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD28 y CD3 zeta. A este respecto, el CAR puede comprender cada una de las SEQ ID NO: 11, 12 y 14. Preferiblemente, el CAR comprende a) cada una de las SEQ ID NO: 1, 3, 8, 11, 12 y 14; b) cada una de las SEQ ID NO: 2, 4, 8, 11, 12 y 14; o c) cada una de las SEQ ID NO: 1, 3, 9, 11, 12 y 14.

En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana que comprende CD8 y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD28, CD137 y CD3 zeta. A este respecto, el CAR puede comprender cada una de las SEQ ID NO: 10, 12, 13 y 14. Preferiblemente, el CAR comprende a) cada una de las SEQ ID NO: 1, 3, 8, 10, 12, 13 y 14; b) cada una de las SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 13 y 14; o c) cada una de las SEQ ID NO: 1, 3, 9, 10, 12, 13 y 14.

En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana que comprende CD8 y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD137 y CD3 zeta. A este respecto, el CAR puede comprender cada una de las SEQ ID NO: 33-35. Preferiblemente, el CAR comprende cada una de las SEQ ID NO: 1, 3 y 33-36.

Las realizaciones adicionales de las divulgaciones proporcionan CAR que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en, cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en la Tabla 1.

TABLA 1

SEQ ID NO:	Dominio de unión a antígeno	Componentes adicionales
SEQ ID NO: 15 (HA22CAR de segunda generación, versión 1)	HA22	- CH2CH3 - dominio transmembrana CD28 - dominios de señalización intracelular de linfocitos T, CD28 y CD3 ζ
SEQ ID NO: 16 (CAR HA22 de tercera generación)	HA22	- CH2CH3 - dominio transmembrana CD8 - dominios de señalización intracelular de linfocitos T, CD28, CD137 y CD3 ζ
SEQ ID NO: 17 (CAR HASH22 de segunda generación, versión 1)	HA22	- secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina - dominio transmembrana CD28 - dominios de señalización intracelular de linfocitos T, CD28 y CD3 ζ

(continuación)

SEQ ID NO:	Dominio de unión a antígeno	Componentes adicionales
SEQ ID NO: 18 (CARHASH22 de tercera generación)	HA22	- secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina - dominio transmembrana CD28 - dominios de señalización intracelular de linfocitos T, CD28, CD137 y CD3ζ
SEQ ID NO: 19 (CARBL22 de segunda generación, versión 1)	BL22	- CH2CH3 - dominio transmembrana CD28 - dominios de señalización intracelular de linfocitos T, CD28 y CD3ζ
SEQ ID NO: 20 (CARBL22 de tercera generación)	BL22	-CH2CH3 - dominio transmembrana CD8 - dominios de señalización intracelular de linfocitos T, CD28, CD137 y CD3ζ
SEQ ID NO: 32 (CARHASH22 de segunda generación, versión 2)	HA22	- dominio transmembrana CD28 - dominios de señalización intracelular de linfocitos T, CD137 y CD3ζ

Adicionalmente, en el presente documento se describen parte funcionales de los CAR de la invención. La expresión "parte funcional", cuando se usa en referencia a un CAR, se refiere a cualquier parte o fragmento del CAR de la invención, cuya parte o fragmento conserva la actividad biológica del CAR del cual es parte (CAR parental). Las partes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un CAR que conservan la capacidad de reconocer células diana, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, en un grado similar, en el mismo grado, o en mayor grado, que el CAR parental. Con referencia al CAR parental, la parte funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente el 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% o más, del CAR parental.

La parte funcional puede comprender aminoácidos adicionales en su extremo amino o carboxilo, o en ambos extremos, cuyos aminoácidos adicionales no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del CAR parental. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la parte funcional, por ejemplo, reconocen células diana, detectan cáncer, tratan o previenen cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del CAR parental.

Adicionalmente, en el presente documento se desvelan variantes funcionales de los CAR de la invención descritos en el presente documento. La expresión "variante funcional" como se usa en el presente documento se refiere a un CAR, polipéptido o proteína que tiene identidad de secuencia o similitud sustancial o significativa con un CAR parental, cuya variante funcional conserva la actividad biológica del CAR del cual es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del CAR descritas en el presente documento (CAR parental) que conservan la capacidad de reconocer células diana en un grado similar, en el mismo grado, o en mayor grado, que el CAR parental. Con referencia al CAR parental, la variante funcional puede tener una identidad, por ejemplo, de al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 50%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más, con la secuencia de aminoácidos del CAR parental

Una variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución de aminoácidos conservativa. De manera alternativa o adicional, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución de aminoácidos no conservativa. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácidos no conservativa no interfiera o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. La sustitución de aminoácidos no conservativa puede potenciar la actividad biológica de la variante funcional, de modo que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con la del CAR parental.

Las sustituciones de aminoácidos de los CAR de la invención son preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son conocidas en la técnica, e incluyen sustituciones de aminoácidos en las que un aminoácido que tiene ciertas propiedades físicas y/o químicas se intercambia por otro aminoácido que tiene las mismas o similares propiedades químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos conservativa puede ser un aminoácido polar ácido con carga negativa sustituido por otro aminoácido polar ácido con carga negativa (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, He, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val, etc.), un aminoácido polar básico con carga negativa sustituido por otro aminoácido polar básico con carga negativa (por ejemplo, Lys, His, Arg, etc.), un aminoácido no cargado con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido no cargado con una cadena lateral polar (por ejemplo, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), un aminoácido con una cadena lateral beta ramificada sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral beta ramificada (por ejemplo, Ile, Thr y Val), un aminoácido con una cadena lateral aromática sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral aromática (por ejemplo, His, Phe, Trp y Tyr), etc.

El CAR puede consistir esencialmente en la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas descritas en el presente documento, de modo que otros componentes, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambian materialmente la actividad biológica de la variante funcional.

Los CAR de realizaciones de la invención (incluyendo partes funcionales y variantes funcionales) pueden tener cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los CAR (o partes funcionales o variantes funcionales de los mismos) conserven su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente al antígeno, detectar células enfermas en un mamífero, o tratar o prevenir la enfermedad en un mamífero, etc. Por ejemplo, el CAR puede tener una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos, tal como una longitud de 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos.

Los CAR de las realizaciones de la invención (incluyendo partes funcionales y variantes funcionales de la invención) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos de origen natural. Dichos aminoácidos sintéticos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido amino ciclohexano carboxílico, norleucina, α aminoácido n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxi prolina, 4 - aminofenilalanina, 4- nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina, β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, ácido aminomalónico monoamida, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentano carboxílico, ácido α -aminociclohexano carboxílico, ácido α -aminocicloheptano carboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido α , β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -terc-butilglicina.

Los CAR de las realizaciones de la invención (incluyendo partes funcionales y variantes funcionales) pueden glucosilarse, amidarse, carboxilarse, fosforilarse, esterificarse, N-acilarse, ciclarse, por ejemplo, a través de un puente disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

Los CAR de las realizaciones de la invención (incluyendo partes funcionales y sus variantes funcionales) pueden obtenerse por procedimientos conocidos en la técnica. Los CAR pueden prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado para fabricar polipéptidos o proteínas. Se describen procedimientos adecuados de síntesis *de novo* de polipéptidos y proteínas en referencias, tales como Chan y col., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood y col., Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2001; y en la Patente de Estados Unidos 5.449.752. Además, los polipéptidos y las proteínas se pueden producir de forma recombinante utilizando los ácidos nucleicos descritos en este documento utilizando procedimientos recombinantes convencionales. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ªed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. Además, algunos de los CAR de la invención (incluyendo partes funcionales y sus variantes funcionales) pueden aislarse y/o purificarse de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto, un mamífero, por ejemplo, una rata, un ser humano, etc. Los procedimientos de aislamiento y purificación son muy conocidos en la técnica. Como alternativa, los CAR descritos en este documento (incluyendo partes funcionales y sus variantes funcionales) pueden sintetizarse desde el punto de vista comercial en compañías tales como Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). A este respecto, los CAR de la invención pueden ser sintéticos, recombinantes, pueden aislarse y/o purificarse.

La divulgación proporciona además un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo de los CAR de la invención. El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina que sea conocido en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, etc. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de origen natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y/o purificado de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. Como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado por ingeniería

genética, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede estar en forma monomérica o polimérica. Además, el anticuerpo puede tener cualquier nivel de afinidad o avidéz por la parte funcional del CAR de la invención.

5 Los procedimientos para analizar la capacidad de los anticuerpos para unirse a cualquier parte funcional de los CAR de la invención son conocidos en la técnica e incluyen cualquier ensayo de unión entre un anticuerpo y un antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, transferencia de Western, inmunoprecipitación, y ensayos de inhibición competitiva (véase, por ejemplo, Janeway y col., citados más adelante, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2002/0197266 A1).

10 En la técnica se conocen procedimientos adecuados para producir anticuerpos. Por ejemplo, en Köhler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 51 - 1-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), y en CA Janeway y col. (eds.), *Immunobiology*, 5ª ed., Garland Publishing, Nueva York, NY (2001)), se describen procedimientos convencionales de hibridoma. Como alternativa, en la técnica se conocen otros procedimientos, tales como los procedimientos de EBV-hibridoma (Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74 (2), 361 -67 (1984), y Roder y col., *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), y los sistemas de expresión de vector bacteriófago (véase, por ejemplo, Huse y col., *Science*, 246, 1275-81 (1989)). Además, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352 y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0197266 A1, se describen procedimientos para producir anticuerpos en animales no humanos.

15 Adicionalmente, para generar un anticuerpo puede utilizarse la presentación en fagos. A este respecto, pueden generarse fagotecas que codifican dominios variables (V) de unión a antígeno de anticuerpos utilizando técnicas estándar de biología molecular y ADN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook y col., y Ausubel y col., ambos citados anteriormente). Los fagos que codifican una región variable con la especificidad deseada se seleccionan para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo reconstituido se introducen en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma utilizada para la producción de hibridoma, de modo que los anticuerpos que tienen las características de anticuerpos monoclonales son secretados por la célula (véase, por ejemplo, Janeway y col., y Huse y col., ambos citados anteriormente, y la Patente de Estados Unidos 6.265.150).

20 Los anticuerpos pueden producirse a través de ratones transgénicos que son transgénicos para genes específicos de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera. Dichos procedimientos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.545.806 y 5.569.825, y en Janeway y col., citados anteriormente.

25 En la técnica se conocen bien procedimientos para generar anticuerpos humanizados y se describen con detalle, por ejemplo, en Janeway y col., citados anteriormente, en las Patentes de Estados Unidos 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, Patente Europea No. 0239400 B1 y Patente del Reino Unido N° 2188638. También se pueden generar anticuerpos humanizados utilizando la tecnología de recubrimiento de anticuerpos descrita en la patente de Estados Unidos 5.639.641 y en Pedersen y col., *J. Mol. Biol.*, 235, 959 - 973 (1994).

30 La divulgación también proporciona partes de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento. La parte de unión a antígeno puede ser cualquier parte que tenga al menos un sitio de unión a antígeno, tal como Fab, F (ab)₂, dsFv, sFv, diacuerpos y triacuerpos.

35 Un fragmento de anticuerpo del fragmento monocatenario (sFv) de la región variable, que es un fragmento Fab truncado que incluye el dominio variable (V) de una cadena pesada de anticuerpo unida a un dominio V de una cadena ligera de anticuerpo a través de un péptido sintético, puede generarse utilizando técnicas habituales de tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Janeway y col., citados anteriormente). De forma similar, pueden prepararse fragmentos de región variable estabilizados con disulfuro (dsFv) mediante tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Reiter y col., *Protein Engineering*, 7, 697-704 (1994)). Sin embargo, los fragmentos de anticuerpos de la invención, no están limitados a estos tipos ejemplares de fragmentos de anticuerpos.

40 Además, el anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, se puede modificar para que comprenda un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (p. ej., partículas de oro).

45 Además, en una realización de la invención se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los CAR de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las secuencias líder, dominios de unión a antígeno, dominios de inmunoglobulina, dominios transmembrana, y/o dominios de señalización intracelular de linfocitos T descritos en este documento.

55 La divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno de BL22 o HA22 (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada) y CH2CH3. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir

5 en, o consistir esencialmente en la SEQ ID NO: 21 o 22, respectivamente. Otra realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno de HA22 (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada) y una secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en la SEQ ID NO: 23 o 38.

10 Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los dominios transmembrana y/o dominios de señalización intracelular de linfocitos T descritos en el presente documento. Una realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana que comprende CD28, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD28, y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD3ζ. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 24. Otra realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana que comprende CD8, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD28, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD137, y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD3ζ. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 25. Otra realización más de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana que comprende CD8, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD137, y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD3ζ. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 39.

20 Preferiblemente, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno de BL22 o HA22 (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada), CH2CH3, un dominio transmembrana que comprende CD28, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD28, y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD3ζ. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, las dos SEQ ID NO: 21 y 24 o las dos SEQ ID NO: 22 y 24.

30 Preferiblemente, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno de HA22 (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada), una secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina, un dominio transmembrana que comprende CD28, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD28, y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD3ζ. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en las dos SEQ ID NO: 23 y 24.

35 Preferiblemente, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno de HA22 (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada), CH2CH3, un dominio transmembrana que comprende CD8, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD28, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD137, y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD3ζ. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, las dos SEQ ID NO: 21 y 25 o las dos SEQ ID NO: 22 y 25.

40 En otra realización preferida, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno de HA22 (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada), una secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina, un dominio transmembrana que comprende CD8, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD28, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD137, y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD3ζ. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, las dos SEQ ID NO: 23 y 25.

50 En otra realización preferida adicional, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un dominio de unión a antígeno de HA22 (que incluye una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada), una secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina, un dominio transmembrana que comprende CD8, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD137, y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T que comprende CD3ζ. A este respecto, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en, las dos SEQ ID NO: 38 y 39.

55 "Ácido nucleico" como se usa en este documento incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y / o purificado) de fuentes naturales, que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que pueden contener un enlace internucleotídico natural, no natural o alterado, tal como un enlace de fosforoamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. Sin embargo, en algunos casos, puede ser adecuado, como se indica en el presente documento, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, deleciones, inversiones y/o sustituciones. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede codificar secuencias de aminoácidos adicionales que no afectan a la función del CAR y que pueden o no traducirse después de la expresión del ácido nucleico por

60

una célula hospedadora (por ejemplo, SEQ ID NO: 31).

Los ácidos nucleicos de una realización de la invención pueden ser recombinantes. Como se usa en este documento, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de las células vivas uniendo segmentos de ácido nucleico naturales o sintéticos con moléculas de ácido nucleico que pueden replicarse en una célula viva, o (ii) moléculas resultantes de la replicación de las descritas anteriormente en (i). Para los fines del presente documento, la replicación puede ser una replicación *in vitro* o una replicación *in vivo*.

Un ácido nucleico recombinante puede ser uno que tiene una secuencia que no se produce de forma natural o que tiene una secuencia que se obtiene mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otro modo. Esta combinación artificial a menudo se realiza mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética, tales como las descritas en Sambrook y col., citado anteriormente. Los ácidos nucleicos pueden construirse basándose en síntesis química y/o en reacciones de ligamiento enzimático utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., y Ausubel y col., ambos citados anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados diversamente diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforitoato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina N⁶ sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metilester del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, es posible adquirir uno o más de los ácidos nucleicos de la invención en compañías, tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos aislada o purificada que codifique cualquiera de los CAR o sus partes funcionales o variantes funcionales. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender una secuencia de nucleótidos que esté degenerada en cualquiera de las secuencias o en una combinación de secuencias degeneradas.

La divulgación también proporciona un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en este documento.

La secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas puede hibridarse en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" se entiende que la secuencia de nucleótidos se hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en este documento) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que la hibridación no específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o una que contiene solo unos pocos emparejamientos erróneos dispersos de una secuencia aleatoria que tenía pocas regiones pequeñas (p. ej., 3-10 bases) que coincidían con la secuencia de nucleótidos. Dichas regiones pequeñas de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 bases o más, y la hibridación de alta rigurosidad las hace fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigurosidad relativamente altas incluirían, por ejemplo, condiciones de baja salinidad y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por NaCl a aproximadamente 0,02-0,1 M o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70°C. Dichas condiciones de alta rigurosidad toleran pocos, si es que hubiese alguno, emparejamiento erróneo entre la secuencia de nucleótidos y el molde o cadena diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los CAR de la invención. En general, se aprecia que las condiciones pueden volverse más rigurosas a través de la adición de cantidades en aumento de formamida.

La divulgación también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 70% o más, por ejemplo, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99%, idéntica a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en este documento.

En una realización, los ácidos nucleicos de la invención pueden incorporarse en un vector de expresión recombinante. A este respecto, una realización de la invención proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención. Para los fines del presente documento, la expresión "vector de expresión recombinante" significa una construcción de oligonucleótidos o polinucleótidos modificada por ingeniería genética, que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por una

célula hospedadora, cuando la construcción comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, la proteína, el polipéptido o el péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para que el ARNm, la proteína, el polipéptido o el péptido se expresen en la célula. En conjunto, los vectores de la invención no son de origen natural. Sin embargo, partes de los vectores pueden ser de origen natural. Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a, ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, sintéticos u obtenerse en parte de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleotídicos de origen natural o no natural, o ambos tipos de enlaces. Preferiblemente, los enlaces nucleotídicos o internucleotídicos de origen no natural o alterados no obstaculizan la transcripción o replicación del vector.

En una realización, el vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede utilizarse para transformar o transfectar cualquier célula hospedadora adecuada. Los vectores adecuados incluyen los diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambas cosas, tales como plásmidos y virus. El vector puede seleccionarse del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También pueden utilizarse vectores de bacteriófagos, tales como λ Gt10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBI10, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión de animales incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector vírico, por ejemplo, un vector retrovírico.

En la materia se conocen en general diversas técnicas de transfección (véase, por ejemplo, Graham y col., *Virology*, 52: 456-467 (1973); Sambrook y col., citado anteriormente; Davis y col., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986), y Chu y col., *Gene*, 13: 97 (1981)). Los procedimientos de transfección incluyen coprecipitación con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, Graham y col., citados anteriormente), microinyección directa en células cultivadas (véase, por ejemplo, Capecchi, *Cell*, 22: 479-488 (1980)), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y col., *BioTechniques*, 6: 742-751 (1988)), transferencia de genes a través de liposomas (véase, por ejemplo, Mannino y col., *BioTechniques*, 6: 682-690 (1988)), transducción a través de lípidos (véase, por ejemplo, Felgner y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 7413-7417 (1987)), y suministro de ácido nucleico utilizando microproyectiles de alta velocidad (véase, por ejemplo, Klein y col., *Nature*, 327: 70 - 73 (1987)).

En una realización, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden prepararse utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante descritas, por ejemplo, en Sambrook y col. y en Ausubel y col., ambos citados anteriormente. Pueden prepararse construcciones de vectores de expresión, que son circulares o lineales, para que contengan un sistema de replicación funcional en una célula hospedadora procarionta o eucariota. Los sistemas de replicación pueden proceder, por ejemplo, del plásmido ColEI, 2μ , λ , SV40, virus del papiloma bovino, y similares.

El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos del tipo de célula hospedadora (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en la que se va a introducir el vector, según corresponda, y teniendo en cuenta si el vector es un vector basado en ADN o en ARN. Los ejemplos de secuencias que incluyen codones de terminación incluyen las SEQ ID NO: 29 y 30. El vector de expresión recombinante puede comprender sitios de restricción para facilitar la clonación. Los ejemplos de secuencias que incluyen sitios de restricción incluyen las SEQ ID NO: 26-28.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de células hospedadoras transformadas o transfectadas. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un hospedador auxótrofo para proporcionar prototrofia y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR (incluyendo sus partes funcionales y variantes funcionales), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a, se hibrida con, la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. La selección de promotores, por ejemplo, fuerte, débil, inducible, específica de tejido y específica de desarrollo, se incluye en experiencia del técnico habitual. De forma similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está incluida en la experiencia del técnico habitual en la materia. El promotor puede ser un promotor no vírico o un promotor vírico, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV o un promotor encontrado en la repetición larga terminal del virus de células madre murinas.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para expresión transitoria, expresión estable, o para ambas. Además, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse para la expresión constitutiva o inducible.

Adicionalmente, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse para que incluyan un gen

suicida. Como se usa en el presente documento, la expresión "gen suicida" se refiere a un gen que causa la muerte de la célula que expresa el gen suicida. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo, un fármaco, sobre la célula en la que se expresa el gen, y hace que la célula muera cuando dicha célula entra en contacto o se expone al agente. Los genes suicidas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) y se incluyen, por ejemplo, el gen de timidina cinasa (TK) del herpesvirus simple (HSV), citosina daminasa, purina nucleósido fosforilasa y nitrorreductasa.

Adicionalmente, en el presente documento se desvelan conjugados, por ejemplo, bioconjugados, que comprenden cualquiera de los CAR de la invención (incluyendo cualquiera de sus partes funcionales o variantes), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células hospedadoras, o anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos. En la técnica se conocen, en general, conjugados así como los procedimientos de síntesis de los mismos (véase, por ejemplo, Hudecz, F., Methods Mol. Biol. 298: 209-223 (2005) y Kirin y col., Inorg Chem. 44 (15): 5405 - 5415 (2005)).

Una realización de la invención proporciona además una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en este documento. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula hospedadora" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota, por ejemplo, vegetal, animal, fúngica, o de alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, de una bacteria o protozoo. La célula hospedadora puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, de un ser humano. La célula hospedadora puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células hospedadoras adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, células DH5 α de *E. coli*, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. Con el fin de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula hospedadora puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5 α . Para producir un CAR recombinante, la célula hospedadora puede ser una célula de mamífero. La célula hospedadora puede ser una célula humana. Si bien la célula hospedadora puede ser de cualquier tipo celular, puede originarse de cualquier tipo de tejido y puede ser de cualquier estadio de desarrollo, la célula hospedadora puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL, *peripheral blood lymphocyte*) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*). La célula hospedadora puede ser un linfocito T.

Para los fines del presente documento, el linfocito T puede ser cualquier linfocito T, tal como un linfocito T cultivado, por ejemplo, un linfocito T primario, o un linfocito T de una línea de linfocitos T cultivados, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc. o un linfocito T obtenido de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, el linfocito T puede obtenerse de numerosas fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, sangre, médula ósea, ganglio linfático, timo u otros tejidos o fluidos. Los linfocitos T también pueden enriquecerse o purificarse. El linfocito T puede ser un linfocito T humano. El linfocito T puede ser un linfocito T aislada de un ser humano. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede ser de cualquier estadio de desarrollo, que incluye, pero no se limita a, linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ doble positivos, linfocitos T auxiliares CD4⁺, por ejemplo, células Th₁ y Th₂, linfocitos T CD8⁺ (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos), células infiltrantes de tumores, linfocitos T de memoria, linfocitos T vírgenes, y similares. El linfocito T puede ser un linfocito T CD8⁺ o un linfocito T CD4⁺.

También se proporciona mediante una realización de la invención, una población de células que comprende al menos una célula hospedadora descrita en este documento. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo, una célula hospedadora (por ejemplo, un linfocito T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes, o una célula distinta de un linfocito T, por ejemplo, un linfocito B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Como alternativa, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células hospedadoras (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una sola célula hospedadora que comprende un vector de expresión recombinante, de manera que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización de la invención, la población de células es una población clonal que comprende células hospedadoras que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en este documento.

Los CAR (incluyendo sus partes funcionales y variantes), los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras (incluyendo sus poblaciones) y los anticuerpos (incluyendo sus partes de unión a antígeno), que en su conjunto, y en lo sucesivo, reciben el nombre de "materiales CAR de la invención", pueden aislarse y/o purificarse. El término "aislado" como se usa en el presente documento significa que se ha eliminado de su entorno natural. El término "purificado" o "aislado" no requiere pureza absoluta o aislamiento absoluto; más bien se entiende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación de células hospedadoras purificada (o aislada) es aquella en la que la célula hospedadora es más pura que las células en su entorno natural dentro del organismo. Dichas células hospedadoras pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas de purificación convencionales. En algunas realizaciones, una preparación de una célula hospedadora se

purifica de manera que la célula hospedadora represente al menos aproximadamente el 50%, por ejemplo al menos aproximadamente el 70%, del contenido celular total de la preparación. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente 50%, puede ser mayor que aproximadamente 60%, aproximadamente 70% o aproximadamente 80%, o puede ser de aproximadamente 100%.

- 5 Los materiales CAR de la invención pueden formularse en una composición, tal como una composición farmacéutica. A este respecto, una realización de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los CAR, partes funcionales, variantes funcionales, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células hospedadoras (incluyendo sus poblaciones) y anticuerpos (incluyendo partes de unión a antígeno de los mismos), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención que
10 contienen cualquiera de los materiales CAR de la invención pueden comprender más de un material CAR de la invención, por ejemplo, un CAR y un ácido nucleico, o dos o más CAR diferentes. Como alternativa, la composición farmacéutica puede comprender un material CAR de la invención en combinación con otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparraginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. En una realización preferida, la composición farmacéutica
15 comprende la célula hospedadora de la invención o poblaciones de la misma.

- Los materiales CAR de la invención pueden proporcionarse en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen las derivadas de ácidos minerales, tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico, por ejemplo, ácido *p*-toluenosulfónico.
20

- Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el transportador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera de los utilizados convencionalmente y está limitado solo por cuestiones químico-físicas, tales como solubilidad y falta de reactividad con el(los) agente(s) activo(s), y por la vía de administración. Los transportadores farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, son muy conocidos por los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el transportador farmacéuticamente aceptable sea uno que sea inerte desde el punto de vista químico para el (los) agente (s) activo (s) y que no tenga efectos secundarios o toxicidad perjudiciales en las condiciones de uso.
25

- La elección del transportador se determinará en parte por el material CAR particular de la invención, así como por el procedimiento particular utilizado para administrar el material CAR de la invención. Por consiguiente, hay una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Pueden utilizarse conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. Se puede utilizar opcionalmente una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o sus mezclas están presentes típicamente en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 2 % en peso de la composición total.
30
35

- Los agentes tamponadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y varios otros ácidos y sales. Se puede utilizar opcionalmente una mezcla de dos o más agentes tamponadores. El agente tamponador o sus mezclas están presentes típicamente en una cantidad de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 4 % en peso de la composición total.
40

En las formulaciones farmacéuticas, la concentración del material CAR de la invención puede variar, por ejemplo, de menos de aproximadamente 1%, normalmente al 10 %, o al menos aproximadamente al 10%, hasta tanto como aproximadamente del 20% a aproximadamente el 50% o más en peso, y puede seleccionarse principalmente por volúmenes de fluido y viscosidades, de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado.

- 45 Los expertos en la materia conocen, o resulta obvio para ellos, cómo preparar composiciones administrables (por ejemplo, administrables por vía parenteral) y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª ed. (1 de mayo de 2005).

- Las siguientes formulaciones para administración oral, en aerosol, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e intratecal) y tópica son meramente ejemplares y no son de ninguna manera limitantes. Se puede usar más de una vía para administrar los materiales CAR de la invención y, en ciertos casos, una vía particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra.
50

- Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden comprender o consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del material CAR de la invención disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o zumo de naranja; (b) cápsulas, bolsitas, comprimidos, pastillas y trociscos, conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada del principio activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas en cápsulas pueden ser del tipo habitual de gelatina dura o blanda que
55

contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Las formas en comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas en pastilla pueden comprender el material CAR de la invención en un aromatizante, generalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto, así como pastillas que comprenden el material CAR de la invención en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga, emulsiones, geles y similares, que como se sabe en la técnica, contienen adicionalmente dichos excipientes.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. El material CAR de la invención puede administrarse en un diluyente fisiológicamente aceptable en un transportador farmacéutico, tal como un líquido o una mezcla de líquidos estéril(es), incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, un alcohol, tal como etanol o alcohol hexadecílico, un glicol, como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres o glicéridos de ácidos grasos, o glicéridos de ácido graso acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente adecuado, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tal como pectina, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites, que pueden utilizarse en formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina y aceite mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales grasas de metales alcalinos, amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetildialquilamonio y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxietileno y polipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil- β -aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina y (e) mezclas de los mismos.

Las formulaciones parenterales contendrán típicamente, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 25 % en peso del material CAR de la invención en solución. Se pueden utilizar conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, dichas composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen, por ejemplo, un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB, *hydrophile-lipophile balance*) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en dichas formulaciones típicamente variará, por ejemplo, de aproximadamente 5% a aproximadamente 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol, tales como monooleato de sorbitán, y aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales se pueden presentar en recipientes herméticos de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales, y se pueden conservar en un estado criodesecado (liofilizado) que solo requiere la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente.

Las formulaciones inyectables son según una realización de la invención. Los requisitos para los transportadores farmacéuticos eficaces para las composiciones inyectables son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, JB Lippincott Company, Filadelfia, PA, Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982) y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)).

Las formulaciones tópicas, que incluyen las que son útiles para la liberación transdérmica del fármaco, son bien conocidas por los expertos en la técnica y son adecuadas en el contexto de las realizaciones de la invención para su aplicación en la piel. El material CAR de la invención, solo o en combinación con otros componentes adecuados, puede prepararse en formulaciones de aerosol para administrar por inhalación. Estas formulaciones de aerosol pueden colocarse en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También pueden formularse como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tales como en un nebulizador o un atomizador. Dichas formulaciones pulverizadoras también pueden utilizarse para pulverizar la mucosa.

Las expresiones "una cantidad eficaz" o "una cantidad eficaz para tratar", se refieren a una dosis que es adecuada para prevenir o tratar un cáncer en un individuo. Las cantidades eficaces para un uso terapéutico o profiláctico dependerán, por ejemplo, del estadio y la gravedad de la enfermedad o trastorno que vaya a tratarse, de la edad, peso y estado de salud general del paciente, y del criterio del médico que prescribe. El tamaño de la dosis también
5 estará determinado por el procedimiento de administración, el momento y la frecuencia de administración que se seleccionen, por la existencia, la naturaleza y el grado de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un activo particular, y por el efecto fisiológico deseado. Un experto en la materia apreciará que diversas enfermedades o trastornos podrían requerir un tratamiento prolongado que implique administraciones múltiples, tal vez utilizando los materiales CAR de la invención en cada una o en las diversas
10 rondas de administración. Como ejemplo y sin intención de limitar la invención, la dosis del material CAR de la invención puede ser de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto que se está tratando/día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal/día. Cuando el material CAR de la invención es una célula hospedadora, una dosis ejemplar de células hospedadoras puede ser un mínimo de un millón de células (1 mg células/dosis). Cuando el material CAR de la invención es un ácido nucleico empaquetado en un virus, una dosis ejemplar de virus puede ser de 1 ng/dosis.

Para los fines de la invención, la cantidad o dosis administrada del material CAR de la invención debería ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica o profiláctica en el sujeto o animal durante un período de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material CAR de la invención debería ser suficiente para unirse al antígeno, o
20 detectar, tratar o prevenir la enfermedad en un período de aproximadamente 2 horas o más largo, por ejemplo, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas o más, desde el momento de administración. En ciertas realizaciones, el período de tiempo podría ser incluso más largo. La dosis se determinará por la eficacia del material CAR particular de la invención y la condición del animal (por ejemplo, ser humano), así como por el peso corporal del animal (por ejemplo, ser humano) a tratar.

Para los fines de la invención, para determinar una dosis inicial para administrar a un mamífero, podría utilizarse un ensayo, que comprendiese, por ejemplo, comparar el grado en el que se produce la lisis de las células diana y/o se secreta el IFN- γ por los linfocitos T que expresan el CAR de la invención después de la administración de una dosis determinada de dichos linfocitos T a un mamífero, entre un conjunto de mamíferos a los que se les administra una dosis diferente de los linfocitos T. El grado en el que se produce la lisis de las células diana y/o se secreta el IFN- γ
30 después de la administración de una dosis determinada puede analizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Además de las composiciones farmacéuticas anteriormente descritas, los materiales CAR de la invención pueden formularse como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, o liposomas. Los liposomas pueden servir para dirigir los materiales CAR de la invención a un tejido particular. Los liposomas también
35 pueden utilizarse para aumentar la semivida de los materiales CAR de la invención. Hay muchos procedimientos disponibles para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka y col., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980) y en las Patentes de Estados Unidos 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Los sistemas de suministro útiles en el contexto de las realizaciones de la invención pueden incluir sistemas de suministro por liberación temporal, liberación retardada y liberación sostenida, de tal manera que la administración de la composición de la invención se produce antes de, y con tiempo suficiente para, producir la sensibilización del sitio a tratar. La composición de la invención puede utilizarse junto con otros agentes terapéuticos o terapias. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de la composición de la invención, aumentando así la comodidad para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para ciertas realizaciones de composición de la invención.

Se dispone de muchos tipos de sistemas de suministro por liberación y los expertos en la materia conocen dichos sistemas que incluyen sistemas basados en polímeros, tales como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhidridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 5.075.109. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no basados en polímeros que son lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas Silastic; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; comprimidos fabricados por compresión que utilizan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Como ejemplos específicos se incluyen, pero no están limitados a: (a) sistemas erosivos en los que la composición activa está contenida en una forma dentro de una matriz tal como la descrita en las Patentes de Estados Unidos 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas difusionales en los que un componente activo penetra a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 3.832.253 y 3.854.480. Además, se pueden utilizar sistemas de suministro de componentes informáticos basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

Un experto habitual en la materia apreciará fácilmente que los materiales CAR de la invención pueden modificarse de diversas maneras, de manera que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales CAR de la invención se incrementa con la modificación. Por ejemplo, los materiales CAR de la invención pueden conjugarse directa o

indirectamente a través de un puente con un residuo de direccionamiento. En la técnica se conoce la práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, materiales CAR de la invención, con residuos de direccionamiento. Véase, por ejemplo, Wadwa y col., J. Drug Targeting 3: 1 1 1 (1995) y la patente de Estados Unidos 5.087.616.

5 Como alternativa, los materiales CAR de la invención pueden modificarse en una forma de depósito, de tal manera que la forma en la que se liberan los materiales CAR de la invención en el organismo al que se administra, se controla con respecto al tiempo y a la ubicación dentro del organismo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 4.450.150). Las formas de depósito de los materiales CAR de la invención pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los materiales CAR de la invención y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en el que los materiales CAR de la invención están encapsulados o difundidos por todo el material y/o degradación del material no poroso. Después, el depósito se implanta en la ubicación deseada dentro del organismo y los materiales CAR de la invención se liberan del implante a una velocidad predeterminada.

10 Cuando los materiales CAR de la invención se administran con uno o más agentes terapéuticos adicionales, se pueden coadministrar uno o más agentes terapéuticos adicionales al mamífero. Por "coadministración" se entiende administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales y los materiales CAR de la invención están suficientemente cerca en el tiempo de modo que los materiales CAR de la invención pueden potenciar el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. A este respecto, los materiales CAR de la invención pueden administrarse en primer lugar y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse en segundo lugar, o viceversa. Como alternativa, los materiales CAR de la invención y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse simultáneamente. Un agente terapéutico ejemplar que puede coadministrarse con los materiales CAR es la IL-2. Se cree que la IL-2 potencia el efecto terapéutico de los materiales CAR de la invención. Para los fines de los procedimientos de la invención, en los que las células hospedadoras o poblaciones de células se administran al mamífero, las células pueden ser células que sean alogénicas o autólogas para el mamífero.

25 Se contempla que las composiciones farmacéuticas de la invención, los CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, o poblaciones de células, pueden utilizarse para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero. Sin estar ligados a una teoría o mecanismo particular, los CAR de la invención tienen actividad biológica, por ejemplo, capacidad de reconocer a un antígeno, por ejemplo, CD22, de modo que cuando una célula expresa el CAR puede mediar una respuesta inmunitaria contra la célula que expresa el antígeno, por ejemplo, CD22, para el cual el CAR es específico. A este respecto, una realización de la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras, la población de células, los anticuerpos y/o las partes de unión a antígeno de los mismos, y/o las composiciones farmacéuticas de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

30 Una realización de la invención comprende adicionalmente el empobrecimiento de linfocitos del mamífero antes de administrar los materiales CAR de la invención. Los ejemplos de empobrecimiento de linfocitos incluyen, pero sin limitación, quimioterapia no mieloablativa de empobrecimiento de linfocitos, quimioterapia mieloablativa de empobrecimiento de linfocitos, irradiación corporal total, etc.

35 Para los fines de los procedimientos de la invención, en los que se administran células hospedadoras o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas para el mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas para el mamífero.

40 El mamífero al que se hace referencia en este documento puede ser cualquier mamífero. Como se usa en este documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitación, mamíferos del orden *Rodentia*, tales como ratones y hámsters, y mamíferos del orden *Lagomorpha*, tales como conejos. Los mamíferos pueden ser del orden *Carnivora*, incluidos felinos (gatos) y caninos (perros). Los mamíferos pueden ser del orden *Artiodactyla*, incluyendo bovinos (vacas) y porcinos (cerdos) o del orden *Perssodactyla*, incluyendo equinos (caballos). Los mamíferos pueden ser del orden *Primates*, *Ceboides* o *Simoides* (monos) o del orden *Anthropoids* (humanos y simios). Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

45 Con respecto a los métodos de la invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de vejiga), cáncer de hueso, cáncer de cerebro (por ejemplo, meduloblastoma), cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal o *anorectum*; cáncer ocular, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico), linfoma, mesotelioma maligno, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica B, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda (LLA) y Linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, próstata, rectal, renal, cutáneo, de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, cáncer de estómago, cáncer

testicular, cáncer de tiroides y cáncer de uréter. Preferiblemente, el cáncer es una neoplasia maligna hematológica (por ejemplo, leucemia o linfoma, que incluye, pero no se limita a, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica B, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt). Preferiblemente, el cáncer se caracteriza por la expresión de CD22.

Los términos "tratar" y "prevenir", así como palabras raíces de los mismos, como se usan en el presente documento, no implican necesariamente un tratamiento o prevención completos o al 100%. Por el contrario, existen diversos grados de tratamiento o prevención de los cuales los expertos en la técnica reconocen que tienen un posible beneficio o efecto terapéutico. A este respecto, los procedimientos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención que proporciona el procedimiento de la invención, puede incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cáncer, que se tratan o se previenen. Además, para los fines del presente documento, la "prevención" puede abarcar retrasar el inicio de la enfermedad, o de un síntoma o afección de la misma.

Otra realización de la invención proporciona un uso de los CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células, o composiciones farmacéuticas de la invención, para el tratamiento o la prevención de cáncer en un mamífero.

Otra realización de la invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprenda una o más células del mamífero, con los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, la células hospedadora, la población de células, los anticuerpos, y/o las partes de unión a antígeno de los mismos de la invención, formando así un complejo, (b) y detectar el complejo, indicando la detección del complejo la presencia de cáncer en el mamífero.

La muestra puede obtenerse mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, biopsia o necropsia. Una biopsia es la extracción de tejido y/o de células de un individuo. Dicha extracción puede consistir en recoger tejido y/o células del individuo para analizar el tejido y/o las células que se han extraído. Este análisis puede incluir análisis para determinar si el individuo tiene y/o padece una determinada afección o patología. La afección o enfermedad puede ser, por ejemplo, cáncer.

Con respecto a una realización del procedimiento de la invención para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, la muestra que comprende células de mamífero puede ser una muestra que comprende células completas, lisados de la misma, o una fracción de los lisados de células completas, por ejemplo, una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción de proteína completa o una fracción de ácido nucleico. Si la muestra comprende células completas, las células pueden ser cualquier célula del mamífero, por ejemplo, las células de cualquier órgano o tejido, incluyendo células sanguíneas o células endoteliales.

Para los fines del procedimiento de detección de la invención, la puesta en contacto se realiza *in vitro*.

Además, la detección del complejo puede tener lugar a través de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los TCR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células, o anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, descritos en el presente documento, pueden marcarse con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (por ejemplo, partículas de oro).

En la técnica se conocen procedimientos para ensayar un CAR con respecto a su capacidad para reconocer células diana y a su especificidad antigénica. Por ejemplo, Clay y col., J. Immunol, 163: 507-513 (1999), enseñan procedimientos para medir la liberación de citocinas (por ejemplo, interferón- γ , factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), factor α de necrosis tumoral (TNF- α) o interleucina 2 (IL-2)). Además, la función del CAR puede evaluarse midiendo la citotoxicidad celular, como se describe en Zhao y col., J. Immunol, 174: 4415-4423 (2005).

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero por supuesto no deben interpretarse, de ninguna manera, como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la síntesis de los CAR anti CD22, la transducción de PBMC con los CAR anti CD22 y el análisis de expresión en superficie del CAR en PBMC transducidas.

Utilizando algoritmos de optimización de codones (Mr. Gene GmBH, Regensburg, Alemania) se sintetizaron secuencias que codificaban al receptor de antígeno quimérico, CAR, y se subclonaron en vectores de "destino" como se describe en (Zhao y col., J. Immunol, 183 (9): 5563. -74 (2009)) que codificaban secuencias de segunda generación, versión 1 (dominios transmembrana CD28 y de señalización intracelular de linfocitos T y dominio de señalización intracelular de linfocitos T de cadena CD3-zeta); de segunda generación, versión 2 (dominio

transmembrana CD8 unido a dominios de señalización intracelular de linfocitos T CD137 y CD3-zeta); o de tercera generación (dominio transmembrana CD8 unido dominios de señalización intracelular de linfocitos T CD28, CD137 y CD3-zeta) como se muestra en la Tabla 1 anterior.

5 Se crearon sobrenadantes de vector retroviral transfectando células 293GP con plásmidos que codificaban vectores retrovirales CAR y la glicoproteína de envoltura RD114, recogiendo los sobrenadantes del cultivo (s/n) 48-72 horas más tarde. Los sobrenadantes del cultivo se congelaron o se utilizaron inmediatamente para transducir PBMC humanas activadas con OKT3 e IL-2 utilizando el procedimiento "en placa" durante 2 días consecutivos (cultivo de linfocitos en placas recubiertas con RECTRONECTINA (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) previamente
10 expuesta a diluciones del vector que contenía s/n, como se describió previamente en Y. Zhao y col., J. Immunol, 183: 5563 (2009). En este estudio también se utilizó s/n retroviral que contenía un CAR específico de CD19 procedente de una línea celular productora permanente (Kochenderfer y col., Blood, 1 16: 4099 (2010)).

La expresión del CAR en linfocitos T transducidos se determinó por citometría de flujo. Para detectar los CAR que no codifican CH2CH3, los linfocitos T transducidos se incubaron con CD22-Fc (R & D Systems, Minneapolis, MN) seguido de FITC-F(ab')₂ específico del fragmento Fc de IgG humana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Para detectar células que expresan CAR en virtud del dominio CH2CH3, se utilizó anticuerpo de cabra contra IgG humana (H & L). El CAR HA22SH expresa una secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina en lugar de CH2CH3. El CAR específico de CD19 no contiene regiones Ig y se detectó utilizando Proteína L. La proteína L biotilada (50 ng/ul, Thermo Scientific, Waltham, MA) se unió, las células se lavaron y después se detectaron con SA-FITC (4 ug/ml, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Se utilizaron dos diluciones de vector retroviral que contenía sobrenadante (1: 4 y 1: 8). Para establecer una comparación, también se evaluó un vector CD19-CAR s/n. Los experimentos de citometría de flujo confirmaron la expresión del CAR de los CAR expuestos en la Tabla 1 en linfocitos T transducidos.
15
20

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la expresión de los antígenos CD22 y CD19 en líneas celulares de leucemia.

25 Se evaluaron las líneas celulares de leucemia humana (REH, SEM, NALM-6, KOPN-8, Daudi, Raji y K562) para determinar el nivel de expresión de CD19 y CD22 en la superficie celular utilizando perlas QUANTI-BRITE PE (BD Biosciences) y anticuerpos anti CD19 y anti CD22 marcados con PE (Tabla 2). El "Número de receptor por célula" indica el número absoluto aproximado de moléculas por célula en cada una de las líneas celulares indicadas. Los datos se calcularon determinando los anticuerpos unidos por célula (ABC, *antibodies bound per cell*) utilizando las
30 herramientas informáticas de análisis de datos CELLQUEST (BD) siguiendo las instrucciones del fabricante.

TABLA 2

Línea celular de leucemia	Número de receptor por célula
REH CD19	15,100
SEM CD 19	50,800
NALM-6 CD 19	50,500
KOPN-8 CD 19	60,800
Daudi CD 19	15,000
Raji CD19	50,000
K562 CD19	<100
REH CD22	7,000
SEM CD22	7,000
NALM-6 CD22	8,000
KOPN-8 CD22	15,300
Daudi CD22	8,000
Raji CD22	60,800
K562 CD22	<200

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra el efecto de los motivos de señalización y de CH2CH3 sobre la actividad del CAR *in vitro*.

Para determinar si las construcciones del CAR de segunda o tercera generación proporcionan aumento de la actividad lítica, líneas celulares de leucemia se marcaron con ⁵¹Cr y se utilizaron como dianas en ensayos CTL. Las células efectoras eran linfocitos T humanos transducidos con uno de los siguientes CAR: HA22 de segunda generación (SEQ ID NO: 15), HA22 de tercera generación (SEQ ID NO: 16), BL22 de segunda generación (SEQ ID NO: 19), BL22 de tercera generación (SEQ ID NO: 20), HA22-SH de segunda generación (SEQ ID NO: 17), HA22-SH de tercera generación (SEQ ID NO: 18), transducción simulada (no transducida) y CAR específico de CD19. Las células efectoras se cocultivaron con células diana a diversas proporciones entre efector con respecto a diana (E: D). Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 6A-6L. Como se muestra en las Figuras 1 y 6A-6H, los CAR de segunda generación demostraron una actividad lítica superior en comparación con los CAR de tercera generación. Además, como se muestra en las Figuras 6I-6L, la adición de un CH2CH3 de IgG1 no afecta a la función del CAR en ensayos realizados *in vitro*.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra que para normalizar la eficacia de la transducción cuando se analizan diferentes construcciones de CAR, pueden utilizarse unidades líticas.

Para normalizar la eficacia de la transducción de cada CAR, los linfocitos T efectores se analizaron para determinar el porcentaje de expresión de CAR. La proporción entre E: D se corrigió después al número real de efectores por pocillo (es decir, la proporción entre E: T disminuyó de 10: 1 a 5: 1 si el porcentaje de transducción es de 50%). Posteriormente, se creó un gráfico de la proporción entre E: D corregida frente al porcentaje de lisis. Una unidad lítica se definió como el 30% de lisis de células diana a una proporción E: D de 10: 1. Esta definición de "unidades" funcional cuantifica la cantidad de actividad lítica en cada población de células efectoras transducidas que se está comparando. Las unidades líticas representan proporciones E: D normalizadas para las diferencias en la eficacia de transducción entre las construcciones. Las Figuras 8A-8D muestran la actividad lítica de los CAR: HA22 28z (SEQ ID NO: 15); HA22 28BBz (SEQ ID NO: 16); BL22 28z (SEQ ID NO: 19); BL22 28BBz (SEQ ID NO: 20); HASH22 28z (SEQ ID NO: 17); o HASH22 28BBz (SEQ ID NO: 18) con respecto a las líneas celulares REH, SEM, NALM-6 o KOPN-8.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra la actividad lítica de los CAR22 anti CD22 basados en HA22 y BL22.

Para determinar si las diferencias en la afinidad por CD22 constituían una diferencia en la actividad lítica del CAR, se compararon los CAR que codificaban las secuencias de scFV de HA22 y BL22 en ensayos de CTL de liberación de ⁵¹Cr utilizando, como diana, las cuatro líneas celulares de leucemia descritas en el Ejemplo 2: KOPN8 (Figura 2A), NALM6 (Figura 2B), REH (Figura 3A) y SEM (Figura 3B). Se compararon tres construcciones diferentes de CAR anti CD22 de segunda generación, versión 1: HA22-CH2CH3 (SEQ ID NO: 15), BL22-CH2CH3 (SEQ ID NO: 19) y HA22-SH (secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina) (SEQ ID NO: 17). El CAR anti CD19 muy activo se incluyó como control. Las proporciones entre E: D se normalizaron de acuerdo con el porcentaje de transducción de cada construcción CAR individual como se describe en el Ejemplo 4, y por lo tanto los valores líticos fueron directamente comparables. Como se muestra en la Figura 2A, la línea celular KOPN8 demostró claramente una diferencia en la actividad lítica basada en la afinidad por scFv. La actividad de BL22 fue significativamente más baja que la de HA22 (p <0,04) o HASH (p <0,005) cuando se compararon las proporciones entre E: D individuales mediante la prueba de la *t de Student* (bilateral, para datos independientes) en todas las proporciones 1:1 anteriores. Este ejemplo demostró que una alta afinidad por scFV produce una lisis celular más eficaz de la diana cuando se utiliza en construcciones CAR en algunas líneas celulares leucémicas, y que esta diferencia no parecía estar relacionada con el nivel de expresión de CD22.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra la actividad lítica de los CAR anti CD22 basados en HA22.

Durante dos días se activaron linfocitos T con OKT3 e IL-2, se transdujeron con un vector vacío (simulación) o con un vector retroviral que expresaba las siguientes construcciones CAR: HA22 (segunda generación, versión 1) (SEQ ID N°: 15), HA22 (tercera generación) (SEQ ID NO: 16), CAR anti CD 19, HASH22 (segunda generación, versión 1, secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina) (SEQ ID NO: 17), o HASH22 (tercera generación, secuencia corta de dominio constante de inmunoglobulina) (SEQ ID NO: 18). Los linfocitos transducidos se analizaron posteriormente para determinar la capacidad de producir la lisis de las líneas celulares de leucemia, REH, SEM y NALM6 (Figura 4), que expresan CD22 (ensayo de liberación de ⁵¹Cr durante 8 horas). Estas tres líneas celulares también expresaron el antígeno CD19. La proporción entre las células efectoras con respecto a las células diana fue de 30: 1. La línea celular K562 se incluyó como un control de antígeno negativo. Como se muestra en la Figura 4, los CAR anti CD22 produjeron de manera eficaz la lisis de las líneas celulares de leucemia REH, SEM y NALM6.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra la actividad lítica de un CAR de segunda generación, versión 1, HASH22.

Para generar sobrenadante con vector retrovítico, se utilizaron secuencias de nucleótidos que codificaban el CAR de segunda generación HASH22 (SEQ ID NO: 17). Estos sobrenadantes se utilizaron para transducir linfocitos T humanos, y los linfocitos T transducidos se sometieron a ensayo con respecto a su capacidad para producir la lisis de líneas celulares portadoras del antígeno CD22.

Durante dos días, se activaron linfocitos T con OKT3 e IL-2, se transdujeron con el sobrenadante que contenía el vector CAR retrovítico y se analizaron posteriormente para determinar la capacidad de producir la lisis de las líneas celulares de leucemia REH, SEM, NALM6, KOPN8, Daudi, Raji, que expresan CD22, y la línea celular K562 de control de CD22 negativo. Como control (simulación), los linfocitos T se activaron y se cultivaron de la misma manera, pero no se expusieron a sobrenadante retrovítico que contenía el vector CAR (no transducido).

Los resultados se muestran en las Figuras 5A y 5B. Se observó poca o ninguna lisis de las dianas tumorales en las células de control (Figura 5A). Se observó lisis de las líneas celulares REH, SEM y OPN8 para las células transducidas con CAR HASH22 (Figura 5B).

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra que las células transducidas con un CAR basado en HA22 retrasan el avance de la enfermedad y prolongan la duración de la supervivencia *in vivo*.

El día 0, ratones NSG (NOD scid gamma) inmunodeficientes recibieron una inyección de leucemia humana CD22 positiva, modificada por ingeniería genética para expresar luciferasa (0,5 x 10⁶ NALM6-GL (NALM6 transfectado con luciferasa)). El día 3, los ratones se trataron con 1 x 10⁷ linfocitos T de control ("simulación", no transducidos) o con 1 x 10⁷ linfocitos T transducidos con CAR HASH22 de segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 17), CAR HASH22 de tercera generación (SEQ ID NO: 18) o CAR HASH22 de segunda generación, versión 2 (SEQ ID NO: 32). La carga tumoral se midió durante un período de tiempo de 30 días con imágenes bioluminiscentes utilizando el instrumento Xenogen IVIS. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (ip) de 3 mg de D-luciferina (Caliper Life Sciences, Inc.) y 4 minutos después de la inyección se obtuvieron imágenes de los ratones anestesiados con un tiempo de exposición de 30 segundos. Se utilizó el programa informático LIVING IMAGE para analizar las señales bioluminiscentes de cada ratón como fotones/s/cm²/sr. En la Figura 7A se muestra el gráfico de Kaplan-Meier.

Como se muestra en la Figura 7A, todos los ratones tuvieron enfermedad equivalente el Día 3. Los ratones tratados con linfocitos T transducidos con CAR HASH22 de segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 17), CAR HASH22 de tercera generación (SEQ ID NO: 18) o CAR HASH22 de segunda generación, versión 2 (SEQ ID NO: 32) redujeron la carga tumoral en comparación con los ratones tratados con células de control.

Durante 30 días se midió la supervivencia de los ratones, se calcularon los datos estadísticos de supervivencia utilizando análisis de rango logarítmico (Mantel-Cox), y los resultados de supervivencia se muestran en la Figura 7B. Como se muestra en la Figura 7B, los ratones tratados con linfocitos T transducidos con CAR HASH22 de segunda generación, versión 1 (SEQ ID NO: 17), CAR HASH22 de tercera generación (SEQ ID NO: 18), o CAR HASH22 de segunda generación, versión 2 (SEQ ID NO: 32) demostraron un aumento en la supervivencia en comparación con los ratones tratados con células de control.

El uso de los términos "un", "uno(a)", "el" y "la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse que incluye tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o que claramente lo contradiga el contexto. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como expresiones abiertas (es decir, que significa "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique lo contrario. La enumeración de intervalos de valores del presente documento, está simplemente destinada a servir como un procedimiento de abreviatura para referirse individualmente a cada valor distinto que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en este documento, y cada valor distinto se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerase individualmente en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en este documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en este documento o que claramente lo contradiga el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o el lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, pretende únicamente aclarar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
- <120> RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS DIRIGOS ANTI CD22
- <130> 711021

<150> US 61/549.516
 <151> 20-10-2011

5

<160> 39
 <170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sintética
 <400> 1

```

    Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
    1                               5                               10                               15

    Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
                                20                               25                               30

    Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
                                35                               40                               45

    Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                               55                               60

    Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
    65                               70                               75                               80

    Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
                                85                               90                               95

    Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
                                100                               105
    
```

20

<210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Sintética
 <400> 2

ES 2 654 060 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
 100 105

<210> 3
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

ES 2 654 060 T3

Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His Trp Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

5 <210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

15 <210> 5
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 5

ES 2 654 060 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His Trp Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr
 130 135 140
 Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
 145 150 155 160
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe
 210 215 220
 Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys Ala
 245

<210> 6
<211> 245
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintética

10

<400> 6

ES 2 654 060 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr
 130 135 140
 Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
 145 150 155 160
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
 195 200 205
 Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe
 210 215 220
 Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys Ala
 245

ES 2 654 060 T3

5
 <210> 7
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 7

Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Ile Pro Asp Thr
 20

15
 <210> 8
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 8

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

ES 2 654 060 T3

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys
 225 230 235

5 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 9

Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Gly Arg Val Lys Asp Pro Lys
 1 5 10 15

15 <210> 10
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética
 <400> 10

Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
 1 5 10 15

25 Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu

ES 2 654 060 T3

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
20 25 30

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

5 <210> 13
<211> 47
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 13

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
1 5 10 15

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
20 25 30

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40 45

15 <210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 14

ES 2 654 060 T3

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

5 <210> 15
 <211> 727
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 15

ES 2 654 060 T3

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 20 25 30

Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
 35 40 45

Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr
 50 55 60

Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 85 90 95

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu
 100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His
 115 120 125

Trp Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 130 135 140

Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 165 170 175

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
 180 185 190

ES 2 654 060 T3

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
 195 200 205
 Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
 225 230 235 240
 Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Glu Pro Lys
 260 265 270
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 275 280 285
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 290 295 300
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 305 310 315 320
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 325 330 335
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 340 345 350
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 355 360 365
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 370 375 380
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 385 390 395 400
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 405 410 415
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 420 425 430
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 435 440 445

ES 2 654 060 T3

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 450 455 460

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 465 470 475 480

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 485 490 495

Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Ala Ala Ala Ile Glu Val Met
 500 505 510

Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile
 515 520 525

His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro
 530 535 540

Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
 545 550 555 560

Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
 565 570 575

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 580 585 590

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 595 600 605

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 610 615 620

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 625 630 635 640

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 645 650 655

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 660 665 670

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 675 680 685

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 690 695 700

ES 2 654 060 T3

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
705 710 715 720

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
725

<210> 16
<211> 792
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 16

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
35 40 45

Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr
50 55 60

Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
85 90 95

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu
100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His
115 120 125

Trp Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
130 135 140

Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
165 170 175

ES 2 654 060 T3

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
 180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
 195 200 205

Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
 225 230 235 240

Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Glu Pro Lys
 260 265 270

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 275 280 285

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 290 295 300

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 305 310 315 320

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 325 330 335

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 340 345 350

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 355 360 365

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 370 375 380

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 385 390 395 400

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 405 410 415

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 420 425 430

ES 2 654 060 T3

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
435 440 445

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
450 455 460

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
465 470 475 480

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
485 490 495

Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Ala Ala Ala Ala Phe Val Pro
500 505 510

Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
515 520 525

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
530 535 540

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
545 550 555 560

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
565 570 575

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn
580 585 590

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
595 600 605

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
610 615 620

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Val Val Lys Arg
625 630 635 640

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
645 650 655

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
660 665 670

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala

ES 2 654 060 T3

	675		680		685												
	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	
	690						695					700					
	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	
	705					710					715					720	
	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	
					725					730					735		
	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	
				740					745					750			
	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	
			755					760					765				
	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	
	770						775					780					
	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg									
	785					790											

<210> 17
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 17

ES 2 654 060 T3

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
35 40 45

Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr
50 55 60

Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
85 90 95

ES 2 654 060 T3

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu
 100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His
 115 120 125

Trp Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 130 135 140

Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 165 170 175

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
 180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
 195 200 205

Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
 225 230 235 240

Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Lys Thr Thr
 260 265 270

Pro Pro Ser Val Tyr Gly Arg Val Lys Asp Pro Lys Ala Ala Ala Ile
 275 280 285

Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly
 290 295 300

Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
 305 310 315 320

Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val
 325 330 335

Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp

ES 2 654 060 T3

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
35 40 45

ES 2 654 060 T3

Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr
50 55 60

Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
85 90 95

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu
100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His
115 120 125

Trp Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
130 135 140

Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
165 170 175

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
195 200 205

Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
225 230 235 240

Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
245 250 255

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Lys Thr Thr
260 265 270

Pro Pro Ser Val Tyr Gly Arg Val Lys Asp Pro Lys Ala Ala Ala Ala
275 280 285

Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro

ES 2 654 060 T3

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
545 550 555 560

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
565 570

5 <210> 19
<211> 727
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 19

ES 2 654 060 T3

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
35 40 45

Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr
50 55 60

Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
85 90 95

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu
100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser
115 120 125

Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
130 135 140

Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
165 170 175

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn

ES 2 654 060 T3

			180					185					190			
Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	
		195					200					205				
Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Ile	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	
	210					215					220					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	
225					230					235					240	
Gln	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	
				245					250					255		
Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	
			260					265						270		
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
		275					280					285				
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
	290					295					300					
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
305					310					315					320	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
				325					330					335		
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
			340					345						350		
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
		355					360					365				
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
	370					375					380					
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
385					390					395					400	
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	
				405					410					415		
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
			420					425					430			

ES 2 654 060 T3

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 435 440 445
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 450 455 460
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 465 470 475 480
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 485 490 495
 Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Ala Ala Ala Ile Glu Val Met
 500 505 510
 Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile
 515 520 525
 His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro
 530 535 540
 Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
 545 550 555 560
 Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
 565 570 575
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 580 585 590
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 595 600 605
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 610 615 620
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 625 630 635 640
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 645 650 655
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 660 665 670
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 675 680 685

ES 2 654 060 T3

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 690 695 700

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 705 710 715 720

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 725

<210> 20
 <211> 792
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 20

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Thr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 20 25 30

Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
 35 40 45

Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr
 50 55 60

Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 85 90 95

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu
 100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser
 115 120 125

Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 130 135 140

Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160

ES 2 654 060 T3

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
165 170 175

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
195 200 205

Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
225 230 235 240

Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
245 250 255

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Glu Pro Lys
260 265 270

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
275 280 285

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
290 295 300

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
305 310 315 320

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
325 330 335

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
340 345 350

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
355 360 365

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
370 375 380

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
385 390 395 400

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
405 410 415

ES 2 654 060 T3

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
420 425 430

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
435 440 445

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
450 455 460

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
465 470 475 480

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
485 490 495

Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Ala Ala Ala Ala Phe Val Pro
500 505 510

Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
515 520 525

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
530 535 540

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
545 550 555 560

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
565 570 575

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn
580 585 590

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
595 600 605

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
610 615 620

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Val Val Lys Arg
625 630 635 640

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
645 650 655

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
660 665 670

ES 2 654 060 T3

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 675 680 685

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 690 695 700

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 705 710 715 720

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 725 730 735

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 740 745 750

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 755 760 765

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 770 775 780

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 785 790

5 <210> 21
 <211> 1515
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 21

atggttctgc tggtcacatc actgctcctc tgtgaactgc ctcatcctgc ctttctgctc 60

attccccgaca ctgaagtcca gctcgtggaa tctggagggg gcctggtgaa acctggggga 120

tctctcaaac tgtcttctgc cgcttctggc tttgctttta gcctctacga catgtcctgg 180

gtccggcaga cacctgaaaa acgcctggag tgggtcgcct acatttctag tgggggcgga 240

acatactacc ccgataccgt gaagggacgc tttacaattt ctagggataa cgccaaaaac 300

acctgtacc tccagatgtc atccctgaaa tctgaggata ctgccatgta ctactgtgct 360

aggcattctg gctacggatc atcttacgga gtgctgttctg cttactgggg ccaggggact 420

ctcgtcactg tctctgctgg cgggggaggg tctggcggag gcggatccgg aggcggaggg 480

agtgatattc agatgactca gaccacctct tctctgtccg cttctctggg cgatagagtg 540

acaatctcct gtcgggcatc acaggatatt agcaattacc tgaactggta ccagcagaaa 600

ES 2 654 060 T3

cccgatggaa ccgtaaact gctcatctac tacacctcca tctccactc tggcgtgcca 660
 tctcgatttt ctggatctgg ctctggaacc gactactctc tcacaatctc caacctggaa 720
 caggaggatt ttgccaccta cttttgtcag cagggcaata ctctgccttg gacctttggg 780
 ggcggaacca aactggaaat caaggcggaa cccaaatctt gtgacaaaac ccacacctgt 840
 ccacctgtc ccgtcccga actgctcggg ggacctctg tctttctgtt tcccctaaa 900
 cccaaggata ccctcatgat ctctcggaca cctgaggcca catgtgtcgt ggtcgatgtg 960
 tctcacgagg atcccgaagt caaattcaat tggtagctgg acggcgtcga agtcataac 1020
 gccaaaacca aaccacggga ggaacagtac aatagcacct accgagtggg gagtgtgctc 1080
 actgtgctcc atcaggattg gctgaacggc aaagaataca agtgtaaagt gagtaataag 1140
 gccctgcctg ccctattga aaaaaccatc tcaaaggcta agggacagcc tagggaacca 1200
 caggtctaca cactgccacc ctcacgggac gaactcacia aaaaccaggt gtcactcacc 1260
 tgtctggtga agggctttta cccatccgat atcgtctctg aatgggagag caatggccag 1320
 cctgagaaca actacaaaac cccccccct gtgctggatt ccgatggctc tttcttctg 1380
 tactetaaac tcaccgtgga taagagtcga tggcagcagg gaaatgtgtt ctctgctcc 1440
 gtgatgcatg aggccctcca caatcactac actcagaaat ccctgtctct ctctcctgga 1500
 aaaaaggacc ccaaa 1515

<210> 22
 <211> 1515
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética
 10 <400> 22

ES 2 654 060 T3

atggttctgc tggtcacatc actgctcctc tgtgaactgc ctcatcctgc ctttctgctc 60
attcccgaca ctgaagtcca gctcgtggaa tctggagggg gcctggtgaa acctggggga 120
tctctcaaac tgtcttctgc cgcttctggc tttgctttta gcatctacga catgtcctgg 180
gtccggcaga cacctgaaaa acgcctggag tgggtgcgct acatttctag tgggggcgga 240
acatactacc ccgataccgt gaaggacgc tttacaatct ctagggataa cgccaaaaac 300
accctgtacc tccagatgtc atccctgaaa tctgaggata ctgccatgta ctactgtgct 360
aggcattctg gctacggaac acattgggga gtgctcttcg cttactgggg ccaggggact 420
ctcgtcaactg tctctgctgg cgggggagc tctggcggag gcggatccgg aggcggaggg 480
agtgatattc agatgactca gaccacctct tctctgtccg cttctctggg cgatagagtg 540
acaatctcct gtcgggcctc acaggatatt agcaattacc tgaactggta ccagcagaaa 600
cccgatggaa ccgtcaaact gctcatctac tacacctcca tcctccactc tggcgtgcca 660

tctcgatttt ctggatctgg ctctggaacc gactactctc tcacaatctc caacctggaa 720
caggaggatt ttgccaccta cttttgtcag cagggaata ctctgccttg gaccttggg 780
ggcggaaacca aactggaaat caaggccgaa cccaaatctt gtgacaaaac ccacacctgt 840
ccacctgtc ccgctccga actgctcgga ggacctctg tctttctggt tccccetaaa 900
cccaaggata ccctcatgat ctctcggaca cctgaggtca catgtgtcgt ggtcgatgtg 960
tctcacgagg atcccgaagt caaattcaat tggtagctgg acggagtcga agtccataac 1020
gccaaaacca aaccacggga ggaacagtac aatagcacct accgagtggt gagtgtgctc 1080
actgtgctcc atcaggattg gctgaacggc aaagaataca agtgtaaagt gagtaataag 1140
gccctgcctg cccctattga aaaaaccatc tcaaaggcta agggacagcc tagggaacca 1200
caggtctaca cactgccacc ctcaaggac gaactcacia aaaaccaggt gtcactcacc 1260
tgtctggtga agggctttta cccatccgat atcgtctctg aatgggagag caatggccag 1320
cctgagaaca actacaaaac cccccccct gtgctggatt ccgatggctc tttcttctg 1380
tactctaaac tcaccgtgga taagagtga tggcagcagg gaaacgtgtt ctcttctcc 1440
gtgatgcatg aggcctcca caatcactac actcagaaat ccctgtctct ctctcctggc 1500

aaaaaggacc ccaa 1515

<210> 23
<211> 852
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintética

<400> 23

ES 2 654 060 T3

atggttctgc tggtcacatc actgctcctc tgtgaactgc ctcatcctgc ctttctgctc 60
 attcccgaca ctgaagtcca gctcgtggaa tctggagggg gcctggtgaa acctggggga 120
 tctctcaaac tgtcttgtgc cgcttctggc tttgctttta gcatctacga catgtcctgg 180
 gtccggcaga cacctgaaaa acgcctggag tgggtcgcct acatttctag tgggggcgga 240
 acatactacc ccgataccgt gaagggacgc tttacaattt ctagggataa cgccaaaaac 300
 accctgtacc tccagatgtc atccctgaaa tctgaggata ctgccatgta ctactgtgct 360
 aggcattctg gctacggaac acattgggga gtgctcttcg cttactgggg ccaggggact 420
 ctcgtcactg tctctgctgg cgggggaggc tctggcggag gcggatccgg aggcggaggg 480
 agtgatattc agatgactca gaccacctct tctctgtccg cttctctggg cgatagagtg 540
 acaatctcct gtcgggcata acaggatatt agcaattacc tgaactggta ccagcagaaa 600
 cccgatggaa ccgtcaaact gctcatctac tacacctcca tcctccactc tggcgtgcc 660
 tctcgatddd ctggatctgg ctctggaacc gactactctc tcacaatctc caacctggaa 720
 caggaggatt ttgccacctc cttttgtcag cagggaata ctctgccttg gacctttggg 780
 ggcggaacca aactggaaat caaggccaaa acaacccac cttccgtgta cggccgagtg 840
 aaagacccta ag 852

- 5 <210> 24
- <211> 651
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Sintética
- <400> 24

gttatgtatc ctctcctta cctagacaat gagaagagca atggaacat tatccatgtg 60
 aaagggaaac acctttgtcc aagtccocta tttccggac cttctaagcc cttttgggtg 120
 ctggtggtgg ttgggggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 180
 attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctctgcaca gtgactacat gaacatgact 240
 ccccgccgcc ccgggccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 300
 gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgcg gtaccagcag 360
 ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 420
 gacaagagac gtggccggga ccctgagatg ggggaaagc cgagaaggaa gaacctcag 480
 gaaggcotgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 540
 atgaaaggcg agcgcgggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 600
 gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg c 651

ES 2 654 060 T3

	<210> 25	
	<211> 848	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 25	
10		
	ttcgtgccg tttcctgcc agcgaagccc accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca	60
	ccggcgccca ccatacgcgc gcagcccctg tcctcgcgcc cagagggcgtg ccggccagcg	120
	gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg gacttcgcct gtgatatacta catctggcg	180
	cccttgggcg ggaottgtgg ggtccttctc ctgtcactgg ttatcaacct ttactgcaac	240
	cacaggaaca ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc	300
	cggccgccccg ggcccaccgc caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca	360
	gcctatcgcct cccgtttctc tgttgtaaa cggggcagaa agaagctcct gtatatattc	420
	aaacaaccat ttatgagacc agtacaaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga	480
	tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac	540
	gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	600
	gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	660
	agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	720
	gcctacagtg agattgggat gaaagggcag cggccggagg gcaaggggca cgatggcctt	780
	taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg	840
	ccccctcg	848
15	<210> 26	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 26	
	ccctcgagcc gccacc	16
25	<210> 27	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 27	
	gcggccgcaa ttgaa	15
35	<210> 28	
	<211> 18	

ES 2 654 060 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintética

<400> 28
gctgcggccg caattgaa 18

10 <210> 29
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintética

<400> 29
taaggatccg ataaaataa 19

20 <210> 30
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

30 <400> 30
ctaaggatcc gataa 15

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

40 <400> 31

<210> 32
<211> 511
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

50 <400> 32

Pro Arg Ala Ala Thr
1 5

ES 2 654 060 T3

Met	Val	Leu	Leu	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Cys	Glu	Leu	Pro	His	Pro
1				5					10					15	
Ala	Phe	Leu	Leu	Ile	Pro	Asp	Thr	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly
			20					25					30		
Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala
		35					40					45			
Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Ser	Ile	Tyr	Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr
	50					55					60				
Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
65					70					75					80
Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
				85					90					95	

ES 2 654 060 T3

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu
 100 105 110

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His
 115 120 125

Trp Gly Val Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 130 135 140

Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 165 170 175

Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn
 180 185 190

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
 195 200 205

Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
 225 230 235 240

Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Lys Thr Thr
 260 265 270

Pro Pro Ser Val Tyr Gly Arg Val Lys Asp Pro Lys Ala Ala Ala Ala
 275 280 285

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 290 295 300

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 305 310 315 320

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 325 330 335

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 340 345 350

ES 2 654 060 T3

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 355 360 365

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 370 375 380

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 385 390 395 400

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln
 405 410 415

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 420 425 430

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 435 440 445

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 450 455 460

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 465 470 475 480

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 485 490 495

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505 510

<210> 33
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 33

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 35 40 45

ES 2 654 060 T3

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
50 55 60

Ile Thr Leu Tyr Cys
65

5 <210> 34
<211> 42
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética
<400> 34

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

15 <210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética
<400> 35

ES 2 654 060 T3

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

5 <210> 36
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 36

Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Gly Arg Val Lys Asp Pro Lys Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ala

15 <210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 37

25 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

30 <210> 38
<211> 864
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 654 060 T3

<220>
<223> Sintética

<400> 38

5

```

atggttctgc tggteacatc actgctcctc tgtgaactgc ctcatcctgc ctttctgctc      60
attcccgaca ctgaagtcca gctcgtggaa tctggagggg gcctggtgaa acctggggga      120
tctctcaaac tgtcttgtgc cgcttctggc tttgctttta gcatctacga catgtcctgg      180
gtccggcaga cacctgaaaa acgcctggag tgggtgcgct acatttctag tgggggcgga      240
acatactacc ccgataccgt gaagggaagc tttacaattt ctagggataa cgccaaaaac      300
accctgtacc tccagatgtc atccctgaaa tctgaggata ctgccatgta ctactgtgct      360
aggcattctg gctacggaac acattgggga gtgctcttcg cttactgggg ccaggggact      420
ctcgtcactg tctctgctgg cgggggaggc tctggcggag gcggatccgg aggcggaggg      480
agtgatattc agatgactca gaccacctct tctctgtccg cttctctggg cgatagagtg      540

acaatctcct gtcgggcatc acaggatatt agcaattacc tgaactggta ccagcagaaa      600
cccgatggaa ccgtcaaact gctcatctac tacacctoca tcctccactc tggcgtgcca      660
tctcgatfff ctggatctgg ctctggaacc gactactctc tcacaatctc caacctggaa      720
caggaggatt ttgccaccta cttttgtcag cagggaata ctctgccttg gacctttggg      780
ggcggaacca aactggaaat caaggccaaa acaaccccac cttccgtgta cggccgagtg      840
aaagacccta aggctgcggc cgca      864

```

<210> 39
<211> 672
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

15

<400> 39

ES 2 654 060 T3

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagccctg	60
tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcgggggcg cagtgcacac gagggggctg	120
gaottcgct gtgatctta catctggggg cccttgccg ggacttgtgg ggtccttctc	180
ctgtcactgg ttatcacct ttactgcaa cggggcagaa agaaactcct gtatatattc	240
aaacaacct ttatgagacc agtacaaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga	300
tttcagaag aagaagaag aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac	360
gccccgcgt acaagcagg ccagaaccag ctctataac agctcaatct aggacgaaga	420
gaggagtac atgttttga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	480
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	540
gcctacagt agattgggat gaaaggcgag cgccggagg gcaaggggca cgatggcctt	600
taccagggc tcagtacag caccaaggac acctacgac cccttcacat gcaggccctg	660
ccccctcgct aa	672

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a antígeno de HA22, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T,
 5 en el que el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 1,
 en el que el dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 3.
2. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 5.
- 10 3. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente una secuencia líder que comprende la SEQ ID NO: 7.
4. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende adicionalmente un dominio de inmunoglobulina.
- 15 5. El CAR de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el dominio de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 8, 9 o 36.
6. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el dominio transmembrana comprende i) CD8 y o ii) CD28.
7. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el dominio transmembrana comprende a) una secuencia de aminoácidos CD8 que comprende la SEQ ID NO: 10 o 33 y/o b) una secuencia de aminoácidos CD28 que comprende la SEQ ID NO: 11.
- 20 8. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T comprende uno o más de i) CD28, ii) CD137 y iii) CD3 zeta.
9. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T comprende una secuencia de aminoácidos CD28 que comprende la SEQ ID NO: 12.
- 25 10. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T comprende una secuencia de aminoácidos CD137 que comprende la SEQ ID NO: 13 o 34.
11. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T comprende una secuencia de aminoácidos CD3 zeta que comprende la SEQ ID NO: 14 o 35.
- 30 12. El CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una cualquiera de SEQ ID NO: 15-18 y 32.
13. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 35 14. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22-23 y 38.
15. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 24-25 y 39.
16. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15.
- 40 17. Una célula hospedadora aislada que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 16.
18. Una población de células que comprende al menos una célula hospedadora de la reivindicación 17.
19. Una composición farmacéutica que comprende el CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 16, la célula hospedadora de la reivindicación 17, o la población de células de la reivindicación 18, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 20. Un procedimiento de detección de la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende:
 (a) poner en contacto una muestra que comprenda una o más células del mamífero con el CAR de una

cualquiera de las reivindicaciones 1-12, formando de ese modo un complejo, y
(b) detectar el complejo, indicando la detección del complejo la presencia de cáncer en el mamífero.

- 5 21. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 16, la célula hospedadora de la reivindicación 17, la población de células de la reivindicación 18, o la composición farmacéutica de la reivindicación 19, para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer en un mamífero que expresa CD22.

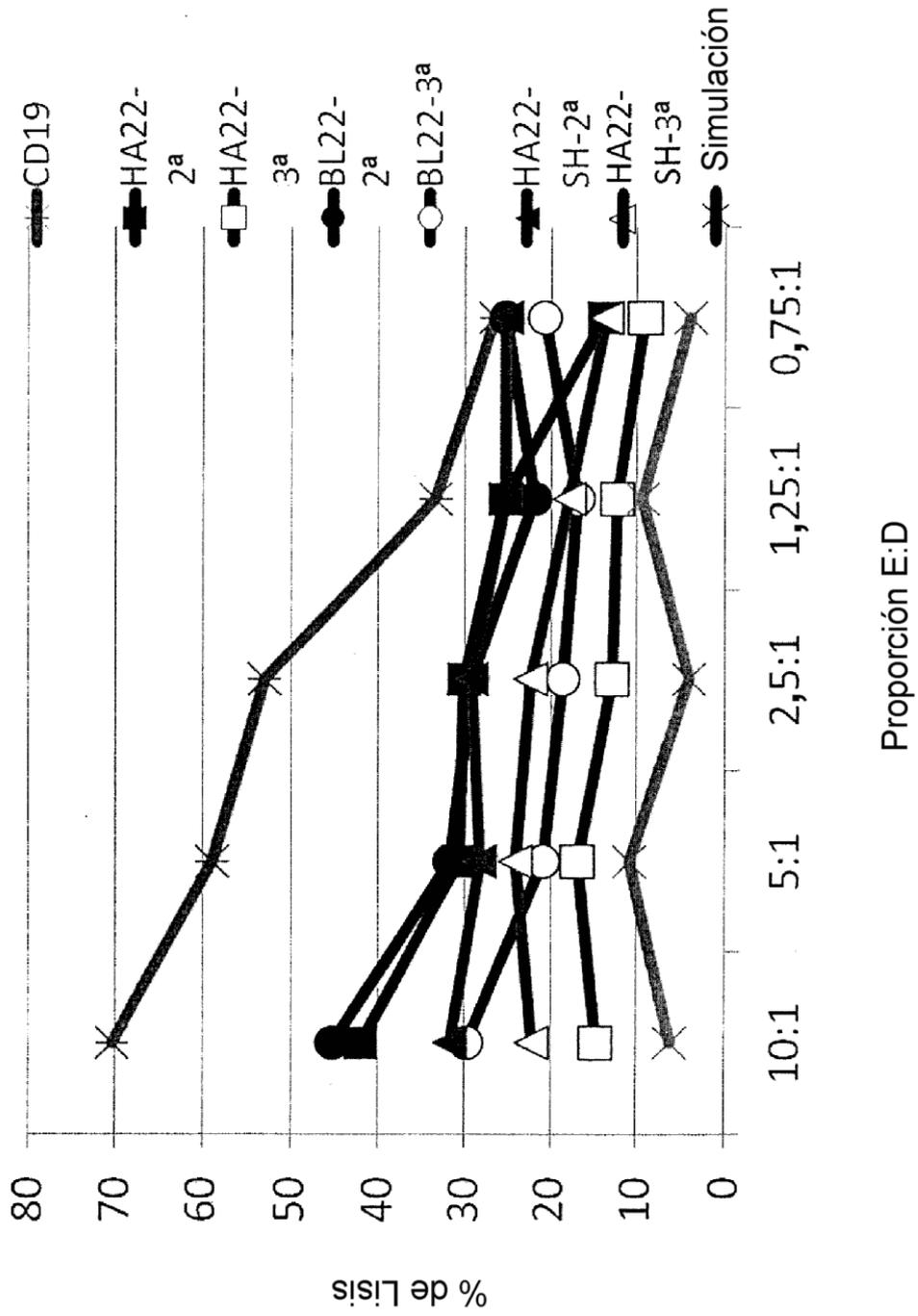
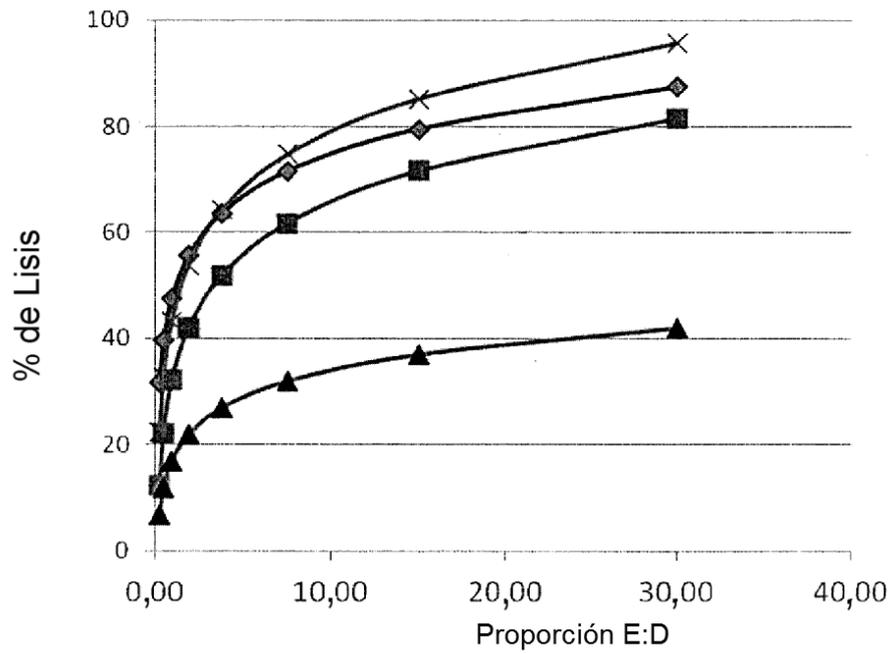


FIG. 1

A.



B.

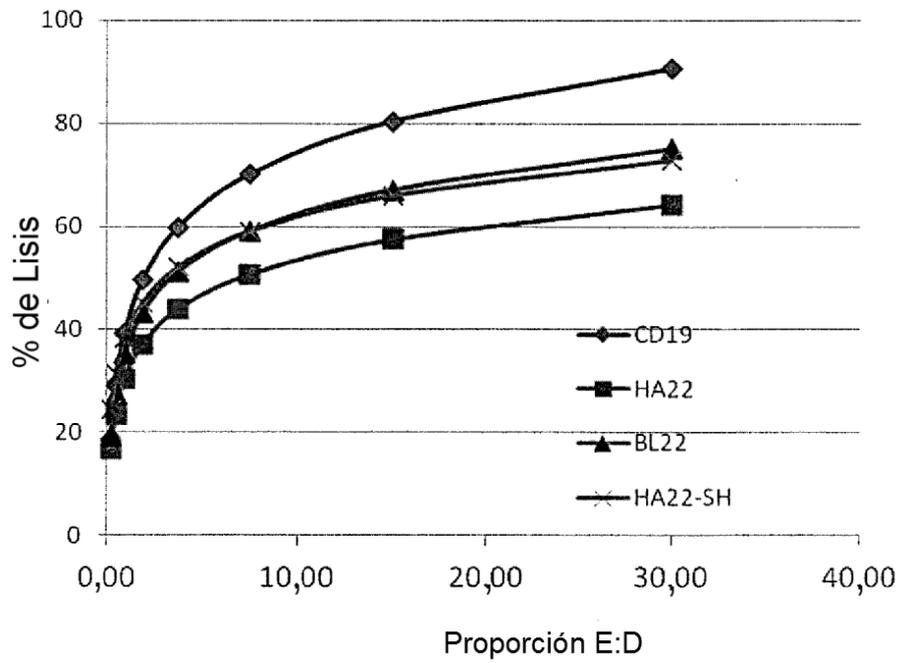
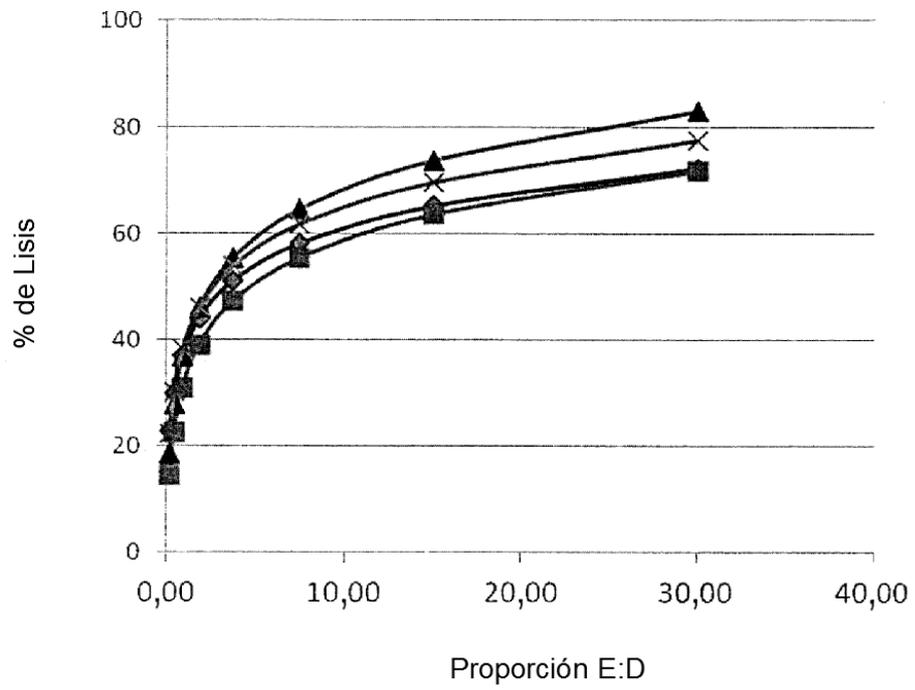


FIG. 2

A.



B.

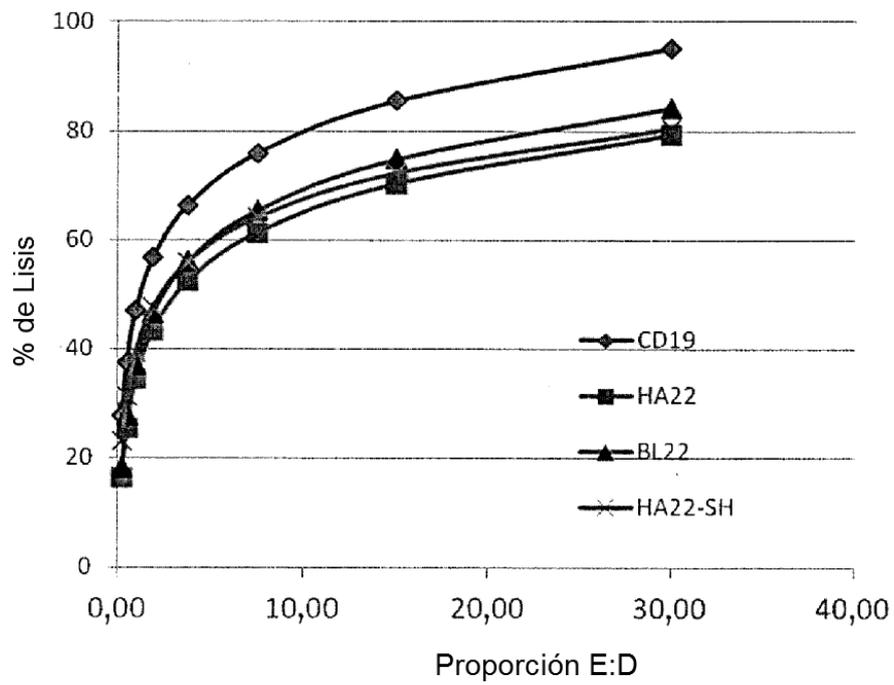


FIG. 3

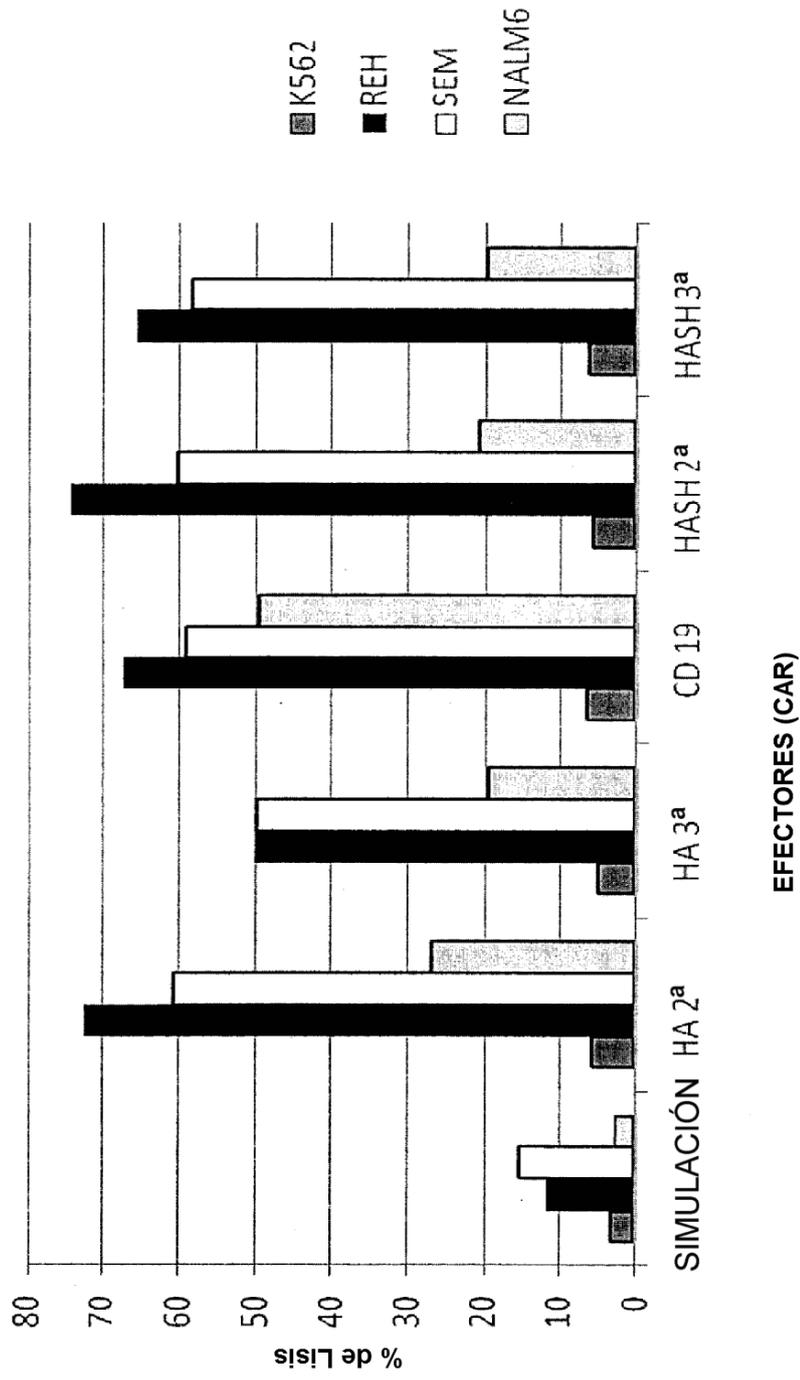


FIG. 4

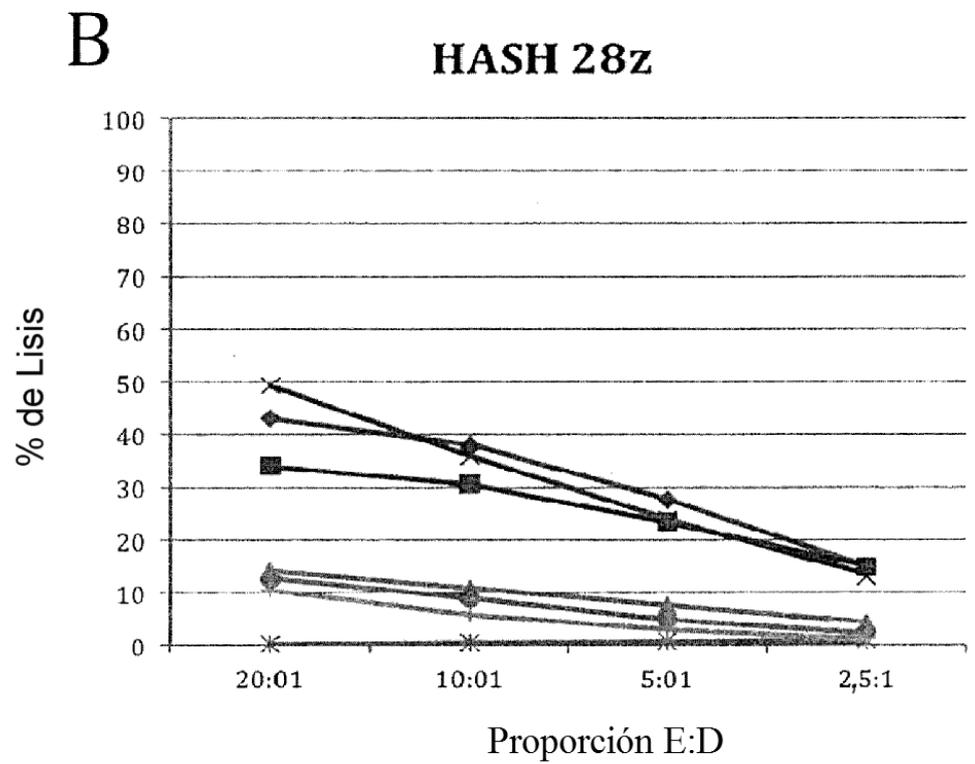
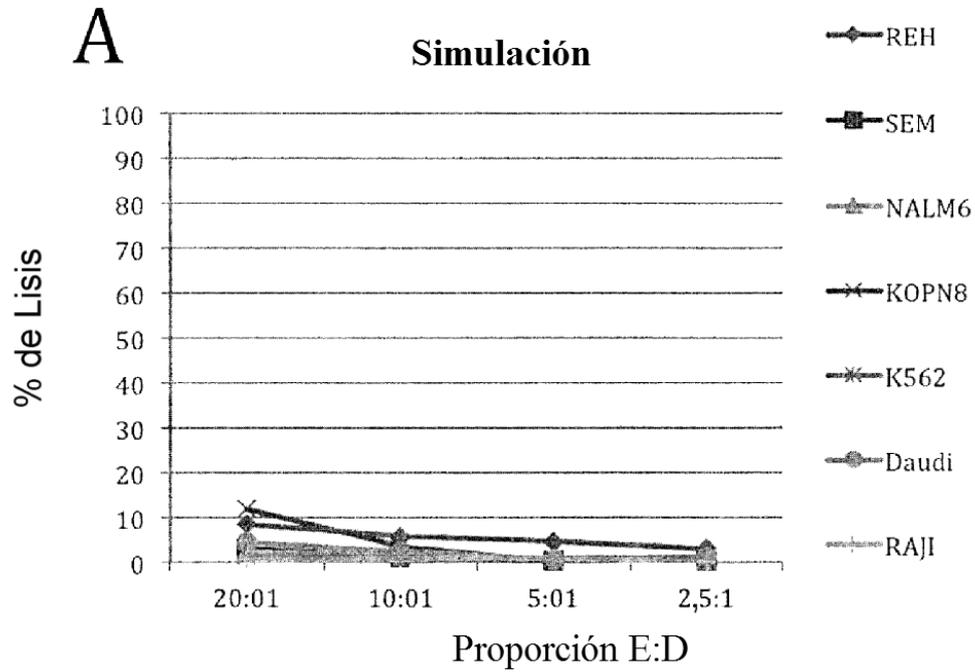


FIG. 5

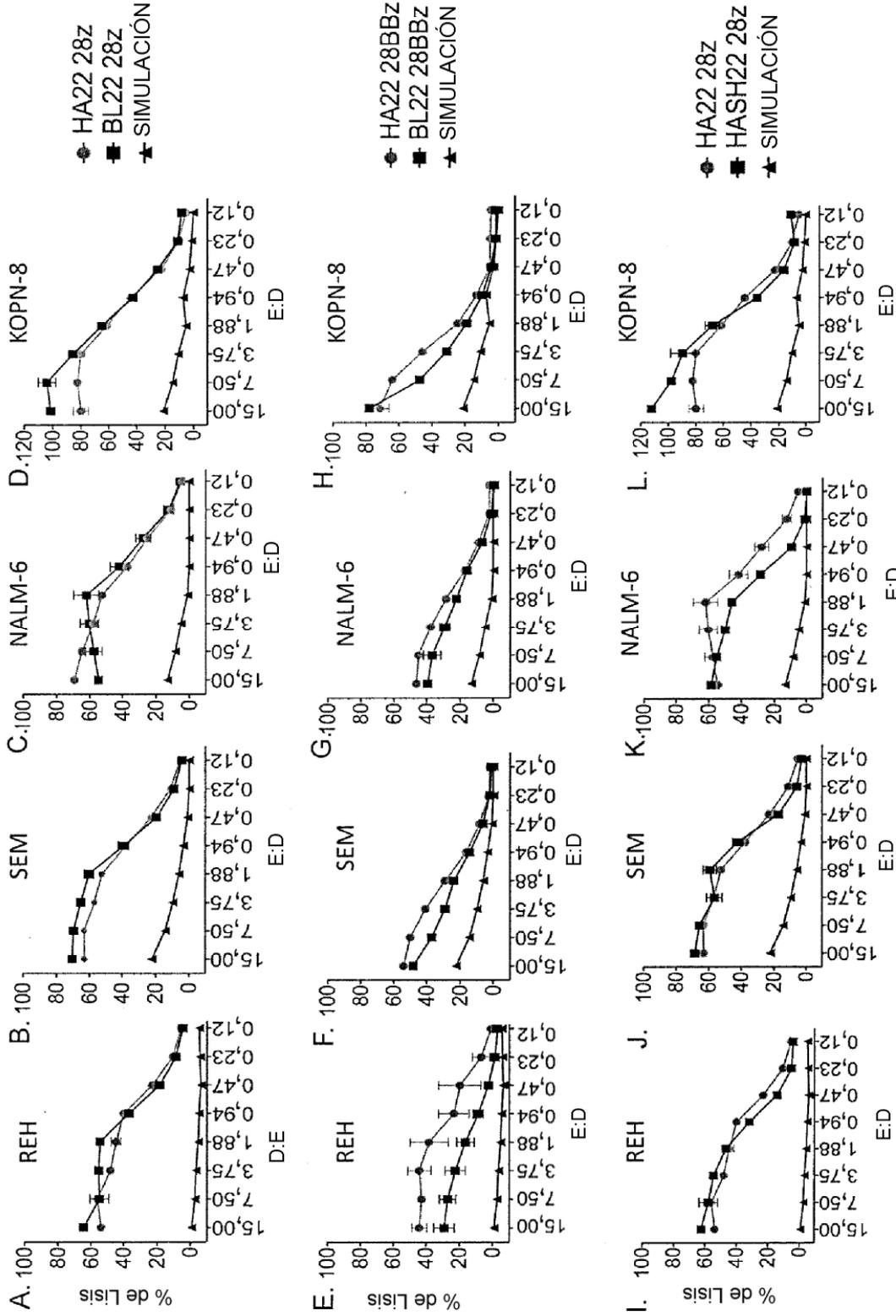


FIG. 6

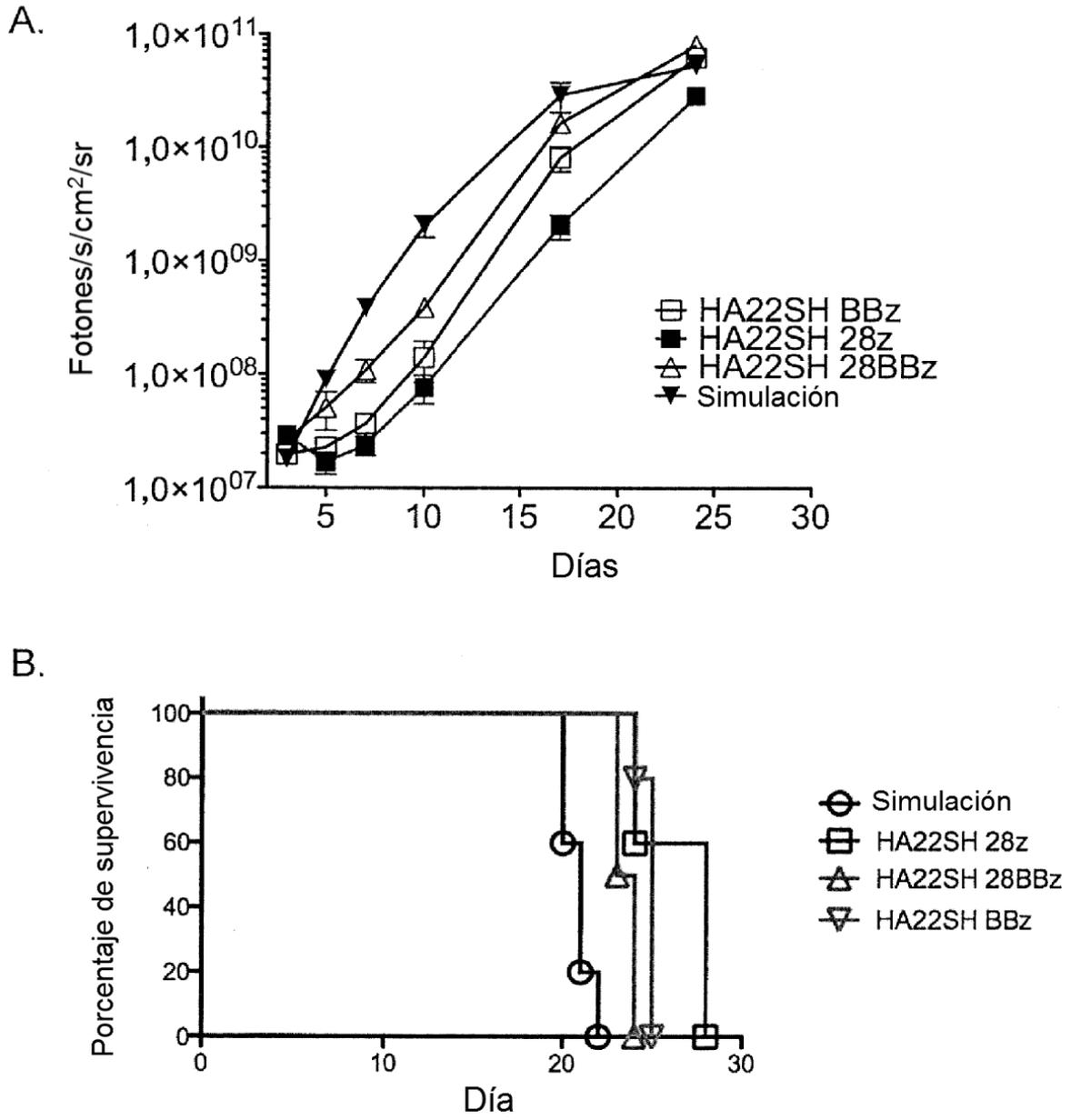


FIG. 7

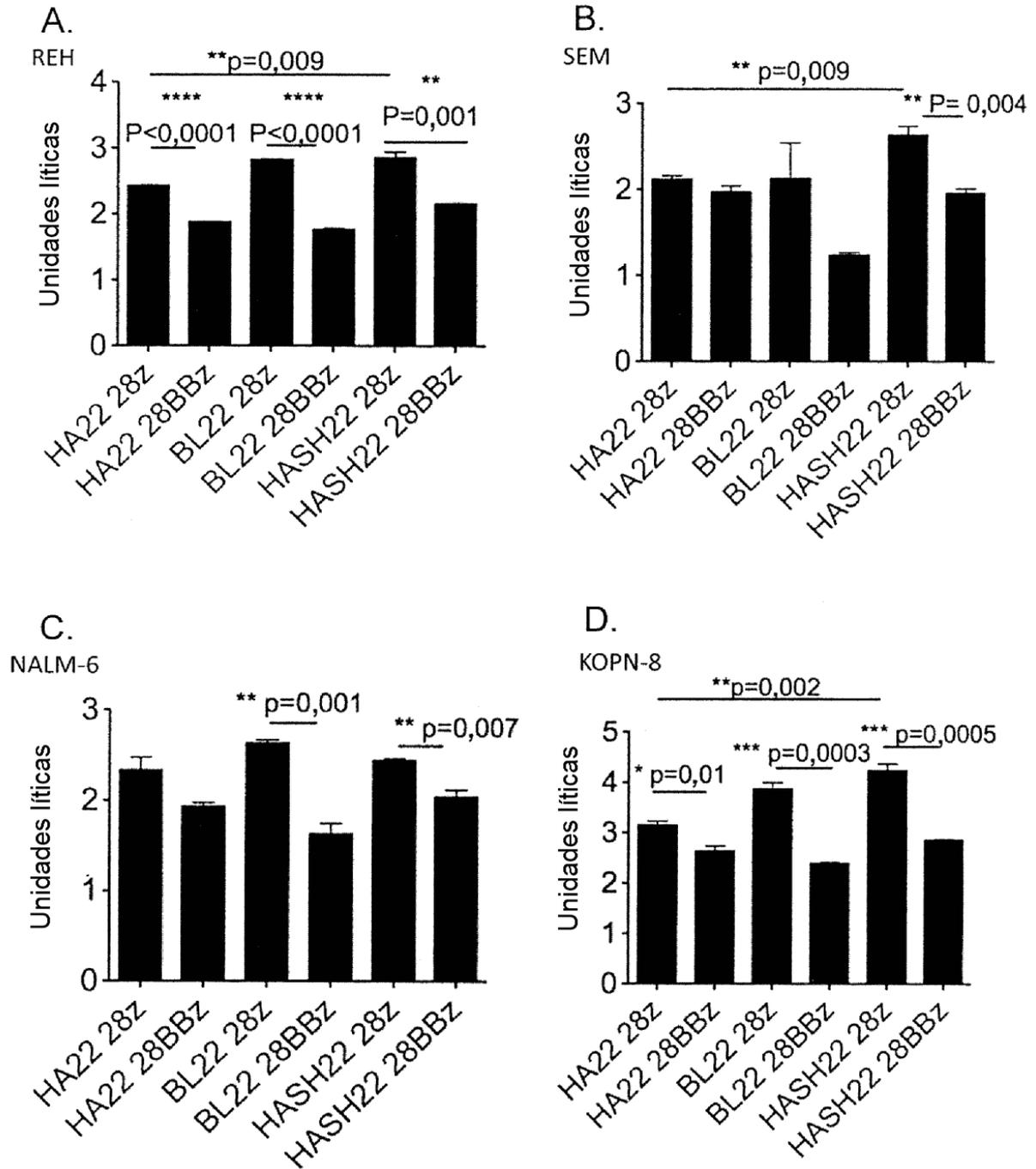


FIG. 8

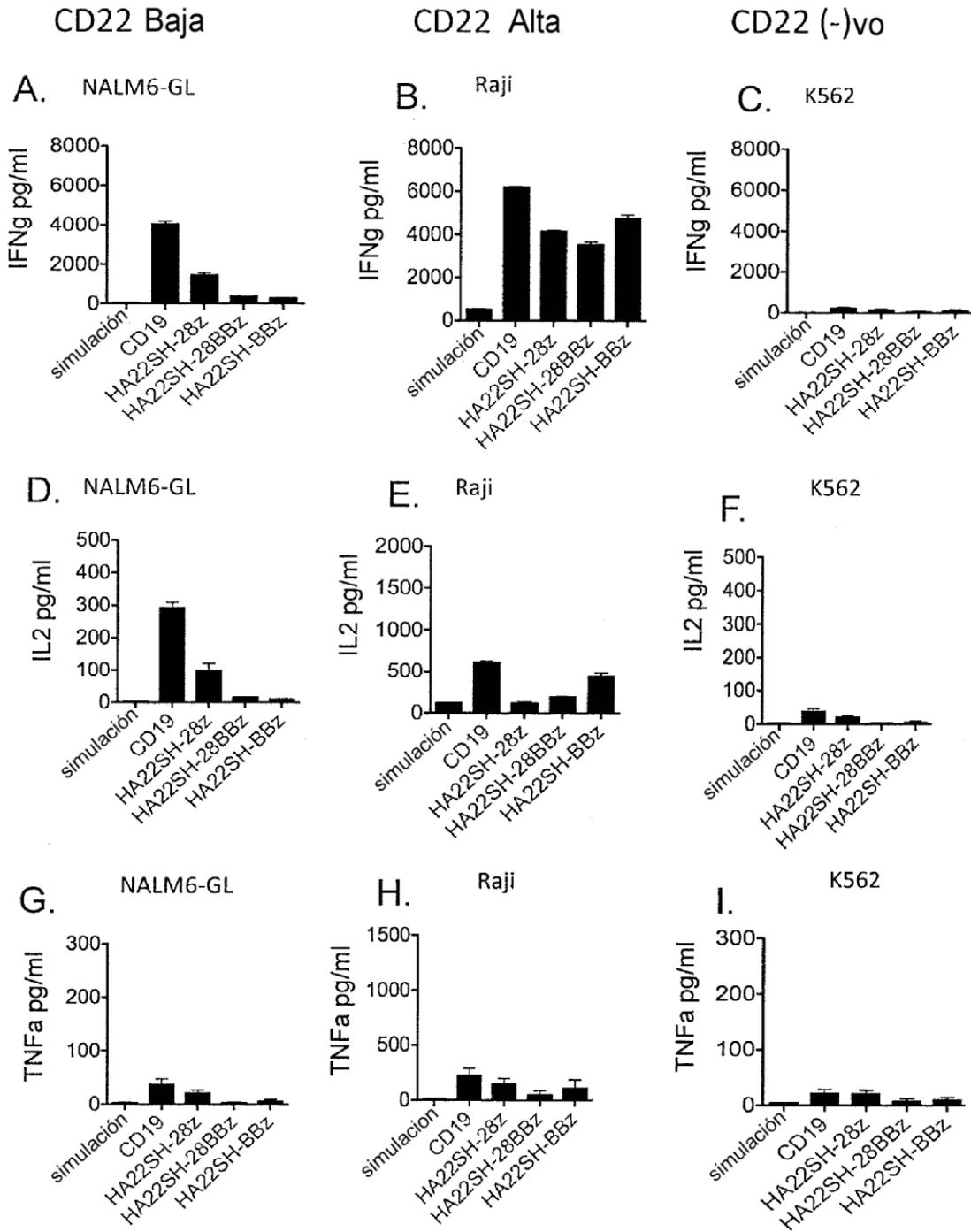


FIG. 9