

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 323**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**C12N 5/0783** (2010.01)  
**A61K 38/20** (2006.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2015.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 14185125 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2856876**

54 Título: **Expresión constitutiva de ligandos coestimuladores en linfocitos T transferidos de manera adoptiva**

30 Prioridad:

**30.03.2007 US 921144 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.04.2018**

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER  
CENTER (100.0%)  
1275 York Avenue  
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**SADELAIN, MICHEL y  
STEPHAN, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 663 323 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

Expresión constitutiva de ligandos coestimuladores en linfocitos T transferidos de manera adoptiva

5 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de próstata es el cáncer más frecuente en hombres en los Estados Unidos y es la causa de cerca de 31.000 muertes cada año. Cuando se diagnostica de manera precoz, el cáncer puede tratarse de manera eficaz por cirugía o radiación. La enfermedad residual posquirúrgica requiere radiación y/o terapia hormonal, que pueden impedir la progresión del tumor y la metástasis tumoral. En la actualidad, no hay tratamiento curativo para el cáncer de próstata metastásico resistente a hormonas. La inmunoterapia es una terapia dirigida que, en principio, posibilita el tratamiento de dichos cánceres. Sigue habiendo obstáculos para inducir la inmunidad tumoral, lo que requiere la expansión de linfocitos T citotóxicos en cantidades suficientes para actuar como mediadores en el rechazo de tumores. Entre los mecanismos que limitan la sensibilización eficaz de los linfocitos T y el rechazo de tumores está la ausencia intrínseca de ligandos coestimuladores en muchos tumores malignos.

Kowolik *et al.* (2005 y 2006) se refieren a la coestimulación de CD28 proporcionada a través de un receptor de antígeno quimérico específico de CD19 y a la persistencia y eficacia antitumoral potenciadas *in vivo* de los linfocitos T transferidos de manera adoptiva.

Maus *et al.* (2002) se refieren a la expansión *ex vivo* de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y policlonales mediante las APC (células presentadoras de antígenos) artificiales que expresan ligandos para el receptor de linfocitos T, CD28 y 4-1BB.

Grosenbach *et al.* (2003) se refieren a un vector recombinante que expresa transgenes para cuatro moléculas coestimuladoras de linfocitos T (OX40L, B7-1, ICAM-1, LFA-3) que inducen la activación sostenida de linfocitos T CD4+ y CD8+, protección de apoptosis y producción potenciada de citocinas.

Gade *et al.* (2005) se refieren a la eliminación dirigida del cáncer de próstata por linfocitos T humanos dirigidos genéticamente.

Brentjens *et al.* (2003) se refieren a la erradicación de tumores de linfocitos B sistémicos por linfocitos T humanos dirigidos genéticamente, coestimulados por CD80 e interleucina-15.

35 **Sumario de la invención**

La presente divulgación proporciona en general células inmunosensibles, incluyendo linfocitos T y linfocitos Citolíticos Naturales (NK, del inglés *Natural Killer*), que expresan al menos uno de un receptor reconocedor de antígenos y un ligando coestimulador y métodos de uso de los mismos para el tratamiento de neoplasia, enfermedad infecciosa y otras patologías.

En un aspecto, la divulgación proporciona en general una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno y un ligando coestimulador exógeno.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un linfocito T específico de virus que expresa un vector (por ejemplo, un vector de expresión) que codifica un polipéptido seleccionado de uno cualquiera o más de: CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 y CD30L. En un ejemplo, el linfocito T específico de virus reconoce un virus seleccionado de uno cualquiera o más de: citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y antígenos de virus de la gripe.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona un linfocito T específico de antígeno tumoral que expresa un vector que codifica un polipéptido recombinante seleccionado del grupo que consiste en CD80 y 4-1BBL y un receptor de antígeno recombinante que se une a un antígeno. En una realización, la célula expresa CD80 y 4-1BBL. En otra realización, el vector es un virus retroviral (por ejemplo, gamma-retroviral o lentiviral); pudiendo ser también este vector no viral.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona un método de modulación de una respuesta inmunitaria en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible de cualquier aspecto previo. En un ejemplo, el método aumenta o reduce una respuesta inmunitaria. En otro ejemplo, el método aumenta la autotolerancia o aumenta la tolerancia a un trasplante de órgano.

En otro aspecto más, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el linfocito T de la invención para el tratamiento o la prevención de una neoplasia en un paciente, comprendiendo el tratamiento/prevención administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno tumoral y un vector que codifica un ligando coestimulador. En una realización, la neoplasia se selecciona de uno cualquiera o más de: cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama y glioblastoma. En

otra realización, el antígeno tumoral es el antígeno de membrana específico de próstata, CD19, NY-ESO-1, WT-1, hTERT o mesotelina.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para imponer tolerancia en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno y a un vector que codifica un ligando coestimulador. En una realización, el método impide o reduce una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad asociada a un trasplante alogénico.

10 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de una infección por patógenos en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno vírico y un vector que codifica un ligando coestimulador. En un ejemplo, el patógeno es un virus, una bacteria, un hongo, un protozoo o un parásito. En otro ejemplo, el virus se selecciona de uno cualquiera o más de: citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la gripe. En otra realización más, la célula es un linfocito T, un linfocito citolítico natural (NK) o un linfocito T citotóxico (CTL, del inglés *Cytotoxic T Lymphocyte*).

15 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un método para producir una célula inmunosensible específica de antígeno, comprendiendo el método introducir en la célula inmunosensible una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico, en el que el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a antígeno acoplado a un dominio de señalización intracelular que activa una célula inmunosensible. En una realización, la célula inmunosensible es un linfocito T, un CTL o linfocito NK. En otra realización, el dominio de unión a antígeno es un dominio de unión a antígeno tumoral. En otra realización más, el antígeno tumoral es el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, del inglés *Prostate Specific Membrane Antigen*). En otra realización más, el dominio de señalización intracelular activa un linfocito T, un CTL o un linfocito NK. En otra realización más, el dominio de señalización intracelular es el dominio de señalización de cadena  $\zeta$ .

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de una neoplasia en un paciente que lo necesite, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito T que comprende un antígeno tumoral y un complejo presentador de antígenos que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona de uno cualquiera o más de: un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *Tumor Necrosis Factor*) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y sus combinaciones, tratando de este modo el cáncer en el paciente.

30 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de una neoplasia en un paciente, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito Citolítico Natural (NK) que comprende un antígeno tumoral y un complejo presentador de antígenos que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona de uno cualquiera o más de: un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y sus combinaciones, tratando de este modo el cáncer en el paciente. En una realización el ligando de TNF se selecciona de uno cualquiera o más de: 4-1BBL, OX40L, CD70, CD30L y LIGHT. En otra realización, el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona de CD80 y CD86. En otra realización más, la célula expresa al menos dos ligandos coestimuladores, en los que uno es un ligando de TNF (por ejemplo, 4-1BBL) y el otro es un ligando de superfamilia de Ig (por ejemplo, CD80).

40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa en el paciente que lo necesite, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito T que comprende un receptor específico para un antígeno vírico y un complejo presentador de antígenos que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona de uno cualquiera o más de: un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y sus combinaciones, tratando de este modo la enfermedad infecciosa en el paciente.

50 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito Citolítico Natural (NK) que comprende un receptor específico para un antígeno vírico y un complejo presentador de antígenos que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona de uno cualquiera o más de: un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y sus combinaciones, tratando de este modo la enfermedad infecciosa en el paciente. En un ejemplo, el paciente es un paciente inmunocomprometido. En otra realización, el ligando de TNF se selecciona de uno cualquiera o más de: 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L. En otra realización más, el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona de uno cualquiera o más de: CD80 y CD86. En otra realización más, los al menos dos ligandos coestimuladores son un ligando de TNF y un ligando de la superfamilia de Ig. En otra realización, el ligando de TNF es 4-1BBL y el ligando de la superfamilia de Ig es CD80. En otra realización, el complejo de reconocimiento antigénico se expresa de manera constitutiva en la superficie de la célula. En otra realización, el antígeno vírico es un antígeno específico de citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus de la gripe. En otra realización, los al menos dos ligandos

coestimuladores se expresan de manera constitutiva en la superficie de la célula.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del linfocito T como se define en las reivindicaciones, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 En otro aspecto, la invención proporciona la composición farmacéutica para el tratamiento de una neoplasia, que comprende una cantidad eficaz del linfocito T específico de antígeno tumoral como se define en las reivindicaciones.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección por patógenos, que comprende una cantidad eficaz de un linfocito T específico de virus del aspecto previo en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, la composición comprende además una citocina seleccionada de uno cualquiera o más de: IL-2, IL-3, IL-6, EL-11, IL7, IL12, IL15, IL21, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón alfa, beta o gamma y eritropoyetina.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un linfocito T que comprende un receptor de antígeno recombinante, que se une a un antígeno; y un ligando coestimulador recombinante, que es CD80 o 4-1BBL para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene neoplasia, un trastorno autoinmunitario o un trasplante alogénico.

20 En diversas realizaciones de cualquier aspecto previo, el método comprende además la etapa de obtener la célula inmunosensible o el ligando coestimulador. En otras realizaciones más de los aspectos previos, el ligando coestimulador se expresa de manera constitutiva o inducible. En otras realizaciones más de los aspectos previos, al menos dos ligandos coestimuladores se expresan de manera constitutiva. En diversas realizaciones de cualquier aspecto previo, la célula se selecciona de una cualquiera o más de: un linfocito T, un linfocito Citolítico Natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL) y un linfocito T regulador. En otras realizaciones más de los aspectos previos, el antígeno es un antígeno tumoral o patógeno, por ejemplo, uno cualquiera o más de: antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno carcinoembrionario (CEA), ILBRalfa, her-2, CD19, NY-ESO-1, VIH-1 Gag, Lewis Y, Mart-1, gp100, tirosinasa, WT-1, hTERT, mesotelina. La célula expresa un receptor de antígeno recombinante. El ligando coestimulador es el ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) (4-BBL) o el ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) (CD80). En otras realizaciones más de los aspectos previos, la célula inmunosensible expresa al menos un ligando de TNF y al menos un ligando de la superfamilia de Ig. En otras realizaciones más de los aspectos previos, la célula expresa 4-1BBL y CD80. En otras realizaciones más de los aspectos previos, un complejo presentador de antígenos y/o ligandos coestimuladores se expresan de manera constitutiva o inducible en la superficie del linfocito T. En otras realizaciones más de los aspectos previos, el ligando coestimulador se expresa en un vector retroviral. En otra realización, el antígeno tumoral es el antígeno de membrana específico de próstata, CD19, NY-ESO-1, WT-1 o hTERT. En otras realizaciones más, la célula expresa un receptor recombinante o uno endógeno para el antígeno. En otras realizaciones más, el ligando coestimulador es un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) o un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig). En otras realizaciones más, el ligando de TNF se selecciona de uno cualquiera o más de: 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L. En diversas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es un dominio de señalización de cadena ζ. En otras realizaciones, a través de un receptor de antígenos modificado por ingeniería genética se proporciona una señal coestimuladora y la otra a través de la sobreexpresión de un ligando coestimulador. En otras realizaciones más, el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona del grupo que consiste en CD80 y CD86.

#### 45 **Definiciones**

Por "polipéptido CD80" se entiende una proteína que tiene una identidad de al menos 85 % con la referencia del NCBI N. °: NP\_005182, o un fragmento de la misma, que actúa como un ligando de la superfamilia de Ig.

50 Por "molécula de ácido nucleico CD80" se entiende cualquier polinucleótido que codifica un polipéptido CD80. Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico CD80 es NM\_005191.

Por "polipéptido 4-1BBL", se entiende una proteína que tiene una identidad de al menos 85 % con la referencia del NCBI N. °: P41273 o NP\_001552, o un fragmento de la misma, que actúa como un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF).

55 Por "molécula de ácido nucleico 4-1BBL" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido 4-1BBL.

60 Por "polipéptido OX40L" se entiende una proteína que tiene una identidad de al menos 85 % con la referencia del NCBI N. °: BAB18304 o NP\_003317, o un fragmento de la misma, que es un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF).

Por "molécula de ácido nucleico OX40L" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido OX40L.

65 Por "polipéptido CD70" se entiende una proteína que tiene una identidad de al menos 85 % con la referencia del NCBI N. °: NP\_001243, o un fragmento de la misma, que actúa como un ligando del factor de necrosis tumoral

(TNF).

Por "molécula de ácido nucleico CD70" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido CD70.

5 Por "polipéptido Light" se entiende una proteína que tiene una identidad de al menos 85 % con la referencia del NCBI N. °: NP\_742011, o un fragmento de la misma, que actúa como un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF).

Por "molécula de ácido nucleico Light" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido Light.

10 Por "polipéptido CD30L" se entiende una proteína que tiene una identidad de al menos 85 % con la referencia del NCBI N. °: AAB97877, o un fragmento de la misma, que actúa como un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF).

Por "molécula de ácido nucleico CD30L" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido CD30L.

15 Por "polipéptido CD86" se entiende una proteína que tiene una identidad de al menos 85 % con la referencia del NCBI N. °: P42081, o un fragmento de la misma, que actúa como un ligando de superfamilia de Ig.

Por "molécula de ácido nucleico CD86" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido CD86.

20 Por "polipéptido Pzl" se entiende una proteína que tiene una identidad de al menos 85 % con la proteína descrita por Gong *et al.*, Neoplasia 1: 123-7, 1999, o un fragmento de la misma.

25 Por "polipéptido P28z" se entiende una proteína que tiene una identidad de al menos 85 % con la proteína descrita por Maher *et al.* Nature Biotechnology, vol 20, enero de 2002, 70-75, o un fragmento de la misma. Maher *et al.* Nature Biotechnology, vol 20, enero 2002, 70-75, también describen el dominio de señalización de cadena  $\zeta$ .

30 Las moléculas de ácido nucleico útiles en los métodos de la divulgación incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo. No es necesario que dichas moléculas de ácido nucleico sean al 100 % idénticas con una secuencia de ácido nucleico endógena, pero normalmente mostrarán identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen "identidad sustancial" con una secuencia endógena son normalmente capaces de hibridar con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Por "hibridar", se entiende emparejarse para formar una molécula bicatenaria entre secuencias polinucleotídicas complementarias (por ejemplo, un gen descrito en el presente documento), o partes de la misma, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152: 399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152: 507).

35 Por ejemplo, la concentración salina rigurosa será habitualmente menor de aproximadamente NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, preferentemente menor de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM, y más preferentemente menor de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. Puede obtenerse hibridación de baja rigurosidad en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que puede obtenerse hibridación de alta rigurosidad en presencia de al menos aproximadamente el 35 % de formamida y más preferentemente al menos aproximadamente el 50 % de formamida. Las condiciones rigurosas de temperatura incluirán habitualmente temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 37 °C y lo más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C. Los expertos en la materia conocen bien diversos parámetros adicionales, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato sódico (SDS) y la inclusión o exclusión de ADN vehículo. Combinando estas diversas condiciones según sea necesario, se consiguen diversos niveles de rigurosidad. En una realización preferida, la hibridación se producirá a una temperatura de 30 °C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y SDS al 1 %. En un ejemplo más preferido la hibridación se producirá a una temperatura de 37 °C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, SDS al 1 %, formamida al 35 % y ADN de esperma de salmón (ADNss) desnaturalizado 100 µg/ml. En un ejemplo más preferido, la hibridación se producirá a una temperatura de 42 °C en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, SDS al 1 %, formamida al 50 % y ADNss 200 µg/ml. Para los expertos en la materia resultarán obvias variaciones útiles en estas condiciones.

40 Para la mayoría de las aplicaciones, la rigurosidad de las etapas de lavado después de la hibridación también variará. Las condiciones de rigurosidad del lavado pueden definirse por la concentración salina y la temperatura. Como se ha indicado anteriormente, la rigurosidad de las etapas de lavado puede aumentarse reduciendo la concentración salina o aumentando la temperatura. Por ejemplo, la concentración salina rigurosa para las etapas de lavado será preferentemente menor de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato trisódico 3 mM y más preferentemente menor de aproximadamente NaCl 15 mM y citrato trisódico 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado incluirán habitualmente una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 68 °C. En una realización preferida, las etapas de lavado se producirán a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM y SDS al 0,1 %. En un ejemplo más preferido, las etapas de lavado se producirán a 42 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM, y SDS al 0,1 %. En un ejemplo más preferido, las

etapas de lavado se producirán a 68 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM y SDS al 0,1 %. Para los expertos en la materia resultarán fácilmente obvias variaciones adicionales sobre estas condiciones. Los expertos en la materia conocen bien técnicas de hibridación y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (Science 196: 180, 1977); Grunstein y Hogness (Proc. Nati. Acad. Sci., USA 72: 3961, 1975); Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

Por “sustancialmente idéntico(a)” se entiende un polipéptido o una molécula de ácido nucleico que muestra una identidad de al menos 50 % con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento) o una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento). Preferentemente, dicha secuencia tiene una identidad de al menos 60 %, más preferentemente de 80 % o de 85 %, y más preferentemente de 90 %, 95 % o incluso de 99 %, a nivel de aminoácidos o de ácido nucleico, con la secuencia utilizada para comparar.

La identidad de secuencia se mide normalmente utilizando programas informáticos de análisis de secuencias (por ejemplo, el paquete de programa Informático de análisis de secuencias del grupo Genetics Computer, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, los programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX) Dicho programa informático empareja secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservativas normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un ejemplo de estrategia para determinar el grado de identidad, puede utilizarse un programa BLAST, indicando una puntuación de probabilidad entre e-3 y e-100, una secuencia estrechamente relacionada.

Por “análogo” se entiende un polipéptido o una molécula de ácido nucleico relacionado(a) estructuralmente que tiene la función de un polipéptido o de una molécula de ácido nucleico de referencia.

El término “ligando”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que se une a un receptor. En particular, el ligando se une a un receptor en otra célula, permitiendo el reconocimiento entre células.

La expresión “expresión constitutiva”, como se usa en el presente documento, se refiere a expresión en todas las condiciones fisiológicas.

La expresión “receptor de antígeno quimérico” (CAR, del inglés *Chimeric Antigen Receptor*), como se usa en el presente documento, se refiere a un dominio de unión a antígeno tumoral que se fusiona con un dominio de caracterización intracelular capaz de activar linfocitos T. Más habitualmente, el dominio de unión extracelular de CAR procede de un anticuerpo monoclonal murino o humanizado.

Por “enfermedad” se entiende cualquier afección o trastorno que dañe, o interfiera con, la función normal de una célula, un tejido o un órgano. Los ejemplos de enfermedades incluyen neoplasia o infección de la célula por patógenos.

Por “cantidad eficaz” se entiende una cantidad suficiente para detener, mejorar o inhibir la proliferación, el crecimiento o la metástasis ininterrumpidos (por ejemplo, invasión o migración) de una neoplasia.

Por “imponer tolerancia” se entiende prevenir la actividad de células autorreactivas o inmunosensibles que se dirigen a órganos o a tejidos trasplantados.

Por “exógeno(a)” se entiende una molécula de ácido nucleico o polipéptido que no está presente de manera endógena en la célula, o que no está presente a un nivel suficiente para conseguir los efectos funcionales obtenidos cuando se sobreexpresa. El término “exógeno(a)” abarcaría por tanto cualquier molécula de ácido nucleico recombinante o polipéptido que se expresa en una célula, tal como moléculas de ácido nucleico y polipéptidos extraños, heterólogos y sobreexpresados.

Por “molécula de ácido nucleico o polipéptido heterólogo” se entiende una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADNc, ADN o ARN) o un polipéptido que no está normalmente presente en una célula o muestra obtenida de una célula. Este ácido nucleico puede ser de otro organismo, o puede ser, por ejemplo, una molécula de ARNm que no se expresa normalmente en una célula o muestra.

Por “célula inmunosensible” se entiende una célula que actúa en una respuesta inmunitaria o en un progenitor, o descendencia del mismo.

Por “célula aislada” se entiende una célula que está separada de los componentes moleculares y/o celulares que acompañan de manera natural a la célula.

5 La expresión “dominio de unión a antígeno tumoral”, como se usa en el presente documento, se refiere a un dominio capaz de unirse específicamente a un determinante antigénico particular o a un conjunto de determinantes antigénicos presentes en un tumor.

10 El término “obtener” como en “obtener el agente” pretende incluir comprar, sintetizar o adquirir de otra manera el agente (o la sustancia o material indicados).

10 Por “modular” se entiende alterar de manera positiva o negativa. Como ejemplo de modulaciones se incluye un cambio del 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 %.

15 Por “neoplasia” se entiende una enfermedad caracterizada por la proliferación patológica de una célula o tejido y su posterior migración a, o invasión de, otros tejidos u órganos. El crecimiento neoplásico es normalmente incontrolado y progresivo, y se produce en condiciones que no suscitarían, o provocarían el cese de, la multiplicación de células normales. Las neoplasias pueden afectar a diversos tipos de células, tejidos u órganos, incluyendo pero sin limitación, un órgano seleccionado del grupo que consiste en vejiga, hueso, cerebro, mama, cartílago, glia, esófago, trompas de Falopio, vesícula biliar, corazón, intestino, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, tejido nervioso, 20 ovarios, páncreas, próstata, músculo esquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, tracto urogenital, uréter, uretra, útero y vagina, o un tejido o tipo de célula de los mismos. Las neoplasias incluyen cánceres, tales como sarcomas, carcinomas o plasmacitomas (tumor maligno de las células plasmáticas). Las neoplasias ilustrativas para las que puede usarse la invención incluyen, pero sin limitación, leucemias (por ejemplo, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, 25 leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin), macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, 30 linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, 35 seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). En una realización, los métodos de exploración de la invención identifican composiciones que son útiles para el tratamiento del cáncer de 40 mama o de pulmón.

Por “receptor” se entiende un polipéptido, o parte del mismo, presente en una membrana celular que se une selectivamente a uno o más ligandos.

45 Por “reconocer” se entiende unirse selectivamente a una diana. Un linfocito T que reconoce un virus expresa normalmente un receptor que se une a un antígeno expresado por el virus.

50 Por “patógeno” se entiende un virus, una bacteria, un hongo, un parásito o un protozoo capaz de provocar una enfermedad.

Como ejemplos de virus se incluyen, pero sin limitación, *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HDTV-III, LAVE o HTLV-III/LAV), o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP; *Picomaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, Coxsackievirus humano, rinovirus, ecovirus), *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que provocan gastroenteritis), *Togaviridae* (por 55 ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola), *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus paragripal, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincicial); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bunyaviridae* (por ejemplo, Hantavirus, Bungavirus, flebovirus y Nairovirus); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la Hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (papilomavirus, polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus variolovacunal, poxvirus); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1 = transmitido por vía interna; clase 2 = transmitido por vía parenteral (es decir hepatitis C); virus de tipo 65

Norwalk y relacionados, y astrovirus).

Como ejemplos de bacterias se incluyen, pero sin limitación, especies de *Pasteurella*, *Staphylococci*, *Streptococcus*, la especie *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y *Salmonella*. Como ejemplos específicos de bacterias infecciosas se incluyen, pero sin limitación, *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* de Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* de Grupo B), *Streptococcus* (del grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, patógenos *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenuis*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*.

Por “se une específicamente” se entiende un polipéptido, o fragmento del mismo, que reconoce y se une a un polipéptido de interés, pero que no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye de manera natural un polipéptido de la invención.

La expresión “antígeno tumoral”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polipéptido expresado por un tumor que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria.

Por “antígeno vírico” se entiende un polipéptido expresado por un virus que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria.

Se pretende que las expresiones “comprende”, “que comprende” tengan el significado amplio aplicado a ellas en la Ley de Patentes de Estados Unidos y pueden significar “incluye”, “que incluye” y expresiones similares.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” se refiere a intervención clínica en un intento de modificar el transcurso de la enfermedad del individuo o célula que se trate, y puede realizarse para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos terapéuticos de tratamiento incluyen, sin limitación, evitar la aparición o la recurrencia de enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar metástasis, reducir la tasa de progresión de enfermedad, la mejoría o alivio de la patología y remisión o pronóstico mejorado. Impidiendo la progresión de una enfermedad o de un trastorno, un tratamiento puede impedir el deterioro debido a un trastorno en un paciente afectado o diagnosticado o en un paciente que se sospecha que tiene el trastorno, pero un tratamiento también puede impedir la aparición del trastorno o de un síntoma del trastorno en un paciente que está en riesgo de tener el trastorno o que se sospecha que tiene el trastorno.

El término “paciente”, como se usa en el presente documento, se refiere a un vertebrado, preferentemente, un mamífero, más preferentemente, un ser humano.

El término “inmunocomprometido”, como se usa en el presente documento, se refiere a un paciente que tiene una inmunodeficiencia. El paciente es muy vulnerable a infecciones oportunistas, infecciones provocadas por organismos que habitualmente no provocan enfermedades en una persona con un sistema inmunitario sano, pero que pueden afectar a personas con un sistema inmunitario deprimido o que funcione mal.

En la siguiente divulgación se describen otros aspectos de la invención y se incluyen en el ámbito de la misma

#### 50 Breve descripción de las figuras

La siguiente Descripción Detallada proporcionada como ejemplo, pero que no pretende limitar la invención a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse junto con los dibujos acompañantes.

Las Figuras 1a-1f muestran que la coexpresión de CD80 y 4-1BBL en linfocitos T humanos induce respuestas proliferativas contundentes después de estimulaciones cíclicas a través de su receptor de linfocitos T endógeno o a través de un receptor de antígeno quimérico sin coestimulación proporcionada por células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *antigen presenting cell*). Se activaron  $0,4 \times 10^6$  linfocitos T humanos purificados con anticuerpos contra CD3 (OKT3) y se cuantificó la expansión de los linfocitos T que se transdujeron por retrovirus con CD80, 4-1BBL, la combinación de los dos o un vector de control (Figura 1a, b). Las eficiencias de la transducción se evaluaron por análisis FACS 48 horas después de la transferencia génica (Figura 1a). En la Figura 1b se muestra un gráfico del recuento absoluto de linfocitos T CD8<sup>+</sup> transducidos con el ligando coestimulador indicado y estimulados semanalmente con 10 µg/ml de OKT3 unido a placa. La investigación se amplió a linfocitos T donadores de memoria específicos de Citomegalovirus (CMV) (Figuras 1c, d) y linfocitos T autólogos redirigidos genéticamente (Figuras 1e, f). Los linfocitos T específicos de la proteína pp65 de CMV, se ampliaron en poco tiempo en APC artificiales HLA-A\*0201<sup>+</sup> pp65<sup>+</sup> y se transdujeron con CD80, 4-1BBL, o con una combinación de los dos (Figura 1c). En la Figura 1d

se muestran recuentos absolutos de linfocitos CD8<sup>+</sup>pp65<sup>+</sup> enriquecidos y transducidos como se describe en c después de reestimulación semanal con células tumorales Caco-2 que presentan HLA-A\*0201<sup>+</sup> pp65. Para generar rápidamente linfocitos T humanos sensibles a cáncer de próstata (Figuras 1e, f), se transdujeron por retrovirus linfocitos T de sangre periférica con el receptor de antígeno quimérico Pz1 (Gade *et al.*, Cáncer Res. 65: 9080-9088, 2005), un receptor de antígeno no restringido por HLA específico para el antígeno tumoral PSMA. El receptor Pz1 comprende un fragmento de anticuerpo monocatenario que se une a PSMA fusionado con el dominio de señalización ζ de CD3 humano. En la Figura 1e, los linfocitos T CD3<sup>+</sup> humanos primarios se transdujeron por retrovirus con Pz1 en solitario o en combinación con CD80 y 4-1BBL. Las eficacias de transducción se evaluaron por análisis FACS. En la Figura 1f se muestra la expansión de linfocitos T humanos transducidos con Pz1 cocultivados semanalmente con monocapas de tumor LNCaP. Se expresaron ligandos coestimuladores en los linfocitos T (parte superior) o en las células tumorales (parte inferior). Las condiciones de activación respectivas se representan en dibujos mostrados en los paneles derechos de b, d y f. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Cada punto b, d y f representa la media ± e.t.m. (error típico de la media) de tres pocillos seleccionados aleatoriamente. El \* indica <math>10^4</math> células.

Las Figuras 2a-2c muestran la erradicación de tumores de carcinoma de próstata con antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, *prostate-specific membrane antigen*) establecidos en ratones Scid/beige por linfocitos T Pz1<sup>+</sup> transducidos con CD80 y 4-1BBL. La Figura 2a muestra la formación de imágenes bioluminiscentes *in vivo* y exploraciones de IRM (imagen por resonancia magnética) coronales correspondientes de tumores <sup>+</sup>PC3-PSMA con luciferasa de luciérnaga en ratones Scid/beige cuatro semanas después de la inoculación sistémica con  $4 \times 10^6$  células tumorales (día 0 del tratamiento con linfocitos T) y dieciocho días después de la transferencia adoptiva de  $4 \times 10^6$  linfocitos T CD8<sup>+</sup>Pz1<sup>+</sup> o Pz1<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>. Se inyectó el mismo número de linfocitos T portadores del receptor de antígeno quimérico 19z que se dirige a CD19 humano en el grupo de control. Se muestran imágenes en pseudocolor superpuestas sobre fotografías convencionales. Se muestran los mismos animales cuyas imágenes se tomaron antes y después del tratamiento utilizando captura de imágenes bioluminiscentes e IRM. Los dos ratones representan un total de  $n = 10$ . La Figura 2b muestra tres gráficas. Durante un período de tiempo de 28 días, la señal tumoral bioluminiscente se cuantificó por animal cada dos días. Las adquisiciones con píxeles saturados, aunque se incluyen en la figura para permitir la comparación visual directa entre grupos, no se utilizaron para la cuantificación de fotones sino que se repitieron a un tiempo de adquisición más corto. La gráfica muestra fotones/segundo/cm<sup>2</sup>/radio superficial (rs) frente a días después de inyección de linfocitos T. Cada línea corresponde a un animal representando cada punto el recuento de fotones promedio de la adquisición ventral y dorsal por animal en cualquier punto temporal dado. La supervivencia se ilustra en la curva de Kaplan-Meier en la figura 2c.

Las Figuras 3a-3d muestran una fuerte proliferación *in vivo*, aunque dependiente de antígeno tumoral, de linfocitos T CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>. La Figura 3a muestra la formación *in vivo* de imágenes bioluminiscentes comparativa de linfocitos T transferidos de manera adoptiva en ratones Scid/beige portadores de tumor PC3-PSMA los días 0, 8 y 18 después de la inyección de  $4 \times 10^6$  linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan luciferasa de elatérico (*click-luc*) transducidos con Pz1 o transducidos con Pz1<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> 4-1BBL<sup>+</sup>. Como un control de especificidad de antígenos, se infundió el mismo número de linfocitos T 19z<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>. El tratamiento con linfocitos T comenzó como se indica en la Figura 2, cuatro semanas después de la inyección sistémica de  $4 \times 10^6$  células tumorales PC3-PSMA. Los cinco ratones por grupo mostrados en cada panel representan un total de  $n = 8$ /grupo. Las adquisiciones con píxeles saturados, aunque se muestran en la figura para permitir la comparación visual directa, no se utilizaron para la cuantificación de fotones sino que se repitieron a un tiempo de adquisición más corto. La Figura 3b muestra tres gráficas. Durante un período de tiempo de dieciséis días, se recogieron intensidades de señal de luciferasa de elatérico a partir de la obtención de imágenes de bioluminiscencia secuencial cada 2 días después de la transferencia de linfocitos T. Cada línea representa un animal, mostrando cada punto el recuento de fotones promedio de la adquisición ventral y dorsal por animal en cualquier punto temporal dado. La Figura 3c muestra un análisis de FACS multicolor de una suspensión de células sueltas de pulmón, preparada a partir de un animal representativo al que se le han infundido linfocitos T Pz1<sup>+</sup> o Pz1<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>, 6 días después de la transferencia de linfocitos T. Las células se tiñeron con antisuero idiótipo específico para el receptor de antígeno quimérico Pz1. En la Figura 3d, se muestran los números de linfocitos T Pz1<sup>+</sup> pulmonares absolutos (recuentos celulares totales de células viables negativas al azul de Tripano x porcentajes de linfocitos T Pz1<sup>+</sup>). Los gráficos de barras mostrados representan la media ± e.t.m. de tres ratones. Las Figuras 4a-4f muestran la coestimulación de linfocitos T en cis como resultado de la **colocalización** de CD80, 4-1BBL y sus receptores CD28 y 4-1BB en la sinapsis inmunológica después de la formación de grupos de linfocitos T inducidos/ células tumorales. En las Figuras 4a-d, linfocitos T humanos de sangre periférica se transdujeron con Pz1 y se volvieron a estimular con células LNCaP-CD80 antes de una segunda transferencia génica con el vector bicistrónico que codifica la proteína de fusión dsRed-monómero-4-1BBL y CD80. Después del aislamiento magnético negativo de CD8<sup>+</sup>, los linfocitos T se marcaron con FITC-subunidad B de la toxina del cólera (BTC) y se incubaron con células tumorales LNCaP no modificadas o solos. Los conjugados fijados se permeabilizaron, se tiñeron con los antisueros indicados y se observaron con microscopía confocal. Aleatoriamente se seleccionaron grupos de linfocitos T-células LNCaP de tres experimentos independientes. Barras de escala, 10 μm. En los paneles inferiores a la derecha de las Figuras 4a y b se muestran los números de grupos con concentraciones claras del ligando coestimulador o receptor indicado en el punto de contacto de los linfocitos T con APC sobre al número total de grupos analizados.

La Figura 4a es un conjunto de diez micrografías confocales que ilustran la polarización de 4-1BBL expresado como una proteína de fusión ds-Red en combinación con CD80 en linfocitos T transducidos con Pz1CD8<sup>+</sup> en la sinapsis inmunológica. Durante 50 minutos, grupos de linfocitos T/células tumorales LnCaP se incubaron antes de su fijación, permeabilización e incubación con antisuero anti 4-1BB. En la Figura 4b, los grupos de linfocitos T - células tumorales fijados se incubaron con antisueros anti-CD80 y anti-CD28. De nuevo, se observó la colocación de CD80 con su receptor CD28 en la sinapsis inmunológica después de su encuentro con el antígeno tumoral. La Figura 4c ilustra la acumulación aumentada de granzima B en la sinapsis inmunológica. Esta acumulación depende de un acoplamiento funcional de 4-1BB por su ligando 4-1BBL, que se expresa en la misma superficie de linfocitos T. Como se muestra en las Figuras 4a, b, los linfocitos T humanos primarios se modificaron genéticamente. Como se indica, los vectores retrovíricos que codifican a Pz1 también expresan ARNph de control o ARNph que se dirige a 4-1BB bajo el control del promotor U6 en su repetición terminal larga (LTR, del inglés *Long Terminal Repeat*) 3' como se describe más adelante en el presente documento. Los conjugados celulares en la fila superior (ARNph de control Pz1<sup>+</sup>) y central (y ARNph de control Pz1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>dsred 4-1BBL<sup>+</sup>) representan linfocitos T transducidos y no transducidos con CD80<sup>+</sup>dsred4-1BBL, respectivamente, cultivados en el mismo pocillo y conjugados con LnCaP en el mismo portaobjetos de vidrio. La Figura 4d muestra el índice de reclutamiento relativo (IRR) y la intensidad relativa, calculada como se describe más adelante en el presente documento, de Granzima-B-Alexa 647 en la interfase de linfocito T- célula presentadora de antígeno. Los puntos de datos de cada grupo muestran el valor calculado de 35 conjugados analizados (símbolos) y sus medias (-) de tres experimentos independientes. \*P = 0,0001; \*\*P <0,0001. En las Figuras 4e, f se muestran ensayos de luciferasa - NF-κB en clones de linfocitos T únicos aislados. Estos resultados corroboran la autoestimulación como un mecanismo operador en el suministro de señales coestimuladoras. Un clon de linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>4-1BB-Jurkat con el que se transfirió de manera estable un indicador de luciferasa - NF-κB, se transdujo por retrovirus con un vector tricistrónico que coexpresaba 4-1BB, 4-1BBL y CD80 o un vector de control. Para impedir la coestimulación por vecindad, se subclonaron linfocitos T transducidos en placas de 96 pocillos revestidas con OKT-3 antes de la primera expresión en superficie detectable de proteínas codificadas. Doce horas después de la activación, la presencia de linfocitos T únicos se confirmó en los pocillos por microscopía y se midió la señal bioluminiscente de células sueltas. La Figura 4e muestra 36 adquisiciones de bioluminiscencia de linfocitos T únicos transducidos, ensambladas con el programa informático Adobe Illustrator. Las señales bioluminiscentes de células sueltas respectivas, se cuantificaron, se normalizaron a bioluminiscencia de fondo y se representaron en la Figura 4f.

Las Figuras 5a-5e muestran que los linfocitos T que presentan CD80 y 4-1BBL coestimulan en trans linfocitos T espectadores específicos de antígeno, no modificados, a través del contacto físico. La Figura 5a muestra un conjunto de 4 micrografías confocales de un linfocito T Pz1<sup>+</sup> acoplándose con una célula tumoral LnCaP mientras está en contacto físico entre linfocitos T con un linfocito T Pz1<sup>+</sup> espectador transducido con CD80 y dsRed-4-1BBL. Los grupos celulares se indujeron y analizaron como se describe en las Figuras 4a, b. Barras de escala, 10 μm. En las Figuras 5b-d, se transdujeron linfocitos T periféricos de un donante de HLA A2.1<sup>+</sup> seropositivo para citomegalovirus (CMV) con Pz1 o se cotransdujeron con Pz1, CD80 y 4-1BBL. En paralelo, linfocitos T citotóxicos (CTL) no modificados genéticamente, específicos de CMV, del mismo donante, se enriquecieron por cocultivo con células presentadoras de antígenos artificiales (AAPC, *artificial antigen presenting cell*) como se describe más adelante en el presente documento. Estas células se marcaron con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE). Se mezclaron linfocitos T Pz1<sup>+</sup> (Figura 5b) o Pz1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> (Figura 5c), clasificados con perlas con CTL pp65<sup>+</sup> sensibles a CMV expandidos a una relación de 1:1 y se expusieron a células tumorales Caco-2 irradiadas transducidas por retrovirus para presentar pp65 en superficie de una manera dependiente de HLA A2.1, así como PSMA de una manera independiente de HLA. Como alternativa, una membrana de tipo *Transwell* separó los linfocitos T Pz1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> de los linfocitos T pp65<sup>+</sup>, acoplados ambos con células tumores Caco-2 (Figura 5d). Las condiciones de cocultivo respectivas se representan en ilustraciones mostradas a la izquierda. Dos días después del contacto con el antígeno tumoral los niveles de Granzima B intracelular seleccionados en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se cuantificaron por análisis de FACS (columna central). En parte superior de cada perfil se resumen las intensidades de fluorescencia media (IFM) de las células presentadoras de antígenos (APC) - Granzima B de las subpoblaciones de linfocitos T CFSE<sup>-</sup> (Pz1<sup>+</sup>) y CFSE<sup>+</sup> (pp65<sup>+</sup>). El día 7 se analizaron por citometría de flujo diluciones de CFSE y Pz1<sup>+</sup> en comparación con fracciones de linfocitos T pp65<sup>+</sup> después de tinción con tetrámero de pp65 y CD8 (columna de la derecha). Las IFM-CFSE indicadas en la parte superior de cada perfil se basan en poblaciones de pp65<sup>+</sup> después de selección de CD8<sup>+</sup>. Los recuentos celulares totales de linfocitos T CD8<sup>+</sup> pp65<sup>+</sup> T después de los cultivos durante 7 días se representan gráficamente en la Figura 5e. Cada gráfico de barras representa la media ± e.t.m. de tres pocillos seleccionados al azar. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. En ningún punto del cocultivo se añadieron citocinas exógenas.

Las Figuras 6a y 6b muestran que la acumulación de linfocitos T redirigidos a PSMA transferidos de manera adoptiva en sitios tumorales, aumenta por linfocitos T Pz1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>, pero no 19z<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> en ratones Scid/beige. La Figura 6a muestra la formación doble de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* de luciferasa externa del copépodo *Gaussia* (x-gaus-luc) en tumores Raji y RM1. PGLS, así como de luciferasa de elatérico (*Clickbettle*) (Click-luc) en linfocitos T que se dirigen a un tumor. Dos semanas después de la inyección sistémica de 1 x 10<sup>6</sup> tumores Raji CD19<sup>+</sup> x-gaus-luc<sup>+</sup> y dos días después de la infusión posterior de 5 x 10<sup>5</sup> células tumorales RM1.PGLS PS-MA<sup>+</sup> x -gaus-luc<sup>+</sup> en los mismos animales, los tumores establecidos en la médula ósea (Raji) y pulmón (RM1) se trataron con una combinación de tres poblaciones celulares de linfocitos T transducidos como se ha indicado. Cada animal recibió un total de 12 x 10<sup>6</sup> linfocitos T CD8<sup>+</sup> receptor del antígeno quimérico<sup>+</sup> (4 x 10<sup>6</sup> linfocitos T/condición

- de transducción). Cabe destacar que la población de linfocitos T enumerada en tercer lugar (Pz1<sup>+</sup>, Pz1<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> 4-IBBL<sup>+</sup>, 19z<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> 4-IBBL<sup>+</sup>, fila izquierda, central y derecha respectivamente) se inyectó doce horas después de la inyección combinada de linfocitos T enumerados en primer y segundo lugar para evitar la interacción entre linfocitos T en el pulmón debido a la acumulación y no como resultado de la unión al antígeno tumoral selectivo. En los puntos temporales indicados, las células tumorales x-gaus-luc<sup>+</sup> o los linfocitos T marcados con click-luc<sup>+</sup>, se supervisaron mediante obtención de imágenes bioluminiscentes. El día 0 y el día 4, un período de tiempo de al menos 4 horas entre la formación de imágenes las células tumorales y de linfocitos, garantizó que la señal bioluminiscente volviese a los niveles de fondo. Se obtuvieron imágenes de un número total de n = 5 ratones Scid/beige por grupo de tratamiento. La Figura 5b muestra una serie de 6 gráficas que cuantifican las intensidades de señal de la luciferasa de elatérico a partir de la obtención de imágenes de bioluminiscencia secuencial cada día después de la transferencia de linfocitos T durante un período de tiempo de cuatro días. Cada línea representa un animal mostrando cada punto el recuento de fotones promedio medido sobre el área pulmonar (parte superior) o sobre los dos fémures (parte inferior), respectivamente en cualquier punto temporal dado.
- La Figura 7 muestra que CD80 y 4-1BBL expresados en linfocitos T duales inducen la expansión de linfocitos T superior en comparación con elementos de señalización de CD28 y/o 4-1BB fusionados en serie con el dominio de señalización  $\zeta$  del receptor de antígeno quimérico Pz1. Los linfocitos T primarios se transdujeron con Pz1, P28z (Maher *et al.*, Nature Biotechnology, vol 20, ene 2002, 70-75), que contenía el dominio de señalización de CD28 en serie con la cadena  $\zeta$ , o P284-IBBz que incluye regiones de señalización tanto de CD28 como de 4-1BB. Como alternativa, los linfocitos T se cotransdujeron con P28z y 4-1BBL (indicado como P28Z<sup>+</sup> 4-1BBL). Pz1<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> 4-1BBL se refiere a linfocitos T Pz1<sup>+</sup> que coexpresan ambos ligandos, CD80 y 4-1BBL. Los linfocitos T transducidos se estimularon semanalmente (indicado con flechas) en monocapas de células tumorales LNCaP en las condiciones representadas con detalle en la Figura 1. El factor de expansión de la población de linfocitos T humanos transducidos con Pz1 CD8<sup>+</sup> se representa gráficamente.
- La Figura 8 proporciona las secuencias de aminoácidos de CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L.

#### Descripción detallada de la invención

- La presente divulgación proporciona en general células, incluyendo células inmunosensibles modificadas genéticamente (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos Citolíticos Naturales (NK), linfocitos T citolíticos (CTL)) que expresan al menos uno de un receptor de reconocimiento antigénico y un ligando coestimulador y métodos de uso de los mismos para el tratamiento de neoplasia y otras patologías en las que se desea un aumento en una respuesta inmunitaria específica de antígeno. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la expresión retroviral constitutiva de CD80 y 4-1BBL en linfocitos T humanos cotransducidos que se dirigen al antígeno de membrana específico de próstata, generaba una fuerte proliferación de linfocitos T dependiente de antígeno tumoral acompañada de un intenso rechazo *in vivo* de tumores de carcinoma de próstata diseminados, bien establecidos. Además, los linfocitos T que expresaban CD80 y 4-1BBL proporcionaron coestimulación de linfocitos T espectadores en trans de una manera dependiente de contacto y específica de antígeno en el lugar del tumor. Considerado en su conjunto, el concepto de linfocitos T modificados genéticamente como un conjunto constitutivo de ligandos coestimuladores para coestimularse a sí mismos, de manera óptima, además de potenciar la inmunogenicidad dentro del microambiente tumoral, representa un avance significativo sobre la terapia convencional con linfocitos T transferidos de manera adoptiva. Además, como se demuestra *ex vivo* utilizando linfocitos T específicos de CMV enriquecidos, este enfoque no se limita al tratamiento de neoplasias, sino que es susceptible de una amplia serie de aplicaciones en las que se desea aumentar la respuesta inmunitaria específica de antígeno, incluyendo dichas aplicaciones no solamente el tratamiento de neoplasias, sino también la potenciación de una respuesta inmunitaria contra una infección causada por patógenos o una enfermedad infecciosa y reforzar la inmunotolerancia en linfocitos T reguladores en el contexto de autoinmunidad o trasplante alogénico.

#### 50 Estirpes de células hematopoyéticas

- Las células hematopoyéticas (sanguíneas) de mamífero proporcionan una serie de diversas actividades fisiológicas. Las células hematopoyéticas se dividen en estirpe linfoide, mieloide y eritroide. La estirpe linfoide, que comprende linfocitos B, T y citolíticos naturales (NK), posibilita la producción de anticuerpos, la regulación del sistema inmunitario celular, la detección de agentes extraños en la sangre, la detección de células extrañas en el hospedador y similares. La expresión "linfocitos T", como se usa en el presente documento, se refiere a linfocitos que maduran en el timo y que son principalmente responsables de la inmunidad mediada por células. Los linfocitos T están implicadas en el sistema inmunoadaptativo. La expresión "linfocitos citolíticos naturales (NK, del inglés *natural killer*)", como se usa en el presente documento, se refiere a linfocitos que son parte de la inmunidad mediada por células y que actúan durante la respuesta inmunitaria innata. No requieren activación previa para realizar su efecto citotóxico en las células diana. Los linfocitos T citotóxicos (CTL o linfocitos T citolíticos) son un subconjunto de linfocitos T que pueden inducir la muerte de células tumorales o somáticas infectadas.

### Células para su uso en los métodos de la divulgación

La presente divulgación proporciona células que expresan al menos uno de un receptor de reconocimiento antigénico y un ligando coestimulador y métodos de uso de dichas células para el tratamiento de una enfermedad que requiere una respuesta inmunitaria potenciada. En un enfoque, los linfocitos T específicos de antígeno tumoral, linfocitos NK, linfocitos CTL u otras células inmunosensibles, se utilizan como lanzaderas para el enriquecimiento selectivo de uno o más ligandos coestimuladores para el tratamiento o la prevención de neoplasia. Por ejemplo, un linfocito T que expresa un ligando coestimulador 4-1BBL y CD80 se coexpresa de manera constitutiva en un linfocito T que expresa un receptor de antígeno quimérico PZ1 que reconoce y se une a un Antígeno de Membrana Específico de Próstata (PSMA). Dichas células son para administrar a un paciente humano que lo necesite, para el tratamiento o la prevención de cáncer de próstata. En otro enfoque, para el tratamiento de enfermedades causadas por virus, pueden utilizarse linfocitos T, linfocitos NK y linfocitos CTL, específicos de antígeno vírico. Por ejemplo, para el tratamiento de CMV, CD80 y 4-1BBL se expresan en linfocitos T citotóxicos específicos de citomegalovirus (CMV).

#### *Linfocitos T (y linfocitos NK) específicos de antígeno tumoral*

Los tipos de linfocitos humanos específicos de antígeno tumoral que pueden utilizarse en los métodos de la divulgación incluyen, sin limitación, linfocitos donadores periféricos modificados genéticamente para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR, del inglés *chimeric antigen receptor*) (Sadelain, M., *et al.*, 2003 *Nat Rev Cáncer* 3: 35-45), linfocitos donadores periféricos modificados genéticamente para expresar un complejo receptor de linfocitos T que reconoce un antígeno tumoral de longitud completa que comprende el heterodímero  $\alpha$  y  $\beta$  (Morgan, R. A., *et al.* 2006 *Science* 314: 126-129), cultivos de linfocitos procedentes de linfocitos infiltrantes tumorales (TIL, del inglés *tumor infiltrating lymphocytes*) en biopsias tumorales (Panelli, M. C., *et al.* 2000 *J Immunol* 164: 495-504; Panelli, M. C., *et al.* 2000 *J Immunol* 164: 4382-4392) y leucocitos de sangre periférica específicos de antígeno expandidos de manera selectiva *in vitro*, empleando células presentadoras de antígenos artificiales (AAPC) o células dendríticas pulsadas (Dupont, J., *et al.* 2005 *Cáncer Res* 65: 5417-5427; Papanicolaou, G. A., *et al.* 2003 *Blood* 102: 2498-2505). Los linfocitos T pueden ser autólogos, alogénicos o pueden obtenerse *in vitro* a partir de células madre o progenitoras modificadas por ingeniería genética.

Cualquier antígeno tumoral adecuado (péptido antigénico) es adecuado para su uso en las realizaciones relacionadas con tumor descritas en el presente documento. Las fuentes de antígeno incluyen, pero sin limitación, proteínas de cáncer. El antígeno puede expresarse como un péptido o como una proteína intacta, o como parte de la misma. La proteína intacta, o una parte de la misma, puede ser nativa o estar mutada. Un antígeno adecuado es el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA).

#### *Linfocitos T (y linfocitos NK) específicos de antígeno vírico*

Como antígenos adecuados para su uso en el tratamiento de infección por patógenos u otra enfermedad infecciosa, por ejemplo, en un paciente inmunocomprometido, se incluyen, sin limitación, antígenos víricos presentes en citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la gripe.

La fuente no purificada de los CTL puede ser cualquiera conocida en la técnica, tal como la médula ósea, fetal, de neonato o adulto o una fuente de células hematopoyéticas, por ejemplo, hígado fetal, sangre periférica o sangre de cordón umbilical. Para separar las células pueden emplearse diversas técnicas. Por ejemplo, los métodos de selección negativa pueden retirar inicialmente linfocitos que no son CTL. Los anticuerpos monoclonales (mAb, del inglés *monoclonal Antibodies*) son particularmente útiles para identificar marcadores asociados a estirpes celulares particulares y/o a fases de diferenciación para selecciones tanto positivas como negativas.

A través de una separación relativamente rudimentaria puede retirarse una gran proporción de células finalmente diferenciadas. Por ejemplo, inicialmente pueden utilizarse separaciones con perlas magnéticas para retirar grandes cantidades de células irrelevantes. Preferentemente, antes del aislamiento celular, se retirará al menos aproximadamente el 80 %, habitualmente al menos el 70 % del total de células hematopoyéticas.

Los procedimientos de separación incluyen, pero sin limitación, centrifugación en gradiente de densidad; resedimentación; acoplamiento con partículas que modifican la densidad celular; separación magnética con perlas magnéticas revestidas con anticuerpos; cromatografía de afinidad; agentes citotóxicos unidos a o utilizados junto con un mAb, incluyendo, pero sin limitación, un complemento y citotoxinas; y cribado con anticuerpos unidos a una matriz sólida, por ejemplo, una placa, una microplaca, decantación o cualquier otra técnica conveniente.

Las técnicas de separación y análisis incluyen, pero sin limitación, citometría de flujo, que puede tener diversos grados de sofisticación, por ejemplo, una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz obtusos y de ángulo bajo, canales de impedancia.

Las células pueden seleccionarse frente a células muertas, empleando colorantes asociados a células muertas, tales como yoduro de propidio (PI, *propidium iodide*). Preferentemente, las células se recogen en un medio que

comprende suero bovino fetal (SBF) al 2 % o seroalbúmina bovina (SAB) al 0,2 % o cualquier otro medio adecuado, preferentemente estéril e isotónico.

- 5 En consecuencia, la divulgación proporciona en general una célula inmunosensible, tal como un linfocito T específico de tumor o virus que comprende un receptor que se une a un antígeno y un ligando coestimulador exógeno (por ejemplo, CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 y CD30L).

### Vectores

- 10 La modificación genética de células inmunosensibles (por ejemplo linfocitos T, linfocitos CTL, linfocitos NK) puede realizarse transduciendo una composición celular sustancialmente homogénea con una construcción de ADN recombinante. Preferentemente, para la introducción de la construcción de ADN en la célula, se emplea un vector retroviral (gamma-retroviral o lentiviral). Por ejemplo, un polinucleótido que codifique una proteína de ligando coestimulador (por ejemplo, un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF), tal como 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT
- 15 y CD30L, o un ligando de la superfamilia de Ig, tal como CD80 y CD86), o un receptor que se une a un antígeno, o una variante, o un fragmento del mismo, puede clonarse en un vector retroviral y la expresión puede dirigirse desde su promotor endógeno, desde la repetición terminal larga retroviral, o desde un promotor específico para un tipo de célula diana de interés. También pueden utilizarse vectores no víricos.

#### 20 *Ligandos coestimuladores*

- La interacción con al menos un ligando coestimulador proporciona una señal no específica de antígeno necesaria para la activación completa de un linfocito T. Los ligandos coestimuladores incluyen, sin limitación, ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF), citocinas (tales como IL-2, IL-12, IL-15 o IL21) y ligandos de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig).
- 25

#### *Ligandos del TNF*

- 30 El factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumor necrosis factor*) es una citocina implicada en la inflamación sistémica y estimula la reacción de fase aguda. Su papel principal está en la regulación de las células inmunitarias. Los ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF) comparten varias características comunes. La mayoría de los ligandos se sintetizan como proteínas transmembrana de tipo II (extremo C extracelular) que contienen un segmento citoplasmático corto y una región extracelular relativamente larga. Los ligandos del TNF incluyen, sin limitación,
- 35 factor de crecimiento nervioso (NGF, *nerve growth factor*), CD40L (CD40L)/CD154, CD137L/4-1BBL, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), CD134L/OX40L/CD252, CD27L/CD70, ligando de Fas (FasL), CD30L/CD153, factor de necrosis tumoral beta (TNF $\beta$ )/linfotóxina-alfa (LT $\alpha$ ), linfotóxina-beta (LT $\beta$ ), CD257/factor activador de linfocitos B (BAFF)/Blys/THANK/Tall-1, ligando del receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITRL) y ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL), LIGHT (TNFSF14).

#### 40 *Ligandos de la superfamilia de Ig*

- La superfamilia de inmunoglobulina (Ig) es un grupo grande de proteínas solubles y de superficie celular que participan en los procesos de reconocimiento, unión o adhesión de las células. Estas proteínas comparten características estructurales con las inmunoglobulinas, poseen un dominio (plegamiento) de inmunoglobulina. Los
- 45 ligandos de la superfamilia de inmunoglobulina incluyen, sin limitación, CD80 y CD86, siendo ambos, ligandos de CD28.

- Para la modificación genética inicial de las células, para proporcionar células específicas de antígeno tumoral o vírico, generalmente se emplea un vector retroviral para la transducción, sin embargo, puede utilizarse cualquier otro sistema de suministro o vector vírico adecuado. Para la modificación genética posterior de las células, para proporcionar células que comprendan un complejo presentador de antígenos que comprenda al menos dos ligandos coestimuladores, la transferencia génica retroviral (transducción) demuestra ser igualmente eficaz. También son adecuadas combinaciones de retrovirus y una línea de empaquetamiento apropiada, donde las proteínas de la cápside serán funcionales para infectar células humanas. Se conocen diversas líneas celulares productoras de virus anfitrónicos, incluyendo, pero sin limitación, PA12 (Miller, *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5: 431-437); PA317 (Miller, *et al.* (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 2895-2902); y CRIP (Danos, *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6460-6464). También son adecuadas partículas no anfitrónicas, por ejemplo, partículas pseudotipificadas con envoltura de VSVG, RD114 o GALV y cualquier otra conocida en la técnica.
- 55

- 60 Los posibles métodos de transducción también incluyen cocultivo directo de las células con células productoras, por ejemplo, mediante el método de Bregni, *et al.* (1992) *Blood* 80: 1418-1422, o cultivando con sobrenadante vírico solo o con reservas de vectores concentrados con o sin factores de crecimiento apropiados y policlones, por ejemplo, mediante el método de Xu, *et al.* (1994) *Exp. Hemat.* 22: 223-230; y Hughes, *et al.* (1992) *J. Clin. Invest.* 89: 1817.

- 65 Para expresar un ligando coestimulador de la divulgación en una célula inmunosensible pueden utilizarse otros vectores víricos de transducción. Preferentemente, el vector seleccionado muestra alta eficacia de infección e

integración y expresión estables (véase, por ejemplo, Cayouette *et al.*, Human Gene Therapy 8: 423-430, 1997; Kido *et al.*, Current Eye Research 15: 833-844, 1996; Bloomer *et al.*, Journal of Virology 71: 6641-6649, 1997; Naldini *et al.*, Science 272: 263-267, 1996; y Miyoshi *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A. 94: 10319, 1997). Otros vectores víricos que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, vectores adenovíricos, lentivíricos y de virus adenoasociados, virus variolovacunal, un virus del papiloma bovino o un virus del herpes, tal como el virus de Epstein-Barr (véanse también, por ejemplo, los vectores de Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244: 1275-1281, 1989; Eglitis *et al.*, BioTechniques 6: 608-614, 1988; Tolstoshev *et al.*, Current Opinión in Biotechnology 1: 55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta *et al.*, Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36: 311-322, 1987; Anderson, Science 226: 401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17: 407-416, 1991; Miller *et al.*, Biotechnology 7: 980-990, 1989; Le Gal La Salle *et al.*, Science 259: 988-990, 1993; y Johnson, Chest 107: 77S-83S, 1995). Los vectores retrovíricos están particularmente bien desarrollados y se han utilizado en situaciones clínicas (Rosenberg *et al.*, N. Engl. J. Med 323: 370, 1990, Anderson *et al.*, Patente de Estados Unidos n. °5.399.346).

Para la expresión de una proteína en una célula también pueden emplearse enfoques no víricos. Por ejemplo, puede introducirse una molécula de ácido nucleico en una célula administrando el ácido nucleico en presencia de lipofección (Feigner *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A. 84: 7413, 1987; Ono *et al.*, Neuroscience Letters 17: 259, 1990; Brigham *et al.*, Am. J. Med. Sci. 298: 278, 1989; Staubinger *et al.*, Methods in Enzymology 101: 512, 1983), conjugación de polilisina asialoorosomucoide (Wu *et al.*, Journal of Biological Chemistry 263: 14621, 1988; Wu *et al.*, Journal of Biological Chemistry 264: 16985, 1989) o por microinyección en condiciones quirúrgicas (Wolff *et al.*, Science 247: 1465, 1990). Otros medios no víricos de transferencia génica incluyen transfección *in vitro* utilizando fosfato de calcio, DEAE dextrano, electroporación y fusión de protoplastos. Los liposomas también pueden ser en potencia beneficiosos para el suministro de ADN en una célula. También puede realizarse el trasplante de genes normales en los tejidos afectados de un paciente, transfiriendo un ácido nucleico normal en un tipo de célula que pueda cultivarse *ex vivo* (por ejemplo, una célula primaria autóloga o heteróloga o su progenie), después de lo cual, la célula (o sus descendientes) se inyectan en un tejido diana o se inyectan por vía sistémica.

La expresión de ADNc para su uso en los métodos de terapia con polinucleótidos puede dirigirse desde cualquier promotor adecuado (por ejemplo, promotores de citomegalovirus humano (CMV), virus de simio 40 (SV40), o de metalotioneína) y regularse a través de cualquier elemento regulador de mamífero apropiado. Por ejemplo, si se desea, pueden utilizarse potenciadores que se sabe que dirigen preferentemente la expresión génica en tipos de células específicas para dirigir la expresión de un ácido nucleico. Los potenciadores utilizados pueden incluir, sin limitación, los que se caracterizan como potenciadores específicos de tejidos o de células. Como alternativa, si se utiliza un clon genómico como una construcción terapéutica, la regulación puede estar mediada por las secuencias reguladoras afines o, si se desea, por secuencias reguladoras procedentes de una fuente heteróloga, incluyendo cualquiera de los promotores o elementos reguladores descritos anteriormente.

Las células resultantes pueden después cultivarse en condiciones similares a las de las células no modificadas, por lo que las células modificadas pueden expandirse y utilizarse para una diversidad de fines.

#### Polipéptidos y análogos

En la divulgación también se incluyen polipéptidos PZ1, P28z, 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L, o fragmentos de los mismos, que se modifican de manera que potencian su actividad antineoplásica cuando se expresan en una célula inmunosensible. La divulgación proporciona métodos para optimizar una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico produciendo una alteración en la secuencia. Dichas alteraciones pueden incluir ciertas mutaciones, deleciones, inserciones o modificaciones postraduccionales. La divulgación incluye además análogos de cualquier polipéptido de origen natural de la divulgación. Los análogos pueden diferir de un polipéptido de origen natural por diferencias en la secuencia de aminoácidos, por modificaciones postraduccionales o ambas cosas. Los análogos generalmente mostrarán una identidad de al menos 85 %, más preferentemente 90 % y lo más preferentemente 95 % o incluso 99 % con toda o con una parte de una secuencia de aminoácidos de origen natural. La longitud de la comparación de secuencia es de al menos 5, 10, 15 o 20 restos de aminoácidos, preferentemente de al menos 25, 50 o 75 restos de aminoácidos y más preferentemente mayor de 100 restos de aminoácidos. De nuevo, en un enfoque a modo de ejemplo, para determinar el grado de identidad, puede utilizarse un programa BLAST, indicando una puntuación de probabilidad entre  $e^{-3}$  y  $e^{-100}$  una secuencia estrechamente relacionada. Las modificaciones incluyen derivatización química *in vivo* o *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación o glicosilación; pudiendo producirse dichas modificaciones durante la síntesis o procesamiento de los polipéptidos o después del tratamiento con enzimas modificadoras aisladas. Los análogos también pueden diferir de los polipéptidos de origen natural por alteraciones en la secuencia primaria. Estas incluyen variantes genéticas, tanto naturales como inducidas (por ejemplo, resultantes de mutagénesis aleatoria por irradiación o exposición a etanometilsulfato o por mutagénesis específica como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed.), CSH Press, 1989, o en Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente). También se incluyen péptidos ciclados, moléculas y análogos que contienen restos distintos de aminoácidos L, por ejemplo, aminoácidos D o aminoácidos de origen no natural o sintético, por ejemplo, aminoácidos beta o gamma.

Además de péptidos de longitud completa, la divulgación también proporciona fragmentos de uno cualquiera de los polipéptidos o dominios peptídicos. Como se usa en el presente documento, la expresión “un fragmento” significa al menos 5, 10, 13 o 15 aminoácidos. En otras realizaciones, un fragmento tiene al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 aminoácidos contiguos, o al menos 50 aminoácidos contiguos, y en otras realizaciones tiene al menos de 60 a 80, 100, 200, 300 o más aminoácidos contiguos. Pueden generarse fragmentos por procedimientos conocidos por los expertos en la materia o pueden resultar del procesamiento normal de proteínas (por ejemplo, la retirada de aminoácidos del polipéptido naciente que no se requieren para la actividad biológica o la retirada de aminoácidos por acontecimientos de corte y empalme alternativo de ARNm o procesamiento alternativo de proteínas).

Los análogos no proteicos tienen una estructura química diseñada para imitar la actividad funcional de una proteína. Dichos análogos son para la administración de acuerdo con los métodos de la divulgación. Dichos análogos pueden superar la actividad fisiológica del polipéptido original. En la técnica se conocen bien métodos de diseño de análogos, y la síntesis de análogos puede realizarse de acuerdo con dichos métodos modificando las estructuras químicas de tal manera que los análogos resultantes aumenten la actividad antineoplásica del polipéptido original cuando se expresa en una célula inmunosensible. Estas modificaciones químicas incluyen, pero sin limitación, la sustitución de grupos R alternativos y la variación del grado de saturación en átomos de carbono específicos de un polipéptido de referencia. Preferentemente, los análogos proteicos son relativamente resistentes a la degradación *in vivo*, dando como resultado un efecto terapéutico más prolongado tras su administración. Como ensayos para medir la actividad funcional se incluyen, pero sin limitación, los descritos en los Ejemplos indicados más adelante.

### Administración

Las composiciones que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente (por ejemplo linfocitos T, linfocitos NK, linfocitos CTL o sus progenitores) pueden proporcionarse por vía sistémica o directamente a un paciente para el tratamiento de una neoplasia, infección por patógenos o enfermedad infecciosa. En una realización, las células son para la inyección directa en un órgano de interés (por ejemplo, un órgano afectado por una neoplasia). Como alternativa, las composiciones que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente son para la administración indirecta al órgano de interés, por ejemplo, administración en el sistema circulatorio (por ejemplo, en la vasculatura tumoral). Para aumentar la producción de linfocitos T, linfocitos NK o linfocitos CTL *in vitro* o *in vivo*, pueden proporcionarse agentes de expansión y diferenciación antes, durante o después de la administración de las células.

Las células modificadas pueden administrarse en cualquier vehículo fisiológicamente aceptable, normalmente por vía intravascular, aunque también pueden introducirse en huesos u otro lugar conveniente en el que las células pueden encontrar un lugar apropiado (por ejemplo, el timo), para su regeneración y diferenciación. Normalmente, se administrarán al menos  $1 \times 10^5$  células, llegando a alcanzar finalmente  $1 \times 10^{10}$  o más. Las células inmunosensibles modificadas genéticamente pueden comprender una población purificada de células. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente el porcentaje de células inmunosensibles modificadas genéticamente en una población utilizando diversos métodos bien conocidos, tales como clasificación de células activada por fluorescencia (FACS, del inglés *fluorescence-activated cell sorting*). Los intervalos preferibles de pureza en las poblaciones que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente son de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 55 %, de aproximadamente el 55 a aproximadamente el 60 % y de aproximadamente el 65 a aproximadamente el 70 %. Más preferentemente la pureza es de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 75 %, de aproximadamente el 75 a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 85 %; y aún más preferentemente la pureza es de aproximadamente el 85 a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 90 a aproximadamente el 95 %, y de aproximadamente el 95 a aproximadamente el 100 %. Los expertos en la materia pueden ajustar fácilmente las dosificaciones (por ejemplo, una disminución de la pureza puede requerir un aumento de la dosificación). Las células pueden introducirse por inyección, catéter o procedimientos similares. Si se desea, también pueden incluirse factores, incluyendo, pero sin limitación, interleucinas, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-6 e IL-11, así como las otras interleucinas, los factores estimuladores de colonias, tales como G-, M- y GM-CSF, interferones, por ejemplo interferón gamma y eritropoyetina.

Las composiciones incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente o sus progenitores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La administración puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, pueden obtenerse células inmunosensibles o progenitoras de un paciente, y administrarse al mismo paciente o a un paciente compatible diferente.

Las células inmunosensibles obtenidas de sangre periférica o su descendencia (por ejemplo, obtenidas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) pueden administrarse por inyección localizada, incluyendo administración con catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que contenga una célula inmunosensible modificada genéticamente), esta composición se formulará generalmente en una forma de dosificación unitaria inyectable (solución, suspensión, emulsión).

## Formulaciones

Las composiciones de la divulgación que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente pueden proporcionarse convenientemente como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas son algo más convenientes para administrar, especialmente por inyección. Por otro lado, las composiciones viscosas pueden formularse dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar períodos de contacto más largos con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando las células inmunosensibles modificadas genéticamente en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversas cantidades de los otros ingredientes según se desee. Dichas composiciones pueden estar mezcladas con un vehículo, un diluyente o un excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones también pueden liofilizarse. Las composiciones pueden contener sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes, de dispersión o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tamponadores de pH, aditivos potenciadores de viscosidad o gelificantes, conservantes, agentes saporíferos, colorantes o similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada. Para preparar preparaciones adecuadas sin excesiva experimentación, pueden consultarse textos convencionales, tales como, "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edición, 1985.

Pueden añadirse diversos aditivos que potencien la estabilidad y esterilidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse a través de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede realizarse con el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o aditivo utilizado tendría que ser compatible con las células inmunosensibles modificadas genéticamente o sus progenitores.

Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y el líquido lacrimal. La isotonicidad deseada de las composiciones puede obtenerse utilizando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. Particularmente, para tampones que contienen iones de sodio, se prefiere cloruro de sodio.

Si se desea, la viscosidad de las composiciones puede mantenerse al nivel seleccionado utilizando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Se prefiere utilizar metilcelulosa por su fácil disponibilidad y bajo coste, y porque facilita el trabajo. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero y similares. La concentración preferida del espesante dependerá del agente seleccionado. Lo importante es utilizar una cantidad que consiga la viscosidad seleccionada. Obviamente, la elección de vehículos y otros aditivos adecuados dependerá de la vía de administración exacta y de la naturaleza de la forma farmacéutica particular, por ejemplo, una forma farmacéutica líquida (por ejemplo, si la composición va a formularse en una solución, una suspensión, un gel u otra forma líquida, tal como una forma de liberación temporalizada o una forma cargada con líquido).

Los expertos en la materia reconocerán que los componentes de las composiciones deberían seleccionarse para que sean químicamente inertes y no afecten a la viabilidad o a la eficacia de las células inmunosensibles modificadas genéticamente como se describe en el presente documento. Esto no presentará problemas para los expertos en los principios químicos y farmacéuticos, o podrán evitarse problemas fácilmente por referencia a textos convencionales o por experimentos sencillos (que no conllevan excesiva experimentación) a partir de la presente divulgación y de los documentos citados en el presente documento.

Una cuestión con respecto al uso terapéutico de las células inmunosensibles modificadas genéticamente es la cantidad de células necesaria para obtener un efecto óptimo. La cantidad de células a administrar variará en función del paciente que vaya a tratarse. En una realización, a un paciente humano se le administran entre  $10^4$  y  $10^{10}$ , entre  $10^5$  y  $10^9$ , o entre  $10^6$  y  $10^8$  células inmunosensibles modificadas genéticamente. En realizaciones preferidas, a un paciente humano se le administran al menos aproximadamente  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$  y  $5 \times 10^8$  células inmunosensibles modificadas genéticamente. La determinación exacta de lo que se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo su talla, edad, sexo, peso y afección del paciente en particular. Los expertos en la materia pueden establecer fácilmente las dosificaciones a partir de la presente divulgación y del conocimiento de la técnica.

El experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de células y aditivos, vehículos y/o excipientes opcionales en las composiciones y para administrar en los métodos. Normalmente, cualquier aditivo (además de la célula madre, o células madre, activas y/o agente, o agentes), está presente en una cantidad de solución de 0,001 a 50 % (en peso) en solución salina tamponada con fosfato y el principio activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 5 % en peso, preferentemente de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 % en peso, aún más preferentemente de aproximadamente 0,0001 a de aproximadamente 0,05 % en peso o de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 % en peso y aún más preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 % en peso. Por supuesto, para administrar cualquier composición a un animal o a un ser humano, y para cualquier método de administración particular, se prefiere por tanto determinar: la toxicidad, tal como determinando la dosis letal (DL) y la DL50 en un modelo animal adecuado, por ejemplo, un roedor, tal como un ratón; y la dosificación de la composición, o composiciones, la concentración de componentes en las mismas y el momento de administración de la composición, o composiciones, que suscita una respuesta adecuada. Dichas determinaciones no requieren experimentación excesiva partiendo del conocimiento del experto en la materia, de la presente divulgación y de los documentos citados en el presente documento. Y el tiempo para las administraciones secuenciales puede establecerse sin experimentación excesiva.

### Métodos de tratamiento

En el presente documento se desvelan métodos para el tratamiento de la neoplasia en un paciente. En el presente documento también se contemplan métodos para el tratamiento de una infección por patógenos u otra enfermedad infecciosa en un paciente tal como en un paciente humano inmunocomprometido. Los métodos comprenden la administración de un linfocito T, linfocito NK, linfocito CTL en una cantidad eficaz para obtener el efecto deseado, ya sea el alivio de una afección existente o la prevención de la recurrencia. Para el tratamiento, la cantidad administrada es una cantidad eficaz para producir el efecto deseado. Puede proporcionarse una cantidad eficaz en una administración o en una serie de administraciones. Puede proporcionarse una cantidad eficaz en una embolada o por perfusión continua.

Una "cantidad eficaz" (o "cantidad terapéuticamente eficaz") es una cantidad suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado tras el tratamiento. Puede administrarse una cantidad eficaz a un paciente en una o más dosis. Con respecto al tratamiento, una cantidad eficaz es una cantidad que sea suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, invertir o ralentizar la progresión de la enfermedad, o reducir de otro modo, las consecuencias patológicas de la enfermedad. La cantidad eficaz la determina generalmente el médico caso por caso y está dentro de la experiencia de la técnica. Normalmente se tienen en cuenta varios factores cuando se determina una dosificación apropiada para obtener una cantidad eficaz. Estos factores incluyen la edad, el sexo, y el peso del paciente, la afección que se trate, la gravedad de la afección y la forma y la concentración eficaz del fragmento de unión a antígeno que se administra.

Para la inmunoterapia por transferencia adoptiva utilizando linfocitos T específicos de antígeno, se infunden normalmente dosis celulares en el intervalo de  $10^9$ . Después de la administración de las células modificadas genéticamente en el hospedador y diferenciación posterior, se inducen linfocitos T que se dirigen específicamente contra el antígeno específico. La "inducción" de linfocitos T puede incluir la inactivación de linfocitos T específicos de antígeno, tal como por deleción o anergia. La inactivación es particularmente útil para establecer o restablecer la tolerancia tal como en trastornos autoinmunitarios. Las células modificadas pueden administrarse a través de cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitación, la vía intravenosa, subcutánea, intranodal, intratumoral, intratecal, intrapleural, intraperitoneal, o directamente pueden administrarse en el timo.

### Métodos terapéuticos

La divulgación proporciona métodos para aumentar una respuesta inmunitaria en un paciente que lo necesite. Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de una neoplasia en un paciente. La divulgación proporciona terapias que son particularmente útiles para el tratamiento de pacientes que tienen cáncer de próstata, o cáncer de próstata metastásico, que no sean susceptibles a intervenciones terapéuticas convencionales. Los pacientes humanos adecuados para terapia normalmente comprenden dos grupos de tratamiento que pueden diferenciarse por criterios clínicos. Los pacientes con "enfermedad avanzada" o con "alta carga tumoral" son los que portan un tumor clínicamente medible. Un tumor clínicamente medible es uno que puede detectarse basándose en la masa tumoral (por ejemplo, por palpación, tomografía axial computarizada, ecografía, mamografía o rayos X; los marcadores positivos bioquímicos o histopatológicos por sí solos son insuficientes para identificar esta población). Una composición farmacéutica representada en esta invención es para la administración a estos pacientes para suscitar una respuesta antitumoral con el objetivo de paliar su afección. De manera ideal, como resultado se produce una reducción en la masa tumoral, pero cualquier mejora clínica constituye un beneficio. La mejora clínica incluye la reducción del riesgo o de la tasa de progresión o la reducción de las consecuencias patológicas del tumor.

Un segundo grupo de pacientes adecuados se conoce en la técnica como "grupo adyuvante". Estos son individuos que han tenido un historial de neoplasia, pero que han respondido a otro modo de terapia. La terapia anterior puede

- haber incluido, pero sin limitación, resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia tradicional. Como resultado, estos individuos no tienen un tumor clínicamente medible. Sin embargo, se sospecha que están en riesgo de progresión de la enfermedad, cerca del sitio del tumor original, o por metástasis. Este grupo puede subdividirse adicionalmente en individuos de alto y bajo riesgo. La subdivisión se realiza basándose en las características observadas antes o después del tratamiento inicial. Estas características se conocen en la técnica clínica y están adecuadamente definidas para cada neoplasia diferente. Son características típicas de subgrupos de alto riesgo aquellas en las que el tumor ha invadido tejidos adyacentes, o que muestran implicación de ganglios linfáticos.
- Otro grupo tiene una predisposición genética a la neoplasia pero no ha mostrado aún señales clínicas de neoplasia. Por ejemplo, las mujeres que dan positivo a una mutación genética asociada a cáncer de mama, pero que aún están en edad de procrear, pueden desear recibir uno o más de los fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento en tratamiento profiláctico para evitar la aparición de neoplasia hasta que sea adecuado realizar cirugía preventiva.
- Los pacientes humanos con neoplasia que tienen cualquiera de las siguientes neoplasias: glioblastoma, melanoma, neuroblastoma, adenocarcinoma, glioma, sarcoma de tejido blando y diversos carcinomas (incluyendo cáncer de próstata y de pulmón microcítico) son pacientes especialmente apropiados. Los carcinomas adecuados incluyen además cualquiera de los carcinomas conocidos en el campo de la oncología, incluyendo, pero sin limitación, astrocitoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, oligodendroglioma, ependimoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo (PNET), condrosarcoma, sarcoma osteogénico, adenocarcinoma pancreático ductal, adenocarcinomas de pulmón microcítico y macrocítico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma bronco alveolar, adenocarcinoma epitelial y metástasis de hígado del mismo, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, hepatoma, colangiocarcinoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, carcinoma de células basales, carcinoma de células sudoríparas, carcinoma papilar, carcinoma de glándulas sebáceas, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, tumor testicular, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadena pesada, tumores de mama tales como adenocarcinoma ductal y lobular, adenocarcinomas y carcinomas escamosos del cuello uterino, carcinomas epiteliales uterinos y ováricos, adenocarcinomas prostáticos, carcinoma de células escamosas transicionales de la vejiga, linfomas de linfocitos B y T (nodular y difuso), plasmacitoma, leucemias agudas y crónicas, melanoma maligno, sarcoma de tejido blando y leiomyosarcoma.
- Los pacientes pueden tener una forma avanzada de enfermedad, en cuyo caso el objetivo del tratamiento puede incluir la mitigación o inversión de la progresión de la enfermedad, y/o la mejora de los efectos secundarios. Los pacientes pueden tener un historial de la afección, para la cual ya se han tratado, en cuyo caso el objetivo terapéutico normalmente incluirá una disminución o un retraso del riesgo de recurrencia.
- Por consiguiente, la invención proporciona la composición farmacéutica de la invención para el tratamiento o la prevención de una neoplasia en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno tumoral y un vector que codifica un ligando coestimulador que es CD80 o 4-1BBL. En una realización, la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama y glioblastoma. En otra realización, el antígeno tumoral es el antígeno de membrana específico de próstata, CD19, NY-ESO-1, WT-1 o hTERT.
- En otro enfoque, la divulgación proporciona un método para imponer tolerancia en un paciente, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno y un vector que codifica un ligando coestimulador. En un ejemplo, el método previene o reduce una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad asociada a trasplante alogénico.
- Como consecuencia de la expresión constitutiva en superficie de ligandos coestimuladores, los linfocitos T o NK humanos transferidos de manera adoptiva, están dotados de capacidades proliferativas, citolíticas y de supervivencia, aumentadas en un tumor intrínsecamente poco inmunogénico o en un ambiente inmunodeficiente desprovisto de ligandos coestimuladores. Además, después de su localización en el tumor o de infección vírica y su proliferación, los linfocitos T que expresan un ligando coestimulador, convierten al tumor o al sitio de infección vírica, en un ambiente muy conductivo para una amplia serie de células inmunitarias implicadas en la fisiología antitumoral o respuesta antivírica (linfocitos infiltrantes tumorales, linfocitos NK, NKT, células dendríticas y macrófagos).
- En otros ejemplos, la divulgación proporciona métodos para tratar a pacientes que tienen una infección causada por patógenos (por ejemplo, una infección causada por virus, bacterias, hongos, parásitos o protozoos). Esto es particularmente útil para potenciar una respuesta inmunitaria en un paciente inmunocomprometido. Como ejemplos de infecciones víricas que pueden tratarse utilizando un método de la divulgación se incluyen, pero sin limitación, infecciones causadas por citomegalovirus (CMV), por virus de Epstein Barr (VEB), por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y por virus de la gripe.

Por consiguiente, la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de una infección causada por patógenos en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible como se describe en el presente documento.

## 5 Kits

La invención proporciona kits para su uso en el tratamiento o prevención de una neoplasia, un trastorno autoinmunitario o un trasplante alogénico, comprendiendo el kit los linfocitos T de la invención. En una realización, el kit incluye una composición terapéutica o profiláctica que contiene una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende uno o más ligandos coestimuladores en una forma farmacéutica unitaria. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que contiene una vacuna terapéutica o profiláctica; dicho recipiente puede ser una caja, ampolla, frasco, vial, tubo, bolsa, bolsita, un envase de tipo blíster u otras formas de recipiente adecuadas conocidas en la técnica. Dichos recipientes pueden estar fabricados de plástico, vidrio, papel laminado, hoja metálica u otros metales adecuados para contener medicamentos.

Si se desea, la célula inmunosensible se proporciona junto con instrucciones para administrar la célula a un paciente que tenga, o que esté en riesgo de desarrollar, una neoplasia, una infección causada por patógenos, un trastorno inmunitario o un trasplante alogénico. Generalmente, las instrucciones incluirán información acerca del uso de la composición para el tratamiento o la prevención de la neoplasia, infección por patógenos, trastorno inmunitario o trasplante alogénico. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen al menos uno de: una descripción del agente terapéutico; un programa de dosificación y administración para el tratamiento o la prevención de una neoplasia, infección por patógenos, trastorno inmunitario o trasplante alogénico o síntomas de los mismos; precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información acerca de sobredosis; reacciones adversas; farmacología animal; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden imprimirse directamente sobre el recipiente (cuando lo hay) o como una etiqueta aplicada al mismo, o como una hoja, un folleto, una tarjeta, o un desplegable individual, proporcionado con el recipiente o en el mismo.

En la técnica se conocen bien métodos recombinantes. La práctica de la divulgación emplea, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía, tal como en (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (Wei & Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller & Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.*, eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994); y "Current Protocols in Immunology" (Coligan *et al.*, eds., 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de polinucleótidos y polipéptidos y, como tales, pueden considerarse en la realización y práctica de la invención. En los siguientes apartados se explican técnicas particularmente útiles.

## 40 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan como una descripción adicional de la invención y para ilustrar, aunque no limitar, la invención.

### 45 Ejemplo 1

**Los linfocitos T que coexpresan CD80 y 4-1BBL suscitan fuertes respuestas proliferativas después de estimulaciones cíclicas a través de su receptor de linfocitos T endógeno o a través de un receptor de antígeno quimérico, sin coestimulación proporcionada por células presentadoras de antígenos (APC)**

Para evaluar si la expresión constitutiva de ligandos coestimuladores en linfocitos T podría sustituir a la coestimulación mediada por APC, primero se investigaron las respuestas de linfocitos T, de linfocitos T primarios humanos, en tres sistemas experimentales. Utilizando activación de linfocitos T, mediada por el anticuerpo dirigido contra CD3 (OKT3), se cuantificó la expansión de linfocitos T de sangre periférica transducidos con CD80 y 4-1BBL (Figura 1a), que se comparó con la de los linfocitos T transducidos con cada ligando solo o sin ninguno. La estimulación recurrente de los receptores de linfocitos T (TCR, *T cell receptor*) solo en ausencia de ligandos coestimuladores no consiguió expandir linfocitos T e indujo rápidamente una reducción del número de linfocitos T después de la primera reestimulación (Figura 1b). En cambio, los linfocitos T CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> estimulados con OKT3 desencadenaron una proliferación media mayor de 237 veces durante 21 días. En comparación, los linfocitos T transducidos con cada ligando solo mostraron una proliferación media menor de 8,1 veces ( $p < 0,0001$ ). Basándose en estas observaciones, el concepto de coestimulación mediada por linfocitos T se amplió a dos aplicaciones clínicamente relevantes de terapia de linfocitos T adoptiva, utilizando linfocitos T donadores de memoria específicos de citomegalovirus (CMV) y linfocitos T autólogos genéticamente redirigidos, específicos de antígeno de diferenciación. Los linfocitos T específicos de la proteína pp65 de CMV expandidos en poco tiempo en APC<sup>24</sup> artificiales HLA-A\*0201<sup>+</sup>pp65<sup>+</sup> se transdujeron fácilmente con CD80 y 4-1BBL (Figura 1c). Después de exponer a la línea celular de tumor colónico Caco-2, transducida con pp65 HLA-A\*0201<sup>+</sup>, los linfocitos T dotados con el par de

ligandos coestimuladores CD80 y 4-1BBL mostraron una expansión significativamente mayor (209 veces,  $p < 0,0001$ ), en comparación con un número de linfocitos T en descenso continuo en los grupos de control (Figura 1d).

Para generar rápidamente linfocitos T humanos sensibles a tumores, linfocitos T de sangre periférica se transdujeron con retrovirus con el receptor de antígeno quimérico Pz1 (Gade *et al.*, *Cáncer Res.* 65: 9080-9088, 2005), un receptor de antígeno no restringido a HLA específico para el antígeno tumoral PSMA. El receptor Pz1 comprende un fragmento de anticuerpo monocatenario de unión a PSMA fusionado con el dominio de señalización  $\zeta$  de CD3 humano y es análogo en cuanto a estructura a otros receptores de antígeno quimérico actualmente en uso en ensayos clínicos. Los linfocitos T Pz1<sup>+</sup> que coexpresan CD80 y 4-1BBL (Figura 1e) generaron una respuesta proliferativa fuerte después de tres estimulaciones semanales con células PSMA<sup>+</sup>, CD80<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, 4-1BBL<sup>-</sup> LNCaP (enriquecimiento medio de 1042 veces, Figura 1f, panel superior). Esta expansión fue 9 veces mayor ( $p < 0,0001$ ) en comparación con la obtenida cuando se expresaba CD80 y 4-1BBL en las células tumorales en lugar de en los linfocitos T (Figura 1f, panel inferior). Análisis adicionales documentaron la mayor inducción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por exposición a PSMA en linfocitos T que coexpresan CD80 y 4-1BBL, así como su mayor potencial citolítico específico de antígeno y susceptibilidad reducida a la apoptosis, en comparación con los linfocitos T estimulados de manera convencional (datos no mostrados). En estudios paralelos, se investigaron otros miembros de la familia de ligandos de TNF<sup>5</sup>, que incluía OX40L, CD27L (CD70) o CD30L, con o sin CD80, y se descubrió que la combinación de CD80 y 4-1BBL era la más fuerte (datos no mostrados).

Además, estos estudios *in vitro* demuestran la capacidad de los linfocitos T, que coexpresan CD80 y 4-1BBL, para potenciar contundentemente la activación de TCR subóptima y, asimismo, para sustituir la ausencia de coestimulación proporcionada por las APC.

### Ejemplo 2

#### Los linfocitos T que coexpresan CD80 y 4-1BBL erradican tumores sistémicos establecidos.

Para investigar *in vivo* la fuerza de los linfocitos T CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> de la invención, se desarrolló un modelo de cáncer de próstata multifocal establecido, utilizando células tumorales PSMA<sup>+</sup>PC-3 (Gong *et al.*, *Neoplasia* 1:123-7, 1999, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Utilizando bioluminiscencia de doble modalidad y obtención de imágenes por resonancia magnética, se visualizaron tumores cuatro semanas después de la inoculación intravenosa, antes de iniciar la terapia por transferencia adoptiva de linfocitos T. Los pulmones, los ganglios linfáticos cervicales, la médula ósea y el hígado, se identificaron como sitios de enfermedad principales (Figura 2a). En este modelo, los animales se trataron cuatro semanas después de la inoculación del tumor con una sola infusión intravenosa de  $8 \times 10^6$  linfocitos T dirigidos a PSMA, que expresaban CD80, 4-1BBL, ambos o ninguno de estos.

En ratones de control tratados con  $8 \times 10^6$  linfocitos T dirigidos a CD19, que, al igual que los linfocitos T no transducidos, no consiguieron producir la lisis de dianas tumorales PSMA<sup>+</sup>, la carga tumoral *in vitro* progresó de manera estable hasta que los ratones tuvieron que sacrificarse (Figuras 2b, c). El tratamiento con linfocitos T Pz1<sup>+</sup> dio como resultado una reducción a corto plazo de la carga tumoral, seguido de progresión tumoral terminal (Figura 2b), produciendo una moderada ventaja de supervivencia de 12 días ( $p = 0,0001$ , Figura 2c). La expresión constitutiva de CD80 o de 4-1BBL solo en linfocitos T dirigidos a PSMA, aumentó de manera marginal únicamente esta respuesta terapéutica, prolongando la mediana de supervivencia a 63 y 66 días, respectivamente ( $p = 0,077$ ,  $p = 0,056$ , respectivamente). Los linfocitos T que coexpresaban CD80 y 4-1BBL indujeron respuestas importantes y redujeron la carga tumoral 3,3 veces ( $p = 0,0028$ ) cuatro días después de la transferencia adoptiva de linfocitos T. Después de dieciséis días, se obtuvo una reducción de 1375 veces, en relación con el grupo de tratamiento con linfocitos T Pz1<sup>+</sup> ( $p = 0,0002$ ). Siete de diez animales tratados permanecieron sin tumores 200 días después de la infusión de linfocitos T Pz1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> y ninguno en todos los demás grupos de tratamiento o de control (Figura 2c). Los tres ratones que inicialmente no respondieron a la terapia, mostraron regresión tumoral acentuada antes de la recidiva (Figura 2b) y sobrevivieron durante 100 días (Figura 2c).

### Ejemplo 3

#### La expansión de linfocitos T *in vivo* es fuerte y específica de antígeno.

Para rastrear y cuantificar *in vivo* la migración y acumulación de linfocitos T en relación con la localización tumoral y la carga tumoral, adicionalmente, linfocitos T transferidos de manera adoptiva se marcaron con luciferasa roja de elatérico (CBR-luc (del inglés *click beetle red-luc*) Figura 3a)). (Ponomarev *et al.*, *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* Mayo de 2004; 31(5): 740-51). La obtención de imágenes en serie de los ratones tratados con linfocitos T Pz1<sup>+</sup> mostró un aumento progresivo de la señal que alcanzó un pico cuatro días después de la inyección de linfocitos T (Figura 3b). Hasta el día 18, una señal de bajo nivel permaneció detectable. En el caso de los linfocitos T Pz1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>, la señal pico se detectó el día 8 (el recuento de fotones mínimo era 41 veces mayor que el de los linfocitos T Pz1<sup>+</sup>,  $p = 0,0009$ ) seguido de una disminución gradual de la señal, aunque en algunos animales aún podía detectarse bioluminiscencia hasta el día 100 (Figura 3b). Cabe destacar que el efecto de la coexpresión de CD80 y 4-1BBL se anuló en los linfocitos T 19z1<sup>+</sup> (Figura 3b), lo que coincide con la necesidad de estimulación por antígenos para que

se produzca la expansión. Los análisis de citometría de flujo y los recuentos de linfocitos T de suspensiones de células sueltas de pulmón en tres ratones por grupo tratados, determinaron que el número real de linfocitos T era muy concordante con las intensidades de señal bioluminiscentes adquiridas (Figuras 3c, d). Por lo tanto, estos estudios, demuestran que los linfocitos T que coexpresan CD80 y 4-1BBL se expanden de una manera dependiente de antígeno antes de entrar finalmente en una fase de contracción que da como resultado la eliminación sustancial, si no completa, de los linfocitos T.

#### Ejemplo 4

##### La coalescencia de los ligandos coestimuladores CD80 y 4-1BBL con sus receptores respectivos CD28 y 4-1BB en la sinapsis inmunológica precede a la auto coestimulación funcional de linfocitos T.

Para determinar si los ligandos coestimuladores expresados de manera constitutiva activaban a los linfocitos T *in cis*, se examinó primero la cuestión de si estos ligandos se colocalizaban con sus receptores afines durante la activación de linfocitos T. Ambos ligandos, CD28 y 4-1BB, amplifican la señalización de receptores de linfocitos T (TCR) después del reclutamiento en los compartimentos de membrana central de la sinapsis inmunológica<sup>31-33</sup>. Por lo tanto, la colocalización de CD80 y 4-1BBL en la zona de contacto de los linfocitos T con las células tumorales, es probablemente un requisito previo para la auto coestimulación. Para visualizar la distribución de 4-1BBL por microscopía confocal, el dominio citoplasmático se fusionó con la proteína dsRed (proteína fluorescente roja de *Discosoma sp.*) monomérica y esta proteína se coexpresó con CD80 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> transducidos con Pz1. Inmediatamente antes de mezclar con células LNCaP CD28<sup>+</sup>, 4-1BB<sup>-</sup> no modificadas, los linfocitos T se marcaron con la subunidad β de la toxina del cólera conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-CTB) para visualizar grupos de balsas lipídicas después de la formación de la sinapsis. Después del acoplamiento con el tumor LNCaP, 4-1BBL y CD80, así como 4-1BB y CD28, se movilaron a las zonas de contacto de células tumorales-linfocitos T positivos a la toxina del cólera conjugada con FITC (Figuras 4a, b). Para investigar la consecuencia funcional de esta interacción, se examinó y se cuantificó la colocalización de la Granzima B (GRB). La condensación de GRB definida, aunque dispersa, se localizó cerca de la zona de contacto en grupos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresaban Pz1 y sus dianas tumorales afines (Figuras 4c, d)). La mediana de reclutamiento de GRB en puntos de unión de células tumorales con linfocitos T, se amplificó 2,2 veces en linfocitos T CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> (p = 0,0001). Para confirmar que estas diferencias observadas eran de hecho un resultado del acoplamiento de 4-1BB con 4-1BBL dentro de la misma célula, la expresión de 4-1BB se atenuó por la coexpresión estable de ARNph específico de 4-1BBL y 4-1BB (datos no mostrados). La atenuación de 4-1BB redujo significativamente la densidad de GRB cerca de la sinapsis (reducción de 2,02 veces, p <0,0001), a pesar de la presencia de 4-1BBL en el punto de unión de los linfocitos T en todos los grupos de células en los que se obtuvieron imágenes. Estos hallazgos sugieren contundentemente que el ligando coestimulador se acopla funcionalmente con su receptor en la misma superficie del linfocito T después de coalescencia inducida por antígenos en la sinapsis inmunológica.

Para demostrar además la coestimulación, se diseñó un ensayo de células sueltas en el que podía analizarse la interacción endógena de 4-1BB/4-1BBL después de la expresión más temprana de 4-1BBL en linfocitos T recién transducidos. Para ello, primero se expresó la luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional de NF-κB, un efector clave, corriente abajo de la señalización de 4-1BB, en un clon de linfocitos T de Jurkat CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>4-1BB (JNL). Para impedir la inducción de NF-κB por coestimulación espectadora esporádica, las células JNL se expusieron a vectores retrovíricos que codificaban 4-1BB, 4-1BBL y CD80 y se subclonaron limitando la dilución 4 horas después, mucho antes de la primera expresión génica detectable en superficie (datos no mostrados) y se estimuló inmediatamente por OKT3 unido a placa. Como se ilustra en la Figura 4e, los linfocitos T CD80<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>4-1BB<sup>+</sup> aislados, regularon positivamente, de una manera apreciable, NF-κB, a diferencia de los linfocitos JNL transducidos con vector de control. La señal de luminiscencia se adquirió en 36 pocillos que contenían células separadas, transducidas varias veces, como se describe en el apartado de Métodos. La coexpresión de los dos pares de ligandos aumentó 3,8 veces la señal dependiente de NF-κB (en relación con los linfocitos JNL de control; p <0,0001; Figura 4f). Puesto que en cualquier momento de este ensayo la única fuente de ligandos coestimuladores fue la propia superficie de los linfocitos T aislados, esta regulación positiva de NF-κB solo podía reflejar el impacto de la auto-coestimulación.

#### Ejemplo 5

##### Coestimulación en trans *in vitro* de linfocitos T espectadores específicos de antígeno

La expresión constitutiva de ligandos coestimuladores también puede permitir que los linfocitos T modificados genéticamente coestimulen linfocitos T *in trans*. Cabe destacar que, ocasionalmente, en los estudios confocales mostrados en la Figura 4 (Figura 5a), se observaron grupos de tres células constituidos por linfocitos T CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> y CD80<sup>-</sup>4-1BBL<sup>-</sup>. Para proporcionar pruebas funcionales de coestimulación *in trans*, se diseñó un sistema de cocultivo en el que se mezclaron linfocitos T específicos de PSMA que expresaban CD80 y 4-1BBL con linfocitos T marcados con carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) que no se transdujeron con CD80 o 4-1BBL. Se descubrió que estos linfocitos T específicos de la proteína pp65 de CMV, marcados con CFSE, se coestimulaban de un modo eficaz por linfocitos T autólogos espectadores Pz1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> (Figuras 5b, c). El contacto físico entre las dos poblaciones de linfocitos T era un requisito previo para que los linfocitos T citotóxicos sensibles a CMV se

expandieran, ya que su separación mediante una membrana de tipo *Transwell* redujo enormemente la fuerte inducción de GRB y la expansión de linfocitos T contundente generada en células sensibles a pp65, lo que está en consonancia con un mecanismo dependiente de contacto celular (Figura 5d).

## 5 Ejemplo 6

### Coestimulación en *trans in vivo* de linfocitos T que se infiltran en tumores

Estas observaciones animaron a los inventores a investigar si la coestimulación en *trans* mediada por linfocitos T era operativa *in vivo*. Para este fin, se combinaron dos modelos de animales previamente descritos: el modelo de tumor RM1-PSMA, en el que los tumores están confinados en los pulmones (Gade *et al.*, *Cáncer Res.* 65: 9080-9088, 2005) y el modelo de tumor Raji, en el que las células tumorales colonizan selectivamente la médula ósea (Brentjens *et al.*, *Nat Med.* Marzo de 2003; 9(3): 279-86). Todos los ratones se trataron con linfocitos T transducidos con Pz1, que también expresaban CBR-luc (Figura 3). Posteriormente, en los animales se infundieron linfocitos T Pz1<sup>+</sup> negativos a luciferasa, que expresaban o carecían de CD80 y 4-1BBL. La expresión de luciferasa de *Gaussia* (Gau-Luc) en las células tumorales y de CBR-luc en linfocitos T Pz1<sup>+</sup>, permitió el uso de formación de imágenes por bioluminiscencia doble para supervisar simultáneamente la progresión tumoral y la acumulación espacial y temporal de los linfocitos T. En todos los grupos de tratamiento (Figura 6a), se observaron distribuciones tisulares y señales bioluminiscentes comparables de linfocitos marcados con CBR-luc<sup>+</sup> seis horas (día 0) después de la transferencia adoptiva. El día 2, el efecto de los linfocitos T Pz1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> sobre los linfocitos T CBR-luc<sup>+</sup>Pz1<sup>+</sup> aún era moderado (mediana de 1,2 veces, en relación con los linfocitos T Pz1<sup>+</sup> como espectadores,  $p = 0,0947$ ). La señal de CBR-luc se debilitó posteriormente en ratones a los que se proporcionaron linfocitos T Pz1<sup>+</sup> de control (Figura 6a). En cambio, este recuento de fotones registrados sobre la zona área torácica aumentó 6,5 veces en promedio en los ratones a los que se proporcionaron linfocitos T Pz1<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> ( $p = 0,0122$ , Figuras 6a, b). Cabe destacar que este efecto era selectivo para los linfocitos T dirigidos a PSMA, puesto que los linfocitos T transducidos con 19z1 CBR-luc<sup>+</sup> coinyectados, que se infiltraron en los tumores Raji establecidos en ambos fémures, no aumentaron significativamente la señal bioluminiscente torácica en ningún punto temporal (mediana de aumento de 1,5 veces el día 4,  $p = 0,0947$ , Figuras 6a, b). En su conjunto, estos datos obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que los linfocitos T CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> potencian localmente las respuestas de linfocitos T, proporcionando coestimulación en *trans*.

La presentación constitutiva de CD80 en linfocitos T actúa como un ligando coestimulador para CD28, pero también podría acoplarse a reguladores negativos de la expansión de linfocitos T, tales como CTLA-4, con altas afinidades (Hodi *et al.* *Clin Cancer Res.* Sep. 2007 15:13: 5238-42). Para evitar que se produzca la auto inhibición de los linfocitos T, no deseable desde un punto de vista terapéutico, mediada por CD80 expresado en linfocitos T, los linfocitos T se cotransdujeron con el receptor de antígeno quimérico P28z (Maher *et al.*, *Nature Biotechnology*, Vol 20, enero de 2002, págs. 70-75) y 4-1BBL expresados en la superficie de linfocitos T (Figura 7). El receptor P28z de doble fusión, contiene restos de señalización tanto de TDR como de CD28. Mientras que la señalización a través de P28z no consiguió provocar una expansión de linfocitos T prolongada, la coexpresión de 4-1BBL potenció enormemente la respuesta proliferativa más de 10 veces el día 14. Sin embargo, la señal sinérgica y coestimuladora de CD80-4-1BBL, era incluso más fuerte cuando ambos ligandos de longitud completa se expresaron en la superficie de linfocitos T transducidos con Pz1 (aproximadamente dos veces mayor que la de P28z<sup>+</sup>4-1BBL, Figura 7). Por tanto, las señales de CD28 transmitidas mediante un elemento de señalización de CD28 fusionado en la construcción del receptor de antígeno quimérico, pueden conceder a los linfocitos T Pz1<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> propiedades proliferativas potenciadas, aunque esta no sea una proliferación de linfocitos T tan fuerte como la observada en los linfocitos T Pz1<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>.

Un objetivo principal de la inmunoterapia del cáncer es proporcionar una coestimulación segura y eficaz a los linfocitos T sensibles a tumores. Utilizando un enfoque genético, se demostró que los propios linfocitos T proporcionaban una fuerte coestimulación. La expresión constitutiva de ligandos coestimuladores en células primarias, humanas, específicas de CMV, y de linfocitos T dirigidos a PSMA, no solamente compensó la ausencia de estos ligandos en las células presentadoras de antígenos (APC), sino que también indujo una respuesta proliferativa que superaba la suscitada por APC convencionales (Figura 1). El examen de un panel de ligandos coestimuladores indicó que CD80 y 4-1BBL proporcionaban la activación de linfocitos T más fuerte en las condiciones experimentales de la invención, permitiendo una expansión fuerte de linfocitos T después de la estimulación antigénica repetida semanalmente. Los linfocitos T CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>T mostraron una mejor proliferación, secreción de citocinas, supervivencia *in vitro* y expansión y persistencia *in vivo*, dando como resultado una biomasa de linfocitos T de 40 a 50 veces mayor una semana después de la infusión en ratones portadores de tumores, en comparación con linfocitos T específicos de PSMA que no se transdujeron con CD80 y 4-1BBL (Figura 3). Mientras que los animales tratados con linfocitos T específicos de PSMA no transducidos con CD80/4-1BBL sucumbieron de manera uniforme a la enfermedad, la infusión de los mismos linfocitos T convertidos en CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup>, rechazó de modo eficaz tumores PC-3 sistémicos y establecidos, en la mayoría de los ratones tratados (Figura 2). Estos hallazgos, obtenidos en un modelo de tumor muy desafiante, resaltan la actividad biológica y la fuerza notable de la expresión a alto nivel, constitutiva, de ligandos coestimuladores en linfocitos T.

65

Para investigar el mecanismo que causa esta respuesta reforzada, primero se examinó la distribución espacial de CD80 y 4-1BBL y de sus receptores en linfocitos T, antes y después del acoplamiento tumoral. Se ha demostrado que CD28 y 4-1BB se acumulan muy cerca del TCR, dentro del grupo de activación supramolecular central de las sinapsis inmunológicas. Los ligandos coestimuladores expresados por APC, incluyendo CD80, CD40L y CD70, polarizan la sinapsis, confirmando la idea de que la sinapsis inmunológica proporciona una zona de contacto ordenada para facilitar y propagar las interacciones entre el receptor y el ligando coestimulador. De manera coherente con este modelo, los ligandos CD80 y 4-1BBL codificados por los linfocitos T, se polarizan hacia la zona de contacto entre los linfocitos T y las células tumorales LNCaP junto con CD28 y 4-1BB (Figura 4). La consecuencia funcional de esta colocalización se ilustra por la acumulación de GRB, que se transporta hacia la interfaz entre el linfocito T y la APC a lo largo de microtúbulos después del contacto antigénico en sinapsis que contienen focos 4-1BB<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> pero no en linfocitos T que carecen de 4-1BB (Figura 4). Por tanto, la sinapsis inmunológica está aparentemente bien adaptada para orquestar la auto coestimulación.

La auto coestimulación se demostró en un ensayo de células separadas en el que se visualizó la expresión *de novo* de 4-1BB y 4-1BBL en NF-κB activado por linfocitos T recién transducidos sin ninguna posible contribución de un linfocito T contiguo. La expresión de NF-κB se visualizó en tiempo real, después de la separación física de clones separados poco después de la transducción, varias horas antes de que pudiera detectarse la expresión del ligando coestimulador (Figura 4). La auto coestimulación puede por tanto permitir que los linfocitos T anulen la escasa capacidad coestimuladora de las APC subóptimas, incluyendo las células tumorales. Además, la expresión constitutiva en la superficie celular de 4-1BBL en linfocitos T, garantiza la coestimulación 'a demanda' garantizando que el ligando permanezca listo para acoplarse con receptores, tales como 4-1BB, regulados positivamente de manera transitoria. Se podría especular que la interacción física de 4-1BBL con su receptor puede producirse durante la reorganización temprana de balsas o entre plegamientos opuestos de la membrana plasmática en el centro de la sinapsis. Este efecto parece estar autorregulado ya que la expansión de linfocitos T CD80<sup>+</sup>4-1BBL<sup>+</sup> se atenuó gradualmente en respuesta a una exposición a antígeno *in vitro*, repetida (Figura 1). La expansión de linfocitos T *in vivo* también estuvo autolimitada (Figura 3), lo que puede deberse a la eliminación del tumor que priva a los linfocitos T de estimulación antigénica y señalización coestimuladora atenuada.

Sin desear ligarse a la teoría, los estudios de los inventores también confirman la coestimulación en *trans*, como un mecanismo para potenciar la inmunidad a través de la expresión a alto nivel de CD80 y 4-1BBL en linfocitos T. Las funciones proliferativa y efectora de los linfocitos T que se acoplan con antígenos presentado por APC en ausencia de CD80 o 4-1BBL se amplificaron por tanto mediante un cocultivo *in vitro* o mediante la coadministración *in vivo* de linfocitos T que presentan ambos ligandos. La mezcla de células *in vitro* y los estudios de tipo transwell, indicaron que la coestimulación en *trans* requería contacto entre las células (Figura 5), de acuerdo con los efectos en *trans* indicados para otros tipos de células, tales como fibroblastos o células tumorales espectadoras. La coestimulación en *trans* también se indujo *in vivo*, de una manera específica de órgano, como se ilustra en ratones portadores de dos tumores diferentes que segregan en sitios diferentes (Figura 6).

La coestimulación en *trans* mediada por linfocitos T facilita el camino para nuevos y emocionantes enfoques terapéuticos, puesto que la coestimulación puede suministrarse a linfocitos T contiguos dentro del microambiente tumoral. Esta característica es especialmente valiosa ya que, con frecuencia, las células dendríticas no pueden regular positivamente por completo los ligandos coestimuladores dentro del microambiente tumoral. Aunque factores solubles, tales como la interleucina 2, pueden contribuir a ayudar a los linfocitos T, la dependencia del contacto entre las células limita de un modo eficaz la coestimulación en *trans* a otros linfocitos T infiltrantes tumorales. Sin querer ligarse a la teoría, el efecto de la competencia de los linfocitos T sobre la frecuencia de la coestimulación en *trans in vivo*, puede ampliar finalmente la respuesta inmunitaria antitumoral mediante el reclutamiento de una población diversa de linfocitos infiltrantes tumorales endógenos y de este modo ayudar a prevenir la evasión de antígenos tumorales.

En resumen, se demostró que la expresión de CD80 y 4-1BBL en linfocitos T humanos, es un medio eficaz, desde el punto de vista biológico, para superar la falta de coestimulación mediada por APC convencional en el microambiente tumoral. Este enfoque es aplicable a linfocitos T activados a través de un receptor de antígeno transducido, así como a través de su TCR endógeno. La coestimulación mediada por linfocitos T, ya sea auto coestimulación o estimulación en *trans* o en ambas, puede por tanto ser útil en una amplia serie de tumores malignos y enfermedades infecciosas que se tratan con terapia de transferencia adoptiva de linfocitos T.

Adicionalmente, la divulgación puede caracterizarse mediante cualquiera de los siguientes puntos:

1. Una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno y un ligando coestimulador exógeno.
2. El método del punto 1, en el que el ligando coestimulador se expresa de manera constitutiva o inducible.
3. El método del punto 1, en el que al menos dos ligandos coestimuladores se expresan de manera constitutiva.

4. La célula inmunosensible del punto 1, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocítico Citolítico Natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL) y un linfocito T regulador.
- 5 5. La célula inmunosensible del punto 1, en el que el antígeno es un antígeno tumoral o un antígeno de patógeno.
6. La célula inmunosensible del punto 3, en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno carcinoembrionario (CEA), IL13R alfa, her-2, CD19, NY-ESO-1, HIV-1 Gag, Lewis Y, Mart-1, gp100, tirosinasa, WT-1, hTERT y mesotelina.
- 10 7. La célula inmunosensible del punto 1, en el que la célula expresa un receptor de antígeno recombinante o endógeno que es Pz1 o P28z.
8. La célula inmunosensible del punto 1, en el que el ligando coestimulador es un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) o un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig).
- 15 9. La célula inmunosensible del punto 8, en el que el ligando de TNF se selecciona del grupo que consiste en 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L.
- 20 10. La célula inmunosensible del punto 8, en el que el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona del grupo que consiste en CD80 y CD86.
11. La célula inmunosensible de uno cualquiera de los puntos 1-10, en el que la célula inmunosensible expresa un ligando de TNF y un ligando de superfamilia de Ig.
- 25 12. La célula inmunosensible del punto 11, en el que el ligando del TNF es 4-1BBL y el ligando de la superfamilia de Ig es CD80.
- 30 13. La célula inmunosensible de uno cualquiera de los puntos 1-12, en el que un receptor de antígeno endógeno o recombinante o un complejo presentador de antígeno se expresa de manera constitutiva en la superficie del linfocito T.
14. La célula de uno cualquiera de los puntos 1-12, en el que los ligandos coestimuladores se expresan de manera constitutiva en la superficie del linfocito T.
- 35 15. La célula inmunosensible de uno cualquiera de los puntos 1-12, en el que el ligando coestimulador se expresa en un vector retroviral.
16. Un linfocito T específico de virus o un vector que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 y CD30L.
- 40 17. El linfocito T específico de virus del punto 16, en el que el linfocito T reconoce un virus seleccionado del grupo que consiste en Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (VEB), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y antígenos del virus de la gripe.
- 45 18. Un linfocito T específico de antígeno tumoral, que expresa un vector que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 y CD30L.
19. El linfocito T específico de antígeno tumoral del punto 15, en el que la célula expresa CD80 y 4-1BBL.
- 50 20. El linfocito T específico de antígeno tumoral del punto 15, en la que el vector es un vector retroviral.
21. Un método de modulación de una respuesta inmunitaria en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible de uno cualquiera de los puntos 1-17.
- 55 22. El método del punto 21, en el que el método aumenta o reduce una respuesta inmunitaria.
23. El método del punto 21, en el que el método aumenta la autotolerancia o aumenta la tolerancia a un trasplante de órgano.
- 60 24. Un método de tratamiento o prevención de una neoplasia en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno tumoral y un vector que codifica un ligando coestimulador.
- 65 25. El método del punto 18, en el que la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama y glioblastoma.

26. El método del punto 18, en el que el antígeno tumoral es el antígeno de membrana específico de próstata, CD19, NY-ESO-I, WT-1, hTERT y mesotelina.
- 5 27. Un método para imponer tolerancia en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno y un vector que codifica un ligando coestimulador.
- 10 28. El método del punto 27, en el que el método impide o reduce una respuesta autoinmunitaria o una enfermedad asociada a un trasplante alogénico.
29. Un método de tratamiento o prevención de una infección causada por patógenos en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno vírico y un vector que codifica un ligando coestimulador.
- 15 30. El método del punto 29, en el que el patógeno es un virus, una bacteria, un hongo, un protozoo o un parásito.
31. El método del punto 29, en el que el virus se selecciona del grupo que consiste en Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (EBV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y virus de la gripe.
- 20 32. El método de uno cualquiera de los puntos 21-30, en el que la célula linfocito es un linfocito T, un linfocito Citolítico Natural (NK) o un linfocito T citotóxico (CTL), extraído tanto de un donador autólogo o alogénico, como generado *in vitro* a partir de una célula madre o progenitora modificada por ingeniería genética.
- 25 33. El método de uno cualquiera de los puntos 21-30, en el que la célula expresa un receptor recombinante o endógeno para el antígeno.
34. El método de uno cualquiera de los puntos 21-30, en el que el ligando coestimulador es un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) o un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig).
- 30 35. El método de uno cualquiera de los puntos 21-31, en el que el ligando del TNF se selecciona del grupo que consiste en 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L.
- 35 36. El método de uno cualquiera de los puntos 21-31, en el que el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona del grupo que consiste en CD80 y CD86.
37. El método de uno cualquiera de los puntos 21-31, en el que la célula inmunosensible expresa un ligando del TNF y un ligando de la superfamilia de Ig.
- 40 38. El método de uno cualquiera de los puntos 21-31, en el que el ligando del TNF es 4-1BBL y el ligando de la superfamilia de Ig es CD80.
39. El método de uno cualquiera de los puntos 21-31, en el que un receptor de antígeno recombinante o endógeno o un complejo que presenta un antígeno se expresa de manera constitutiva en la superficie del linfocito T.
- 45 40. El método de uno cualquiera de los puntos 21-31, en el que los ligandos coestimuladores se expresan de manera constitutiva en la superficie del linfocito T.
41. El método de uno cualquiera de los puntos 21-31, en el que el vector es un vector retrovírico.
- 50 42. Un método para producir una célula inmunosensible específica de antígeno, comprendiendo el método introducir en la célula inmunosensible una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico, en el que el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a antígeno acoplado a un dominio de señalización intracelular que activa una célula inmunosensible.
- 55 43. El método del punto 42, en el que la célula inmunosensible es un linfocito T, un CTL o un linfocito NK.
44. El método del punto 42, en el que el dominio de unión a antígeno es un dominio de unión a antígeno tumoral.
- 60 45. El método del punto 42, en el que el antígeno tumoral es el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA).
46. El método del punto 42, en el que el dominio de señalización intracelular activa un linfocito T, un linfocito CTL o un linfocito NK.
- 65 47. El método del punto 42, en el que el dominio de señalización intracelular es el dominio de señalización de cadena [zeta].

48. El método del punto 42, en el que una señal coestimuladora se proporciona a través de un receptor de antígeno modificado genéticamente y la otra por sobreexpresión de un ligando coestimulador.
- 5 49. Un método de tratamiento de una neoplasia en un paciente que lo necesite, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito T que comprende un antígeno tumoral y un complejo presentador de antígeno que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona del grupo que consiste en: un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y sus combinaciones, tratando de este modo el cáncer en el paciente.
- 10 50. Un método de tratamiento de una neoplasia en un paciente, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito Citolítico Natural (NK) que comprende un antígeno tumoral y un complejo presentador de antígeno que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona del grupo que consiste en: un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y sus combinaciones, tratando de este modo el cáncer en el paciente.
- 15 51. El método de los puntos 48-50, en el que el ligando del TNF se selecciona del grupo que consiste en: 4-1BBL, OX40L, CD70 y CD30L, y LIGHT.
- 20 52. El método de los puntos 48-50, en el que el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona del grupo que consiste en: CD80 y CD86.
- 25 53. El método de los puntos 48-50, en el que al menos los dos ligandos coestimuladores son un ligando del TNF y un ligando de la superfamilia de Ig.
- 30 54. El método del punto 52, en el que el ligando del TNF es 4-1BBL y el ligando de superfamilia de Ig es CD80.
- 35 55. El método de los puntos 48-50, en el que el complejo de reconocimiento antigénico se expresa de manera constitutiva en la superficie de la célula.
- 40 56. El método de los puntos 48-50, en el que el antígeno tumoral es el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA).
- 45 57. El método de los puntos 48-50, en el que al menos dos ligandos coestimuladores se expresan de manera constitutiva en la superficie de la célula.
- 50 58. Un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente que lo necesite, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito T que comprende un receptor específico para un antígeno vírico y un complejo presentador de antígeno que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona del grupo que consiste en: un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y sus combinaciones, tratando de este modo la enfermedad infecciosa en el paciente.
- 55 59. Un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito Citolítico Natural (NK) que comprende un receptor específico para un antígeno vírico y un complejo presentador de antígeno que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona del grupo que consiste en: un ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y sus combinaciones, tratando de este modo la enfermedad infecciosa en el paciente.
- 60 60. El método del punto 58 o 59, en el que el paciente es un paciente inmunocomprometido.
- 65 61. El método del punto 57 o 58, en el que el ligando del TNF se selecciona del grupo que consiste en: 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L.
62. El método del punto 57 o 58, en el que el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona del grupo que consiste en: CD80 y CD86.
63. El método del punto 57 o 58, en el que al menos los dos ligandos coestimuladores son un ligando del TNF y un ligando de la superfamilia de Ig.
64. El método del punto 57 o 58, en el que el ligando del TNF es 4-1BBL y el ligando de la superfamilia de Ig es CD80.

65. El método del punto 57 o 58, en el que el complejo de reconocimiento antigénico se expresa de manera constitutiva en la superficie de la célula.
- 5 66. El método del punto 57 o 58, en el que el antígeno vírico es un antígeno específico de Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (EBV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o virus de la gripe.
67. El método del punto 57 o 58, en el que al menos dos ligandos coestimuladores se expresan de manera constitutiva en la superficie de la célula.
- 10 68. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una célula inmunosensible de uno cualquiera de los puntos 1-20, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.
69. Una composición farmacéutica para el tratamiento de una neoplasia, que comprende una cantidad eficaz de un linfocito T específico de antígeno tumoral de uno cualquiera de los puntos 15-17, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 70. Una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección causada por patógenos, que comprende una cantidad eficaz de un linfocito T específico de virus del punto 14, en un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 71. La composición farmacéutica de uno cualquiera de los puntos 67-69, que comprende adicionalmente una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL-12, IL7, IL15, IL21, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón alfa, beta o gamma y eritropoyetina.
- 25 72. Un kit para el tratamiento de una neoplasia, una infección causada por patógenos, un trastorno autoinmunitario, o un trasplante alogénico, comprendiendo el kit una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno y a un ligando coestimulador exógeno.
- 30 73. El kit del punto 71, en el que el kit comprende adicionalmente instrucciones por escrito para el uso de dicha célula para el tratamiento de un paciente que tiene una neoplasia, una infección causada por patógenos, un trastorno autoinmunitario o un trasplante alogénico.
74. El método de uno cualquiera de los puntos 21-67, que adicionalmente comprende la etapa de inmunosensible obteniendo la célula inmunosensible o el ligando coestimulador.
- 35

**REIVINDICACIONES**

1. Un linfocito T que comprende:  
un receptor de antígeno recombinante, que se une a un antígeno; y  
un ligando coestimulador recombinante, que es CD80 o 4-1BBL.
2. El linfocito T de la reivindicación 1, en el que el linfocito T se transduce con un ácido nucleico que codifica el ligando coestimulador.
3. Un linfocito T, que comprende:  
un receptor de antígeno recombinante, que se une a un antígeno; y  
un vector que codifica un ligando coestimulador, cuyo ligando coestimulador es CD80 o 4-1BBL.
4. El linfocito T de la reivindicación 3, en el que el vector es un vector vírico.
5. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ligando coestimulador se expresa de manera constitutiva o inducible en la superficie del linfocito T.
6. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ligando coestimulador es 4-1BBL.
7. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ligando coestimulador es CD80.
8. El linfocito T de la reivindicación 6 o reivindicación 7, en el que el ligando coestimulador se expresa de manera constitutiva en la superficie del linfocito T.
9. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el linfocito T es un linfocito T citotóxico (CTL) o un linfocito T regulador.
10. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el receptor de antígeno recombinante es un receptor de antígeno quimérico (CAR).
11. El linfocito T de la reivindicación 10, en el que el CAR comprende un elemento de señalización de CD28.
12. El linfocito T de la reivindicación 10, en el que el receptor de antígeno quimérico es Pz1 o en el que el receptor de antígeno quimérico es P28z.
13. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el receptor de antígeno recombinante se expresa de manera constitutiva en la superficie del linfocito T.
14. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el ligando coestimulador está codificado por un vector retrovírico.
15. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno carcinoembrionario (CEA), IL13R $\alpha$ , her-2, CD19, NY-ESO-1, HIV-1 Gag, Lewis Y, Mart-1, gp100, tirosinasa, WF-1, hTERT y mesotelina.
16. El linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4 a 15, en el que el linfocito T comprende adicionalmente un segundo ligando coestimulador recombinante.
17. El linfocito T de la reivindicación 16, en el que dicho segundo ligando coestimulador recombinante se selecciona del grupo que consiste en OX40L, CD70, LIGHT, CD30L y CD86.
18. Un kit para su uso en el tratamiento de una neoplasia, un trastorno autoinmunitario o un trasplante alogénico, comprendiendo el kit un linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
19. Un linfocito T para su uso en el tratamiento o prevención de una neoplasia en un paciente, comprendiendo el linfocito T:  
un receptor de antígeno quimérico que se une a un antígeno tumoral; y  
un ligando coestimulador 4-1BBL recombinante.
20. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una neoplasia, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz del linfocito T de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
21. La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de neoplasia de la reivindicación 20, comprendiendo adicionalmente dicha composición una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL-12,

IL-7, IL-15, IL-21, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón alfa, beta o gamma y eritropoyetina.

5 22. El linfocito T para el uso de la reivindicación 19, o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 20 o 21, en el que:  
la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama y glioblastoma; y/o  
el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en antígeno de membrana específico de próstata (PSMA),  
10 CD19, NY-ESO-1, WT-1, hTERT y mesotelina.

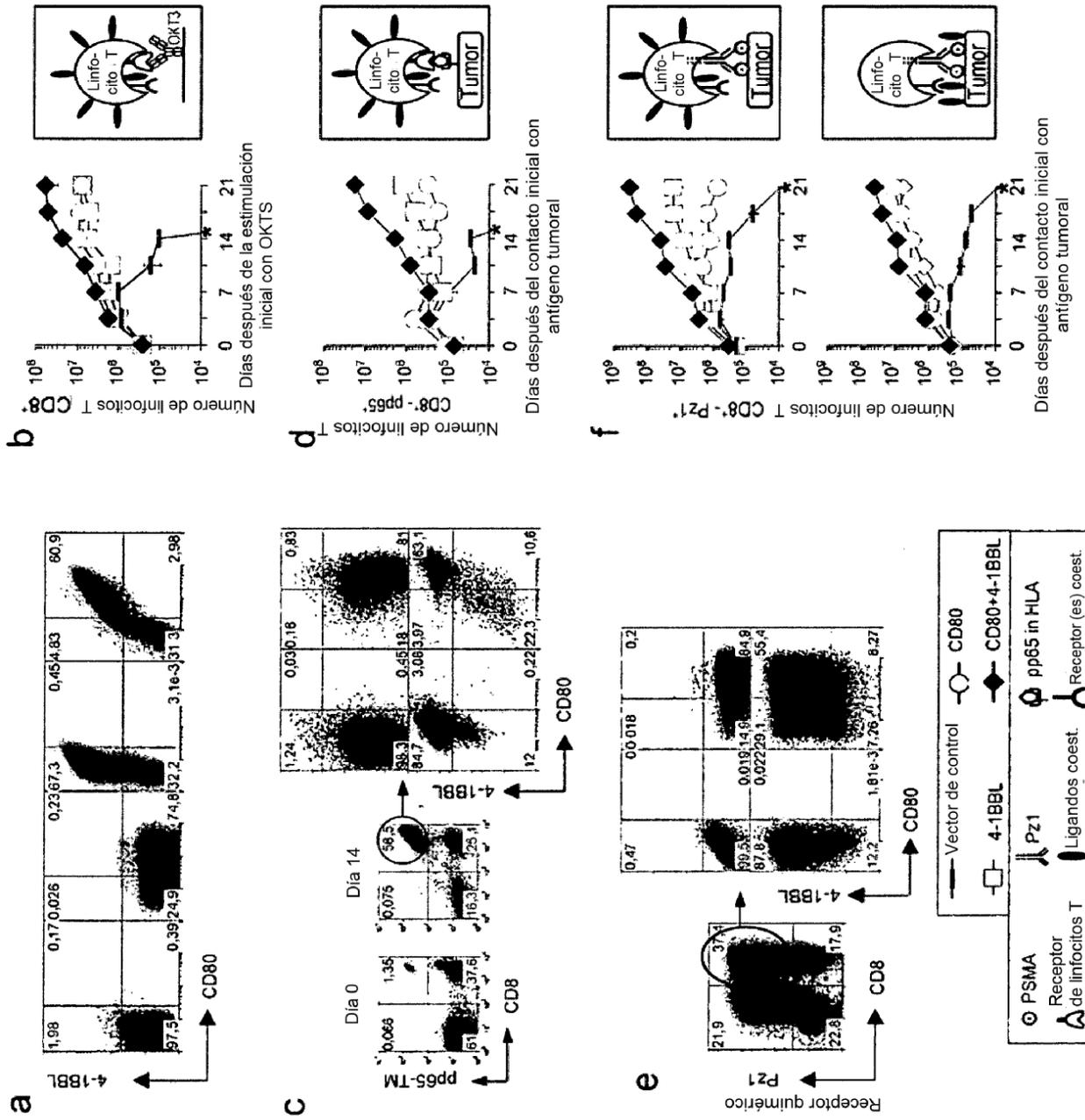
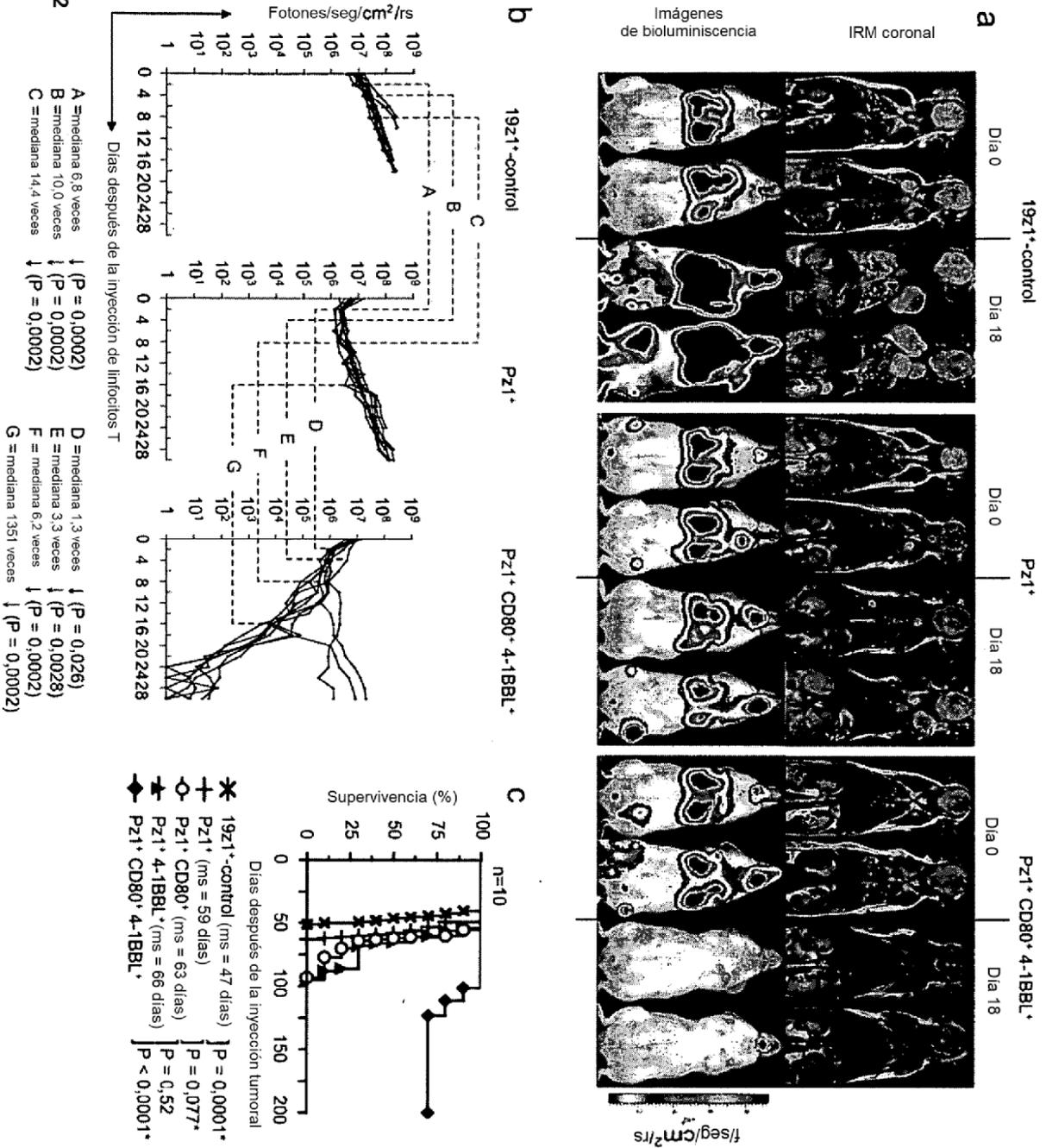


Figura 1

**Figura 2**



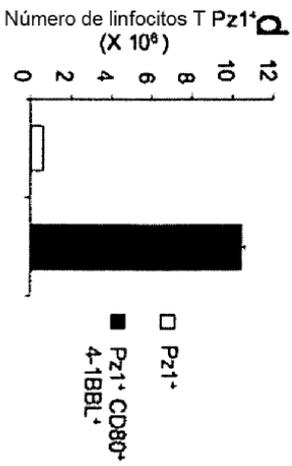
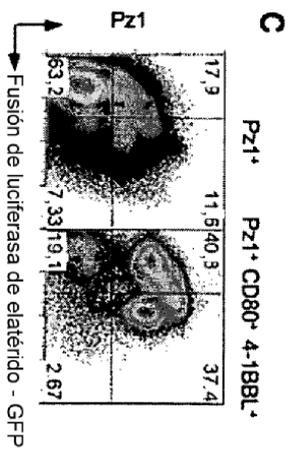
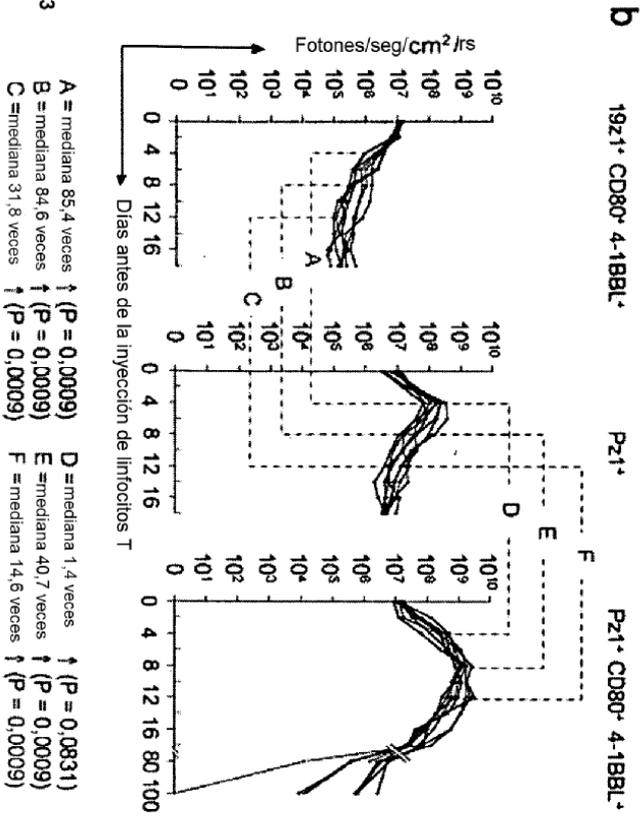
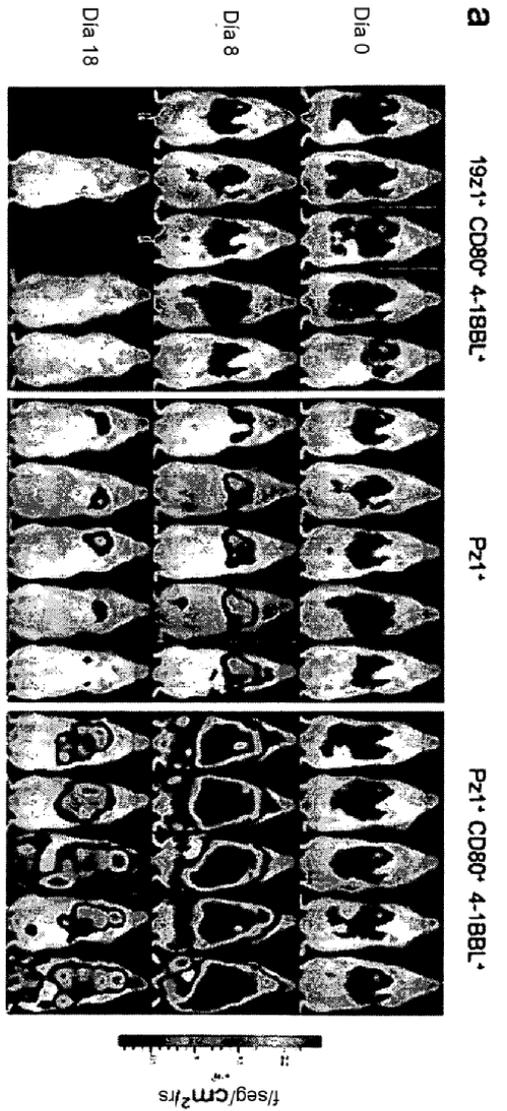
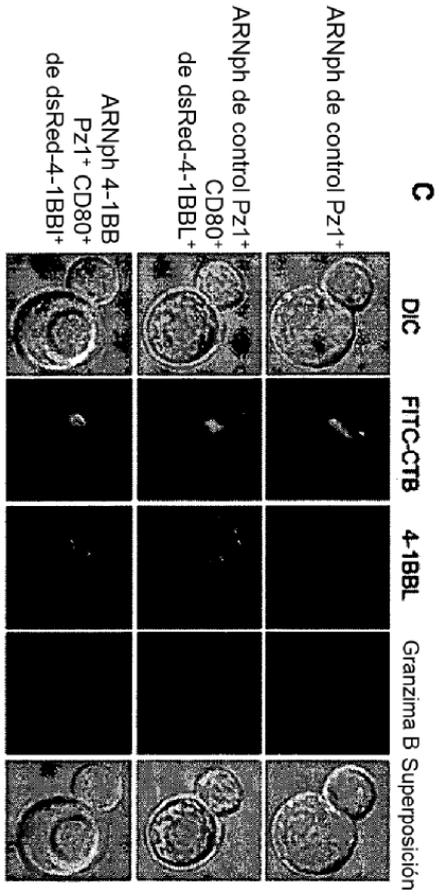
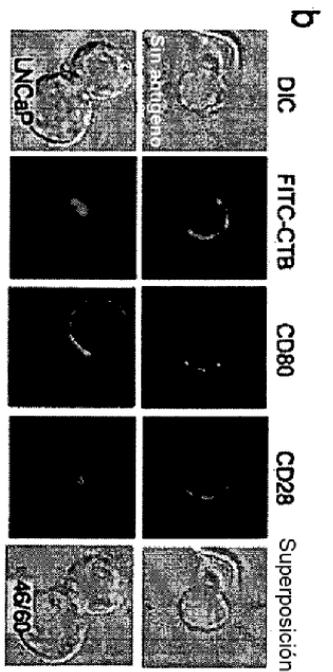
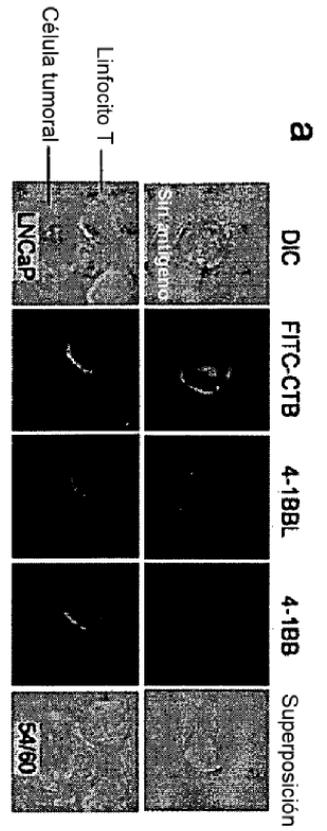
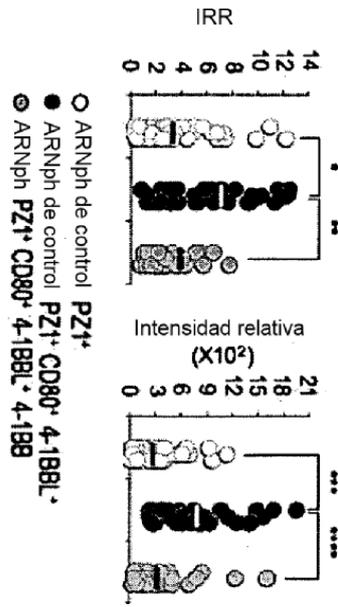


Figura 3



**d**



**e**

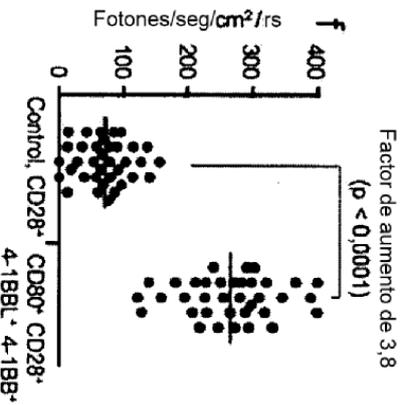
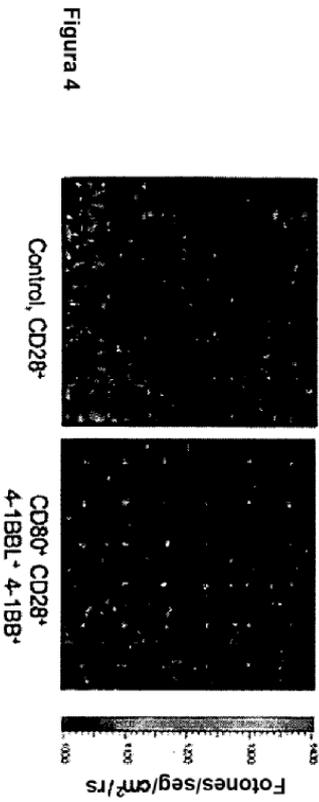


Figura 4

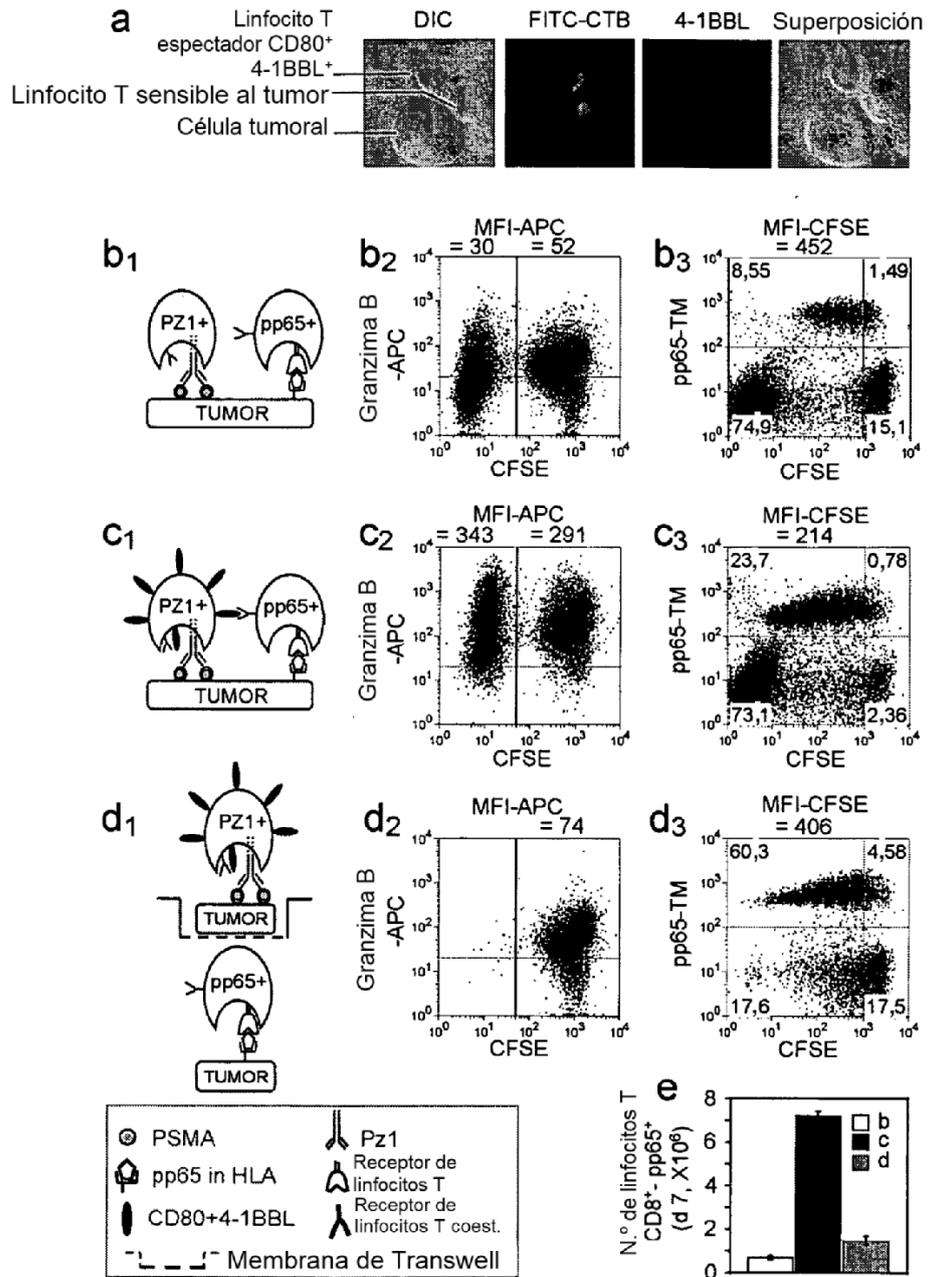


Figure 5

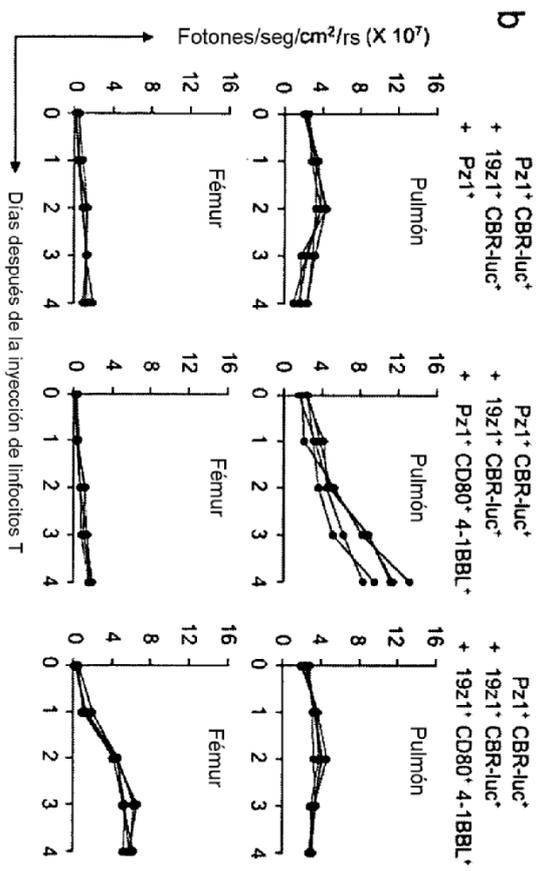
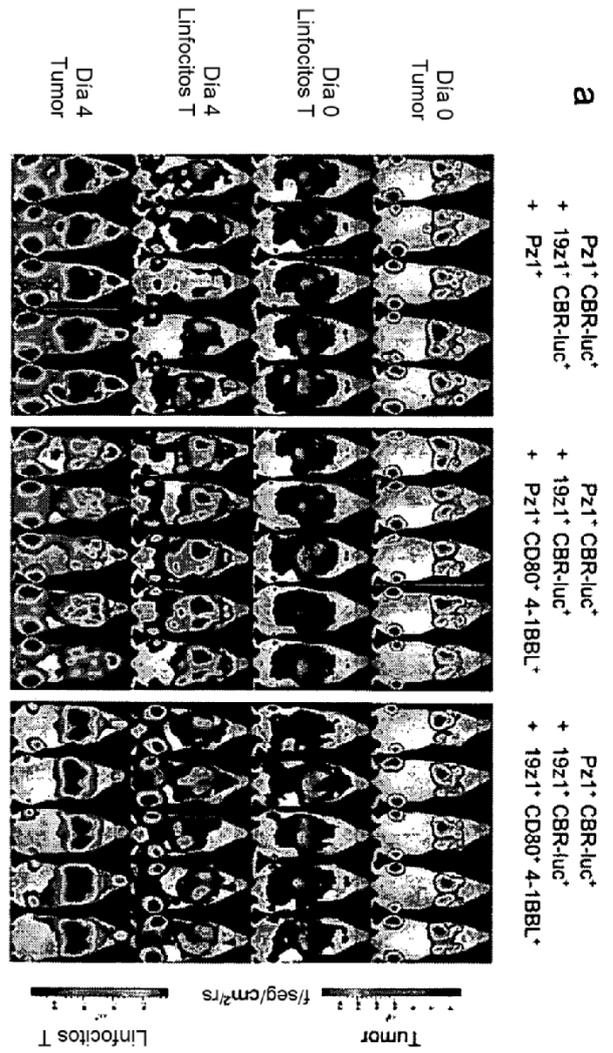
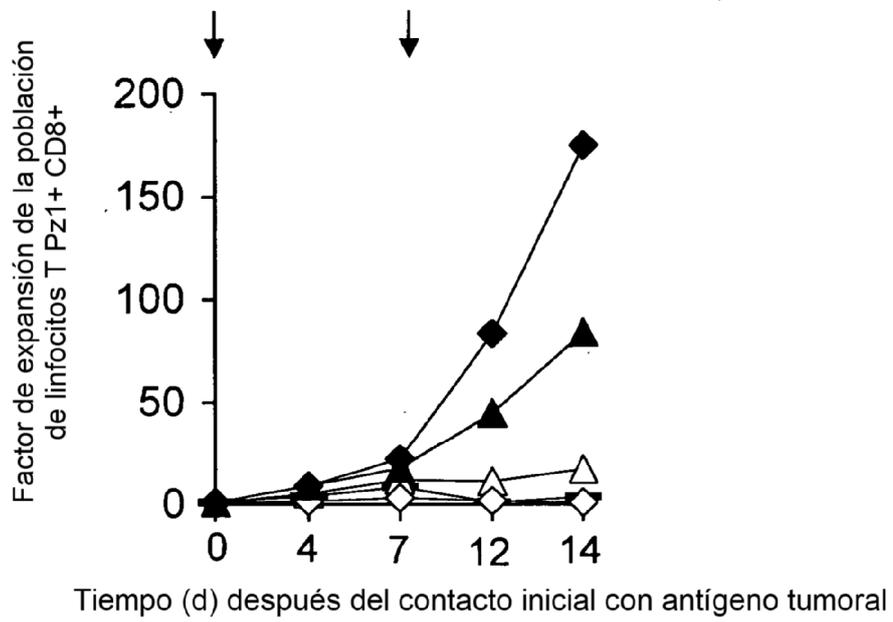


Figura 6



- Pz1
- △— P28z
- ◇— P284-1BBz
- ▲— P28z + 4-1BBL
- ◆— Pz1+CD80+4-1BBL

Figura 7



My NCBI [\[Sign In\]](#) [\[Regis\]](#)

PubMed
Nucleótido
Proteína
Genoma
Estructura
PMC
Taxonomía
OMIM
Books

Búsqueda:

Pantalla:

Intervalo: de  a  características:  CDD

1: [NP\\_005182](#). Informes de precursor de antígeno CD80 [gi:4885123]

Enlace con B,  
dominios conservados, enlaces

Comentario	Características	Secuencia
LOCUS	NP_005182 288 aa lineal PRI 24-FEB-2008	
DEFINICIÓN	Precursor de antígeno CD80 [ <i>Homo Sapiens</i> ].	
REFERENCIA	NP 005182	
VERSIÓN	NP_005182.1 GI:4885123	
FUENTE DE BD	REFSEQ: registro NM_005191.3	
PALABRAS CLAVE		
FUENTE	<i>Homo Sapiens</i> (ser humano)	
ORGANISMO	<a href="#">Homo Sapiens</a> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.	
REFERENCIA	1 (restos 1 a 288)	
AUTORES	Nolan,A., Weiden,M., Kelly,A., Hoshino,Y. , Hoshino,S., Mehta,N. and Gold,J.A.	
TÍTULO	CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis	
PUBLICACIÓN PUBMED	Am. J. Respir. Crit. Care Med. 177 (3), 301-308 (2008)	
OBSERVACIÓN	<a href="#">17989345</a> GenerIF: la expresión de CD80 se reguló positivamente en los monocitos en circulación en sujetos sépticos el día 1	
REFERENCIA	2 (restos 1 a 288)	
AUTORES	Stephan,M.T., Ponomarev,V., Brentjens,R.J., Chang,A.H., Dobrenkov,K.V., Heller,G. and Sadelain,M.	
TÍTULO	T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection	
PUBLICACIÓN PUBMED	Nat. Med. 13 (12), 1440-1449 (2007)	
OBSERVACIÓN	<a href="#">18026115</a> GenerIF; CD80 Y 4-1BBL inducen la auto-coestimulación y coestimulación en trans en células tumorales	
REFERENCIA	3 (restos 1 a 288)	
AUTORES	Habib-Agahi,M., Phan,T.T. y Searle,P.F.	
TÍTULO	Co-stimulation with 4-1BB ligand allows extended T-cell proliferation, synergizes with CD80/CD86 and can reactivate anergic T cells	
PUBLICACIÓN PUBMED	Int. Immunol. 19 (12), 1383-1394 (2007)	
OBSERVACIÓN	<a href="#">17977894</a> GenerIF: los linfocitos T que se habían insensibilizado contra anti-CD3 podrían reactivarse para proliferar cuando se coestimulan con 4-1BBL, en solitario o combinados con CD80/CD86.	
REFERENCIA	4 (restos 1 a 288)	
AUTORES	Kakoulidou, M., Giscombe,R., Zhao,X., Lefvert,A.K. y Wang,X.	
TÍTULO	Human Soluble CD80 is generated by alternative splicing, and recombinant soluble CD80 binds a CD28 and CD152 influencing T-cell activation	

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

PUBLICACIÓN Scand. J. Immunol. 66 (5), 529-537 (2007)  
PUBMED [17953528](#)

OBSERVACIÓN GeneRIF: sCD80 en suero humano añade un nuevo miembro a la familia de receptores solubles, lo que implica una red de factores coestimuladores con relevancia funcional

REFERENCIA 5 (restos 1 a 288)  
AUTORES Dopheide, J.F., Sester, U., Schlitt, A., Horstick, G., Rupprecht, H.J., Munzel, T. and Blankenberg, S.

TÍTULO Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in vitro

PUBLICACIÓN Coron. Artery Dis. 18 (7), 523-531 (2007)  
PUBMED [17925605](#)

OBSERVACIÓN GeneRIF: CD40, CD80 y CD86 se regulan positivamente en células dendríticas derivadas de monocitos cultivados de pacientes con arteriopatía coronaria

REFERENCIA 6 (restos 1 a 288)  
AUTORES Weiskirchen, R., Pino, J.D., Macalma, T., Bister, K. and Beckerle, M.C.

TÍTULO The cysteine-rich protein family of highly related LIM domain proteins

PUBLICACIÓN J. Biol. Chem. 270 (48), 28946-28954 (1995)  
PUBMED [7499425](#)

REFERENCIA 7 (restos 1 a 288)  
AUTORES Freeman, G.J., Distech, C.M., Gribben, J.G., Adler, D.A., Freedman, A.S., Dougery, J. and Nadler, L.M.

TÍTULO The gene for B7, a costimulatory signal for T-cell activation, maps a chromosomal region 3q13.3-3q21

PUBLICACIÓN Blood 79 (2), 489-494 (1992)  
PUBMED [1370389](#)

REFERENCIA 8 (restos 1 a 288)  
AUTORES Selvakumar, A., Mohanraj, B.K., Eddy, R.L., Shows, T.B., White, P.C. and Dupont, B.

TÍTULO Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7

PUBLICACIÓN Immunogenetics 36 (3), 175-181 (1992)  
PUBMED [1377173](#)

REFERENCIA 9 (restos 1 a 288)  
AUTORES Freeman, G.J., Gray, G.S., Gimmi, C.D., Lombard, D.B., Zhou, L.J., White, M., Fingerth, J.D., Gribben, J.G. and Nadler, L.M.

TÍTULO Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7

PUBLICACIÓN J. Exp. Med. 174 (3), 625-631 (1991)  
PUBMED [1714935](#)

REFERENCIA 10 (restos 1 a 288)  
AUTORES Freeman, G.J., Freedman, A.S., Segil, J.M., Lee, G., Whitman, J.F. and Nadler, L.M.

TÍTULO B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells

PUBLICACIÓN J. Immunol. 143 (8), 2714-2722 (1989)  
PUBMED [2794510](#)

COMENTARIO REFSEQ VALIDADA: Este registro se ha validado o revisado de manera preliminar. La secuencia de referencia se obtuvo de BP225173.1, BC042665.1 y AC073352.22.

Resumen: El antígeno de activación de linfocitos B, B7-1 (denominado anteriormente B7) proporciona señales reguladoras de linfocitos T como consecuencia de la unión a los ligandos CD28 (MIM 186760) y CTLA4 (MIM 123890) de linfocitos T. [proporcionado por OMIM].

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

Nota de publicación: este registro de RefSeq incluye un subconjunto de las publicaciones disponibles para este gen. Por favor, véase el registro de Entrez Gene para acceder a publicaciones adicionales.

```

CARACTERÍSTICAS      Localización/Modificadores
FUENTE                1..-288
                      /organism="Homo Sapiens"/
                      db_xref="taxón:9606"
                      /chromosome="3"
                      /map="3q13.3-q21"
Proteína           1..288
                      /product="precursor de antígeno CD80"
                      /note="variante de molécula coestimuladora IgV-CD80; antígeno CD80
                      (ligando de antígeno CD80 1, antígeno B7-1); factor coestimulador;
                      antígeno de activación de linfocitos B B7"
sig peptide       1. .34
                      /calculated_mol_wt=3754
mat peptide       35..288
                      /product="antígeno CD80"
                      /calculated_mol_wt=29312
Región            37..139
                      /region_name="IG"
                      /note="Inmunoglobulina; smart00409"
                      /db_xref="CDD:47718"
Región            37..135
                      /region name="conjunto V"
                      /note="dominio del conjunto V de inmunoglobulina. Este dominio se
                      encuentra en anticuerpos, así como en la proteína neural P0 y CTL4
                      entre otras; pfam07686"
                      /db_xref="CDD:87333"
Región            143..227
                      /region_name= "C2-set_2"
                      /note="dominio de inmunoglobulina del conjunto CD2 de tipo CD80. Estos
                      dominios pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulina; pfam08205"
                      /db_xref="CDD:71639"
CDS               1..288 /gene="CD80"
                      /coded_by= "NM_005191.3:396..1262"
                      /db_xref="CCDS:CCDS2989.1"
                      /db_xref="GenelD:941"
                      /db_xref="HGNC:1700"
                      /db_xref="HPRD:00202"
                      /db_xref="MIM:112203"
ORIGEN
    1 mghtrrqgts pskcpylnff qllvlaglsh fcsgvihvtk evkevatlsc ghnvsveela
    61 qtriywqkek kmvltmmsgd mniwpeyknr tifditnns ivilalrpsd egtyecvvlk
    121 yekdafkreh laevtlsvka dfptpsisdf eiptsnirri icstsggfpe phlswlengi
    181 elnainttvs qdpetelyav sskldfnmtt nhsfmcliky ghlrvnqtfn wnttkqehfp
    241 dnllpswait lisvngifvi ccltycfapr crerrrnerl rresvrpv
//

```

Descargo de responsabilidad | Escribir a la oficina de asistencia  
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

28 de agosto de 2007 16:53:42

NCBI Protein [Sign In] [Regis] My N  
 PubMed Nucleótido Proteína Genoma Estructura PMC Taxonomía OMIM Books  
 Búsqueda Proteína for [Go] [Clear]  
 Límite Vista previa/Índice Historial Archivo Detalles  
 Pantalla GenPept Muestra 5 Enviar a  
 Intervalo: de Inicio a fin características:  CDD + [Refresc.]

**1: P41273. Informes Factor de necrosis tumoral [gi:728739]**

Enlace con B, dominios conservados, enlaces

Comentario Características Secuencia  
 LOCUS P41273 254 aa lineal PRI 04-DIC-2007

DEFINICIÓN Miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral 9 (ligando 4-1BB).

REFERENCIA P41273

VERSIÓN P41273.1 GI:728739

FUENTE BD swissprot: locus TNFL9\_HUMAN, referencia P41273; clase: convencional. Referencias extra:Q2M3S2 creado: 1 de febrero de 1995. Secuencia actualizada: 1 de febrero de 1995. Anotación actualizada: 4 de diciembre del 2007. xrefs: U03398.1, AAA53134.1, BC104805.1, AAI04806.1, BC104807.1, AAI04808.1, 138427 xrefs (bases de datos de no secuencia): RefSeq:NP\_003802.1, UniGene:Hs.1524, DIP:DIP:3020N. Ensembl:ENSG00000125657. GenelD:8744, KEGG:hsa:8744, H-InvDB:HIX0040144, HGNC:11939, MIM:606182, PharmGKB:PA36629, ArravExoress:P41273. CleanEx:HS\_TNFSF9, GermOnline:ENSG00000125657, GO:0005102, GO:0006915, GO:0008283, GO:0007267, GO:0007165, InterPr Pfam:PF00229, SMART:SM00207, PROSITE:PS00251, PROSITE:PS50049

PALABRAS CLAVE Citocina; Membrana; Polimorfismo; Anclaje de señal; Transmembrana.

FUENTE ORGANISMO *Homo Sapiens* (ser humano) *Homo Sapiens* Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCIA 1 (restos 1 a 254)

AUTORES Alderson,M.R., Smith,C.A., Tough,T.W., Davis-Smith,T., Armitage,R.J., Falk,B., Roux,E., Baker,E., Sutherland,G.R., Din,W.S. and Goodwin,R.G.

TÍTULO Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand

PUBLICACIÓN PUBMED Eur. J. Immunol. 24 (9), 2219-2227 (1994) 8088337

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNm].

REFERENCIA 2 (restos 1 a 254)

AUTORES Gerhard, D.S., Wagner, L., Feingold, E.A., Shenmen, C.M., Grouse, L.H., Schuler, G., Klein, S.L., Old, S., Rasooly, R., Good, P., Guyer, M., Peck, A.M., Derge, J.G., Lipman, D., Collins, F.S., Jang, W., Sherry, S., Feolo, M., Misquitta, L., Lee, E., Rotmistrovsky, K., Greenhut, S.F., Schaefer, C.F., Buetow, K., Bonner, T.I., Haussier, D., Kent, J., Kiekhaus, M., Furey, T., Brent, M., Prange, C., Schreiber, K.,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=728739>

31/3/2008

Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

Shapiro, N., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Hsie, F., Driscoll, T., Soares, M.B., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brown-stein, M. J. , Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Piao, Y., Dudekula, D.B., Ko, M.S., Kawakami, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Gruber, C.E., Smith, M.R., Simmons, B., Moore, T., Waterman, R., Johnson, S.L. , Ruan, Y., Wei, C.L., Mathavan, S., Gunaratne, P.H. , Wu, J., Garcia, A.M., Hulyk, S.W., Fuh, E., Yuan, Y., Sneed, A., Kowis, C., Hodgson, A., Muzny, D.M., McPherson, J., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madari, A., Young, A.C., Wetherby, K.D., Granite, S.J., Kwong, P.N., Brinkley, C.P., Pearson, R.L., Bouffard, G.G. , Blakesly, R.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Griffith, M., Griffith, O.L., Krzywinski, M.I., Liao, N., Morin, R., Palmquist, D., Petrescu, A.S., Skalska, U., Smailus, D.E., Stott, J.M., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J., Holt, R.A., Baross, A., Marra, M.A. , Clifton, S., Makowski, K.A., Bosak, S. y Malek, J.

CONSRM MGC Project Team

TÍTULO The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)

PUBLICACIÓN Genome Res. 14 (10B), 2121-2127 (2004)

PUBMED [15489334](#)

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNm a gran escala].  
TEJIDO=Pulmón  
Errata:[Genome Res. Junio 2006; 16(6):804. Morrin, Ryan [corregido a Morin, Ryan]]

COMENTARIO En o antes del 16 de febrero del 2007, esta versión de secuencia reemplazó gi: 121941506, gi:7512264.  
[FUNCIÓN] Citocina que se une a TNFRSF9. Induce la proliferación de linfocitos T activados en sangre periférica. Puede tener un papel en la muerte celular inducida por activación (AICD). Puede desempeñar un papel en interacciones afines entre linfocitos T y linfocitos B/macrófagos.  
[SUBUNIDAD] Homotrimerico (Potencial).  
[LOCALIZACIÓN SUBCELULAR] Membrana; Proteína de membrana de tipo II de pase único.  
[ESPECIFICIDAD TISULAR] Expresada en cerebro, placenta, pulmón, músculo esquelético y riñón.  
[SIMILITUD] Pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral.

CARACTERÍSTICAS Localización/Modificadores

FUENTE 1. .254  
/organism= *Homo Sapiens*  
/db\_xref="taxón:9606"

gen 1. .254  
/gene="TNFSF9"

Proteína 1. .254  
/gene="TNFSF9"  
/product="Miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral 9"

Región 1. .254  
/gene="TNFSF9"  
/region\_name="Cadena madura"  
/experiment = "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales."  
/note="Miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral 9. /FTId=PRO\_0000185501."

Región 1. .28  
/gene="TNFSF9"  
/region\_name="dominio topológico"  
/inference="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=728739>

31/3/2008

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

```

Región      /note="citoplasmática (Potencial)." 17
Región      /gene="TNFSF9"
            /region_name="Variante"
            /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles
            adicionales"
            /note="P -> A (en dbSNP:rs442511). /FTId=VAR_011928.º 29. .49
Región      /gene="TNFSF9"
            /region_name="región transmembrana"
            /inference=" pruebas no experimentales, no se registraron detalles
            adicionales "
            /note="anclaje de señal para la proteína de membrana de tipo II
            Potencial)."
            35. .41
Región      /gene="TNFSF9"
            /region_name="región con preferencia composicional"
            /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles
            adicionales "
            /note="Poli-Leu."
            50..254
Región      /genes TNFSF9"
            /region_name="dominio topológico"
            /inference=" pruebas no experimentales, no se registraron detalles
            adicionales "
            /note="Extracelular (Potencial)."
            91..238
Sitio       /genes TNFSF9"
            /region_name="TNF"
            /note="Factor de Necrosis Tumoral; los miembros de la superfamilia de
            TNF incluyen las citocinas: TNF (TNF-alfa), LT (linfotoxina-alfa,
            TNF-beta), ligando de CD40, Apo2L (TRAIL), ligando de Fas, y ligando
            de osteoprotegerina (OPG); cd00184"
            /db_xref="CDD:29146"
            orden(94,142,144,199,204,234,238)
Sitio       /gene= "TNFSF9"
            /site_type="otro"
            /note="interfaz de trímero"
            /db_xref="CDD:29146"
            orden(110..111,116,162,169,176)
            /gene="TNFSF9"
            /site_type="otro"
            /note="sitios de unión a receptor"
            /db_xref="CDD:29146"

ORIGEN
    1 meyasdasld peapwppapr aracrulpwa lvagl11111 laaacavfla cpwavsgara
    61 spgsaasprl regpelspdd paglldlrqg mfaqlvaqnv llidgplswy sdpplagvsl
    121 tgglsykedt kelvvakagv yyvffqlelr rvvagegsgs vsllahlqpl rsaagaaala
    181 ltvdlppass earnsafgfq grllhlsagq rlgvhlhtea rarhawqltq gatvlgflrv
    241 tpeipaglps prse

//

```

Descarga de responsabilidad | Escribir a la oficina de asistencia  
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

28 de agosto de 2007 16:53:42

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=728739>

31/3/2008

Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

**1: BAB18304.** Informes Ligando OX40 [Homo...[gi:11275538]

Enlace con B, enlaces

Características

Secuencia

LOCUS	BAB18304 67 aa lineal PRI 19-OCT-2004
DEFINICIÓN	ligando de OX40 [ <i>Homo Sapiens</i> ].
REFERENCIA	BAB18304
VERSIÓN	BAB18304.1 GI:11275538
FUENTE DE BD	referencia <a href="#">AB042988.2</a>
PALABRAS CLAVE	.
FUENTE	<i>Homo Sapiens</i> (ser humano)
ORGANISMO	<i>Homo Sapiens</i> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCIA	1
AUTORES	Hikami,K., Tsuchiya,N. y Tokunaga,K.
TÍTULO	New variations in human OX40 ligand (CD134L) gene
PUBLICACIÓN PUBMED	Genes Immun. 1 (8), 521-522 (2000) <a href="#">11197696</a>
REFERENCIA	2 (restos 1 a 67)
AUTORES	Hikami,K., Tsuchiya,N. y Tokunaga,K.
TÍTULO	Presentación directa
PUBLICACIÓN	Presentada (19 de mayo de 2000) Koki Hikami, University of Tokyo, Departamento de Genética Humana; 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokio 113-0033, Japón (E-mail: <a href="mailto:kokihikami@mail.goo.ne.jp">kokihikami@mail.goo.ne.jp</a> , Tel:81-3-5841-3693, Fax:81-3-5802-8619)
CARACTERÍSTICAS	Localización/Modificadores
FUENTE	1. .SI /organism=" <i>Homo Sapiens</i> " /db_xref="taxón:9606" /chromosome="1" /map="1q25"
<u>Proteína</u>	1..67 /product="ligando de OX40"
<u>CDS</u>	1. .67 /gene="OX40L" /coded_by="join(AB042988.2:55..207,AB042988.2:462..>510)"
ORIGEN	1 mervqpleen vgnaarprfe rnklllvasv igglglllcf tyiclhfisal qvshrypriq 61 sikvqft

//

Descargo de responsabilidad | Escribir a la oficina de asistencia  
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

**1: NP\_001243. Informes Factor de necrosis tumoral [gi:11275538]**

Enlace con B,  
dominios conservados, enlaces

<u>Comentario</u>	<u>Características</u>	<u>Secuencia</u>
LOCUS	NP_001243.193 aa lineal PRI 11-FEB-2008	
DEFINICIÓN	Superfamilia de ligando del factor de necrosis tumoral, miembro 7 [ <i>Homo Sapiens</i> ].	
REGISTRO	NP_001243	
VERSIÓN	NP_001243.1 GI:4507605	
FUENTE de BD	REFSEQ: registro NM 001252.3	
PALABRAS CLAVE	.	
FUENTE	<i>Homo Sapiens</i> (ser humano)	
ORGANISMO	<i>Homo Sapiens</i>	
REFERENCIA	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.	
AUTORES	1 (restos 1 a 193)	
TÍTULO	Yang,Z.Z., Novak,A.J., Ziesmer,S.C., Witzig,T.E. y Ansell,S.M.	
PUBLICACIÓN	CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells	
PUBMED	Blood 110 (7), 2537-2544 (2007)	
OBSERVACIÓN	<a href="#">17615291</a>	
REFERENCIA	GeneRIF: revela un nuevo papel para linfocitos B de linfoma no de Hodgkin en el desarrollo de linfocitos T reguladores intratumorales.	
AUTORES	2 (restos 1 a 193)	
TÍTULO	van Oosterwijk,M.F., Juwana,H., Arens,R. , Tesselaar,K., van Oers,M.H., Elderling,E. and van Lier,R.A.	
PUBLICACIÓN	CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development	
PUBMED	Int. Immunol. 19 (6), 713-718 (2007)	
OBSERVACIÓN	<a href="#">17548342</a>	
REFERENCIA	GeneRIF: las interacciones CD27-CD70 pueden promover la formación de linfocitos Th1 permitiendo que los linfocitos T vírgenes respondan a las señales de diferenciación y promoviendo la supervivencia de linfocitos T efectores activados.	
AUTORES	3 (restos 1 a 193)	
TÍTULO	Diegmann,J., Junker,K., Loncarevic,I.F. , Michel,S., Schimmel,B. and von Eggeling,F.	
PUBLICACIÓN	Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in lymphocytes	
PUBMED	Neoplasia 8 (11), 933-938 (2006)	
OBSERVACIÓN	<a href="#">17132225</a>	
REFERENCIA	GeneRIF: La apoptosis mediada por exposición a CD70 secretado por células tumorales puede contribuir a la incapacidad de los pacientes con carcinoma de células renales para desarrollar una respuesta antitumoral eficaz mediada por linfocitos.	
AUTORES	4 (restos 1 a 193)	
PUBMED	Adam,P.J., Terrett,J.A., Steers,G., Stockwin,L., Loader,J.A.,	

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=4507605>

31/3/2008

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

Fletcher,G.C., Lu,L.S., Leach,B.I., Mason,S., Stamps,A.C., Boyd,R.S., Pezzella,F., Gatter,K.C. y Harris,A.L.

TÍTULO CD70 (TNFSF7) is expressed at high prevalence in renal cell carcinomas and is rapidly internalised on antibody binding

PUBLICACIÓN Br. J. Cancer 95 (3), 298-306 (2006)

PUBMED [16892042](#)

OBSERVACIÓN GenerIF: El análisis inmunocitoquímico demostró que la unión de un anticuerpo anti-CD70 con CD70 (TNFSF7), expresado de forma endógena en la superficie de las líneas celulares A498 y 786-0, dio como resultado la rápida internalización del complejo anticuerpo-receptor.

REFERENCIA 5 (restos 1 a 193)

AUTORES Huang,J., Kerstann,K.W., Ahmadzadeh,M., Li,Y.F., El-Gamil,M., Rosenberg,S.A. y Robbins,P.F.

TÍTULO Modulation by IL-2 of CD70 and CD27 expression on CD8+ T cells: importance for the therapeutic effectiveness of cell transfer immunotherapy

PUBLICACIÓN J. Immunol. 176 (12), 7726-7735 (2006)

PUBMED [16751420](#)

OBSERVACIÓN GenerIF: La interacción de CD70 con CD27 desempeña un papel directo en la activación de linfocitos T mediada por IL-2.

REFERENCIA 6 (restos 1 a 193)

AUTORES Kobata,T., Jacquot,S., Kozlowski,S., Agematsu,K., Schlossman,S.F. y Morimoto,C.

TÍTULO CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells

PUBLICACIÓN Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (24), 11249-11253 (1995)

PUBMED [7479974](#)

REFERENCIA 7 (restos 1 a 193)

AUTORES Brown,G.R., Meek,K., Nishioka,Y. y Thiele,D.L.

TÍTULO CD27-CD27 ligand/CD70 interactions enhance alloantigen-induced proliferation and cytolytic activity in CD8+ T lymphocytes

PUBLICACIÓN J. Immunol. 154 (8), 3686-3695 (1995)

PUBMED [7706711](#)

REFERENCIA 8 (restos 1 a 193)

AUTORES Hintzen,R.Q., Lens,S.M., Koopman,G., Pals,S.T., Spits,H. y van Lier,R.A.

TÍTULO CD70 represents the human ligand for CD27

PUBLICACIÓN Int. Immunol. 6 (3), 477-480 (1994)

PUBMED [8186199](#)

REFERENCIA 9 (restos 1 a 193)

AUTORES Hintzen,R.Q., Lens,S.M., Beckmann,M.P., Goodwin,R.G., Lynch,D. y van Lier,R.A.

TÍTULO Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of the TNF gene family

PUBLICACIÓN J. Immunol. 152 (4), 1762-1773 (1994)

PUBMED [8120385](#)

REFERENCIA 10 (restos 1 a 193)

AUTORES Bowman,M.R., Crimmins,M.A., Yetz-Aldape,J., Kriz,R., Kelleher,K. y Herrmann,S.

TÍTULO The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27

PUBLICACIÓN J. Immunol. 152 (4), 1756-1761 (1994)

PUBMED [8120384](#)

COMENTARIO **REFSEQ REVISADO:** Este registro lo ha revisado el personal del NCBI. La secuencia de referencia procedía de AC008760.7.

Resumen: La proteína codificada por este gen es una citocina que pertenece a la familia de ligando de factor de necrosis tumoral (TNF). Esta citocina es un ligando para TNFSF27/CD27. Es un antígeno de superficie en linfocitos T y B activados, pero no en reposo. Induce la proliferación de linfocitos T coestimulados, potencia la generación de linfocitos T citolíticos y contribuye a la activación de linfocitos T. También se ha indicado que esta citocina desempeña un papel en la regulación de la activación de linfocitos B, función citotóxica de linfocitos citolíticos naturales y síntesis de inmunoglobulina.

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

Nota de Publicación: este registro de RefSeq incluye un subconjunto de las publicaciones que están disponibles para este gen. Por favor, véase el registro de Entrez Gene para acceder a publicaciones adicionales.

CARACTERÍSTICAS Localización /Modificadores

FUENTE 1..193  
/organism="Homo Sapiens"  
/db\_xref="taxón:9606"  
/chromosome="19"  
/map="19p13"

Proteína 1..193  
/product="superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral, miembro 7"  
/note=" antígeno CD70; ligando de CD27; antígeno de superficie CD70; antígeno Ki-24; superfamilia de factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 7"  
/calculated mol wt=20987

Región 58..189  
/region\_name="TNF"  
/note="Factor de Necrosis Tumoral; los miembros de la superfamilia de TNF incluyen las citocinas: TNF (TNF-alfa) TNF LT (linfotoxina-alfa, TNF-beta), ligando CD40, Apo2L (TRAIL), ligando de Fas, y ligando de osteoprotegerina (OPG); cd00184"  
/db\_xref="CDD:29146"

Sitio orden(61,105,107,154,159,185,189)  
/site\_type="otro"  
/note="interfaz de trimero"  
/db\_xref="CDD:29146"

Sitio orden(76..77,84,119,126,129)  
/site\_type="otro"  
/note="sitios de unión a receptores" /db\_xref="CDD:29146"

CDS 1..193  
/gene="CD70"  
/coded by="NM 001252.3:151..732"  
/db\_xref="CCDS:CCDS12170.1"  
/db\_xref="GeneID:970"  
/db\_xref="HGNC:11937"  
/db\_xref="HPRD:18515"  
/db\_xref="MIM:602840"

ORIGEN

```

1 mpeegsgcsvg rrrpygcvlr aalvplvagl viclvvcigr faqaqqqlpl eslgwdvael
61 qlnhtgpqqd prlywgggpa lgrsflhgpe ldkgqlrihr dgiymvhiqv tlaicsstta
121 srhhpttlav gicsparsis sllrlsfhgg ctiasqrllp largdtlctn ltgtllpsrn
181 tdetffgvqw vrp
//

```

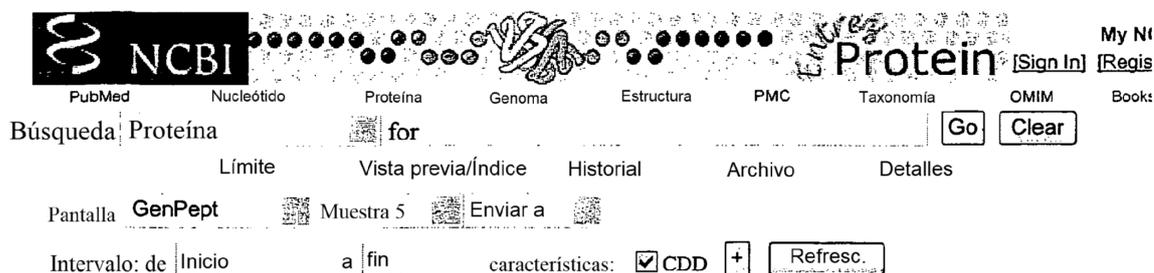
Descargo de responsabilidad | Escribir a la oficina de asistencia  
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

28 de agosto de 2007 16:53:42

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=4507605>

31/3/2008

Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI




My NCBI [\[Sign In\]](#) [\[Regis\]](#)

PubMed Nucleótido Proteína Genoma Estructura PMC Taxonomía OMIM Books

Búsqueda: Proteína

Límite Vista previa/Índice Historial Archivo Detalles

Pantalla **GenPept**

Intervalo: de  a  características:  CDD

**1: NP\_742011.1. Informes Factor de necrosis tumoral [gi:25952147]**

Enlace con B,  
dominios conservados, enlaces

Comentarios Características Secuencia

LOCUS NP\_742011.1 204 aa lineal PRI 16-MAR-2008

DEFINICIÓN Superfamilia de ligando de factor de necrosis tumoral, miembro 14 isoforma 2 [*Homo Sapiens*].

REGISTRO NP\_742011

VERSIÓN NP\_742011.1 GI:25952147

FUENTE DE BD REFSEQ: registro [NM\\_172014.1](#)

PALABRAS

CLAVE

FUENTE *Homo Sapiens* (ser humano)

ORGANISMO *Homo Sapiens*  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCIA 1 (restos 1 a 204)

AUTORES Pawlak,K., Pawlak,D. y Mysliwiec,M.

TÍTULO LIGHT--a new member of the TNF superfamily in the plasma, dialysate and urine of uremic patients; the impact of residual diuresis and presence of viral hepatitis

PUBLICACIÓN Clin. Biochem. 40 (16-17), 1240-1244 (2007)

PUBMED [17826757](#)

OBSERVACIÓN GeneRIF: Los niveles de LIGHT en plasma parecen ser similares en pacientes con hemodiálisis (HD) y en sujetos sanos y no se vieron afectados por el sexo, edad, el período medio de historial de HD, etiología de la enfermedad, tipo de medicación y tipo de membrana de diálisis en uso.

REFERENCIA 2 (restos 1 a 204)

AUTORES Celik,S., Langer,H., Stellos,K., May,A.E. , Shankar,V., Kurz,K., Katus,H.A., Gawaz,M.P. y Dengler,T.J.

TÍTULO Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets at human vascular endothelium

PUBLICACIÓN Thromb. Haemost. 98 (4), 798-805 (2007)

PUBMED [17938804](#)

OBSERVACIÓN GeneRIF: LIGHT asociado a plaquetas está implicado en la adhesión de plaquetas a endotelio mientras que LIGHT soluble induce un estado proinflamatorio en células endoteliales vasculares.

REFERENCIA 3 (restos 1 a 204)

AUTORES Loeffler,M., Le'Negrate,G., Krajewska,M. y Reed,J.C.

TÍTULO Attenuated Salmonella engineered a produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth

PUBLICACIÓN Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (31), 12879-12883 (2007)

PUBMED [17652173](#)

OBSERVACIÓN GeneRIF: *Salmonella typhimurium* atenuada que expresaba LIGHT inhibió el crecimiento de tumores primarios, así como la diseminación de metástasis pulmonar, en diversos modelos tumorales de ratón empleando líneas celulares de carcinoma murino en ratones inmunocompetentes.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=25952147>

31/3/2008

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

- REFERENCIA 4 (restos 1 a 204)
- AUTORES Nadiminty,N., Chun,J.Y., Hu,Y., Dutt,S., Lin,X. y Gao,A.C.  
TÍTULO LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway  
PUBLICACIÓN Biochem. Biophys. Res. Commun. 359 (2), 379-384 (2007)  
PUBMED [17543278](#)
- OBSERVACIÓN GeneRIF: además de activar NF-kappaB/p52, LIGHT también activa Stat3 a través de la ruta de NIK.
- REFERENCIA 5 (restos 1 a 204)
- AUTORES Gill,R.M., Coleman,N.M. and Hunt,J.S.  
TÍTULO Differential cellular expression of LIGHT and its receptors in early gestation human placent  
PUBLICACIÓN J. Reprod. Immunol. 74 (1-2), 1-6 (2007)  
PUBMED [17010447](#)
- OBSERVACIÓN GeneRIF: el sistema LIGHT puede regular los estados temprano a medio de desarrollo placentario mediante la expresión programada temporalmente específica de células del ligando y sus receptores, y también puede ayudar a conservar el privilegio inmune placentario.
- REFERENCIA 6 (restos 1 a 204)
- AUTORES Yu,K.Y., Kwon,B., Ni,J., Zhai,Y., Ebner,R. y Kwon,B.S.  
TÍTULO A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis  
PUBLICACIÓN J. Biol. Chem. 274 (20), 13733-13736 (1999)  
PUBMED [10318773](#)
- REFERENCIA 7 (restos 1 a 204)
- AUTORES Harrop,J.A., McDonnell,P.C., Brigham-Burke,M. , Lyn,S.D., Minton,J., Tan,K.B., Dede,K., Spampinato,J., Silverman,C., Hensley,P., DiPrinzio,R., Emery,J.G., Deen,K., Eichman,C., Chabot-Fletcher,M. , Truneh,A. y Young,P.R.  
TÍTULO Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth  
PUBLICACIÓN J. Biol. Chem. 273 (42), 27548-27556 (1998)  
PUBMED [9765287](#)
- REFERENCIA 8 (restos 1 a 204)
- AUTORES Zhai,Y., Guo,R., Hsu,T.L., Yu,G.L., Ni,J., Kwon,B.S., Jiang,G.W., Lu,J., Tan,J., Ugustus,M., Carter,K., Rojas,L., Zhu,F., Lincoln,C., Endress,G., Xing,L., Wang,S., Oh,K.O., Gentz,R., Ruben,S.,Lippman,M.E., Hsieh,S.L. y Yang,D.  
TÍTULO LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer  
PUBLICACIÓN J. Clin. Invest. 102 (6), 1142-1151 (1998)  
PUBMED [9739048](#)
- REFERENCIA 9 (restos 1 a 204)
- AUTORES Marsters,S.A., Sheridan,J.P., Pitti,R.M., Brush,J., Goddard,A. and Ashkenazi,A.  
TÍTULO Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3  
PUBLICACIÓN Curr. Biol. 8 (9), 525-528 (1998)  
PUBMED [9560343](#)
- REFERENCIA 10 (restos 1 a 204)
- AUTORES Mauri,D.N., Ebner,R., Montgomery,R.I., Kochel,K.D., Cheung,T.C., Yu,G.L., Ruben,S., Murphy, M. , Eisenberg,R.J., Cohen,G.H., Spear,P.G. and Ware,C.F.  
TÍTULO LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator  
PUBLICACIÓN Immunity 8 (1), 21-30 (1998)  
PUBMED [9462508](#)

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

COMENTARIO REFSEQ REVISADO: Este registro lo ha revisado el personal del NCBI. La secuencia referencia procedía de AY028261.1 and AF064090.1.

Resumen: la proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de ligando de factor de necrosis tumoral (TNF). Esta proteína es un ligando para TNFRSF14, que es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, y que también se conoce como un mediador de entrada de herpes virus (HVEM). Esta proteína puede actuar como un factor coestimulador para la activación de células linfoides y como un elemento disuasorio de infección de herpes virus. Se ha demostrado que esta proteína estimula la proliferación de linfocitos T, y desencadena la apoptosis de diversas células tumorales. También se ha indicado que esta proteína evita la apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral alfa en hepatocitos primarios. Se han presentado dos variantes de transcrito de corte y empalme alternativo que codifican isoformas distintas.

Variante de transcrito: Esta variante (2) carece de un segmento de codificación en fase en comparación con la variante 1, dando como resultado una isoforma (2) que carece de una región interna, en comparación con la isoforma 1.

Nota de publicación: Este registro de RefSeq incluye un subconjunto de las publicaciones que están disponibles para este gen. Por favor, véase el registro de Entrez Gene para acceder a publicaciones adicionales.

CARACTERÍSTICAS Localización/Modificadores  
FUENTE 1..204  
/organism="Homo Sapiens"  
/db\_xref="taxón:9606"  
/chromosome="19"  
/map="19p13.3"  
Proteína 1..204  
/product="superfamilia de ligando de factor de necrosis tumoral, miembro 4 isoforma 2"  
/note="LIGHT transmembrana delta; miembro de superfamilia de factor de necrosis tumoral LIGHT; mediador de entrada de herpes virus A; tipo 2 del receptor del factor de necrosis tumoral; ligando ara mediador de entrada de herpes virus "  
/calculated\_mol\_wt=22265  
Región 58..202  
/region\_name="TNF"  
/note="Factor de Necrosis Tumoral; los miembros de la superfamilia del TNF incluyen las citocinas: TNF (TNF-alfa), LT (linfotoxina-alfa, TNF-beta), ligando CD40, Apo2L (TRAIL), ligando Fas, y ligando de osteoprotegerina (OPG); cd00184"  
/db\_xref="CDD:29146"  
Sitio orden(61,106,108,166,171,198,202)  
  
/site\_type="otro"  
/note="interfaz de trimero"  
/db\_xref="CDD:29146"  
Sitio orden(79..80,85,127,134,139)  
/site\_type="otro"  
/note="sitios de unión a receptores"  
/db\_xref="CDD:29146"  
CDS 1..204  
/gene="TNFSF14"  
/coded\_by="NM\_172014.1:383..997"  
/note="la isoforma 2 la codifica la variante de transcrito 2"  
/db\_xref="GeneID:8740"  
/db\_xref="HGNC:11930"  
/db\_xref="MIM:604520"

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=25952147>

31/3/2008

Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

ORIGEN

```
1 meesvvrpsv fvvdgqtdip ftrlgrshrr qscsvardgp agsweqliqe rrshevnppaa
61 hltgansslt gsggp1lwet qlglaf1rgl syhdgalvvt kagyyyiysk vqlggvgcpl
121 glastithgl ykrtprypee lellvsqqsp cgratsssrw wwdssflggv vhleageevv
181 vrvlderlvr lrdgtrsyfg afmv
```

//

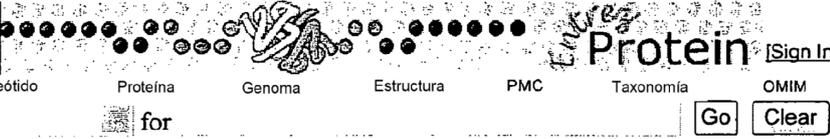
Descargo de responsabilidad | Escribir a la oficina de asistencia  
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

28 de agosto de 2007 16:53:42

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=25952147>

31/3/2008

Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI



My NCBI  
[Sign In] [Register]

PubMed    Nucleótido    Proteína    Genoma    Estructura    PMC    Taxonomía    OMIM    Books

Búsqueda

Límite    Vista previa/Índice    Historial    Archivo    Detalles

Pantalla

Intervalo: de  a  características:  CDD

**1: [AAB97877](#). Informes Proteína CD30L [Ho...[gi:2815515]**

Enlace con B, dominios conservados, enlaces

Características    Secuencia  
 LOCUS    AAB97877 234 aa lineal PRI 28-ENE-1998  
 DEFINICIÓN    Proteína CD30L [*Homo Sapiens*].  
 REGISTRO    AAB97877  
 VERSIÓN    AAB97877.1 GI:2815515  
 FUENTE DE BD    locus HSCD30L1 registro AF006381.1 locus HSCD30L2 registro AF006382.1 locus HSCD30L3 registro AF006383.1 locus HSCD30L4 registro AF006384.1  
 PALABRAS CLAVE    .  
 FUENTE    *Homo Sapiens* (ser humano)  
 ORGANISMO    *Homo Sapiens*  
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.  
 REFERENCIA    1 (restos 1 a 234)  
 AUTORES    Croager,E.J. and Abraham,L.J.  
 TÍTULO    Characterisation of the human CD30 ligand gene structure  
 PUBLICACIÓN    Biochim. Biophys. Acta 1353 (3), 231-235 (1997)  
 PUBMED    9349718  
 REFERENCIA    2 (restos 1 a 234)  
 AUTORES    Croager,E.J. and Abraham,L.J.  
 TÍTULO    Direct Submission  
 PUBLICACIÓN    Presentado (02-JUNIO-1997) Biochemistry, University of Western Australia, Entrance 2, Hackett Drive, Nedlands, Western Australia 6907, Australia  
 COMENTARIO    MÉTODO: traducción conceptual.  
 CARACTERÍSTICAS    Localización/Modificadores  
 FUENTE    1. .234  
           /organism="*Homo Sapiens*"  
           /db\_xref="taxón:9606"  
           /chromosome="9"  
           /map="9q33"  
Proteína    1. .234  
           /product="proteína CDL30"  
Región    104..220  
           /regi on\_name="TNF"  
           /note="Factor de Necrosis Tumoral; Los miembros de la superfamilia del TNF incluyen las citocinas: TNF (TNF-alfa), LT (linfotoxina-alfa, TNF-beta) , ligando CD40, Apo2L (TRAIL), ligando de Fas, y ligando de osteoprotegerina (OPG); cd00184"  
           /db\_xref="CDD:29146"  
Sitio    orden(107,140,142,190,195)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=2815515>

31/3/2008

Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

```

/site_type="otro"
/note="interfaz de trómero"
/db_xref="CDD:2 914 6"
Sitio      order(116..117,157,164,169)
/site_type="otro"
/note="sitio de unión a receptor"
/db_xref="CDD:29146"
CDS      1..234
/gene="CD30L"
/coded by="join(AF006381.1:1599..1793,AF006382.1:188..230,
ORIGEN    AF0063 83.1:534..605,AF006384.1: 347 . .741) "

      1 mdpqlqgaln gmappgdtdam hvpagsvash lgttsrsyfy lttatlalcl vftvatimvl
      61 vvqrtdsipn spdnpplkgg ncsedllcil krapfkkswa ylgvakhlk tklswnkdgi
      121 lhgvryqdg n lviqfpglyf iicqlqflvq cpnnsvdlkx ellinkhikk qxlvtvcesg
      181 mtkhvynl sqflldylqv nttisvndt xqyidtstfp lenvlsiflx snsd
//

```

Descargo de responsabilidad | Escribir a la oficina de asistencia  
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

28 de agosto de 2007 16:53:42

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=2815515>

31/3/2008

Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

PubMed Nucleótido Proteína Genoma Estructura PMC Taxonomía OMIM Books  
 My NCBI [Sign In] [Regis]

Búsqueda: Proteína for [Go] [Clear]

Límite Vista previa/Índice Historial Archivo Detalles

Pantalla GenPept Muestra 5 Enviar a

Intervalo: de Inicio a fin características:  CDD + [Refresc.]

 1: [P42081](#). Informes Activación de linfocitos T [gi:1168851]

Enlace con B, dominios conservados, enlaces

Comentarios	Características Secuencia
LOCUS	P42081 329 aa lineal PRI 15-JAN-2008
DEFINICIÓN	Precursor de antígeno de activación de linfocitos T CD86 (antígeno B7.2 de activación) (contrarreceptor de CTLA-4 B7.2) (B70) (FUN-1) (BU63).
REGISTRO	P42081
VERSIÓN	P42081.1 GI:1168851
FUENTE DE BD	swissprot: locus CD86_HUMAN, registro P42081; clase: convencional. Referencias extra: AON0P0,Q13655,Q6FHB1,Q6GTS4,Q7M4L5 creado: 1 de noviembre de 1995. Secuencia actualizada: 1 de noviembre de 1995. Anotación actualizada: 15 de enero de 2008. xrefs: U04343.1, AAB03814.1, L25259.1, AAA58389.1, CR541844.1, CAG46642.1, EF064748.1, ABK41931.1, BC040261.1, AAH40261.1, U17722.1, AAA86473.1, U17717.1, U17718.1, U17719.1, U17721.1, A48754, JC7605, 1185, 1NCN xrefs (base de datos que no son de secuencias): UniGene:Hs.171182, PDBsum:1185, PDBsum:1NCN, IntAct:P42081, Ensembl:ENSG00000114013, KEGG:hsa:942, H-InvDB:HIX0024331, HGNC:1705, HPA:CAB004319, MIM:601020, PharmGKB:PA26243, LinkHub:P42081, ArrayExpress:P42081, CleanEx:HS_CD86, GermOnline:ENSG00000114013, GO:0016021, GO:0005886, GO:0015026, GO:0005515, GO:0016563, GO:0007267, GO:0008284, GO:0045086, GO:0045404, GO:0043017, GO:0045630, GO:0045941, InterPro:IPR015651, InterPro:IPR007110, InterPro:IPR013783, InterPro:IPR003006, InterPro:IPR013106, InterPro:IPR003596, Gene3D:G3DSA:2.60.40.10, PANTHER:PTHR13712:SF45, Pfam:PF07686, SMART:SM00406. PROSITE:PS50835, PROSITE:PS00290 Estructura en 3D; Corte y empalme alternativo; glicoproteína; interacción
PALABRAS CLAVE	hospedador-virus; dominio de inmunoglobulina; membrana; polimorfismo; receptor; señal; transmembrana; conjugación de Ubl.
FUENTE	<i>Homo Sapiens</i> (ser humano)
ORGANISMO	<i>Homo Sapiens</i> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCIA	1 (restos 1 a 329)
AUTORES	Azuma,M., Ito,D., Yagita,H., Okumura,K., Phillips,J.H., Lanier,L.L. y Somoza,C.
TÍTULO	B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28
PUBLICACIÓN	Nature 366 (6450), 76-79 (1993)
PUBMED	7694153
OBSERVACIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNm] (ISOFORMA 2).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=1168851>

31/3/2008

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

REFERENCIA 2 (restos 1 a 329)  
 AUTORES Freeman,G.J., Gribben,J.G., Boussiotis,V.A. , Ng,J.W., Restivo,V.A. Jr., Lombard,L.A., Gray,G.S. y Nadler,L.M.  
 TÍTULO Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation  
 PUBLICACIÓN Science 262 (5135), 909-911 (1993)  
 PUBMED [7694363](#)

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNm] (ISOFORMA 1).  
 REFERENCIA 3 (restos 1 a 329)  
 AUTORES Magistrelli,G., Caron,G., Gauchat,J.F. , Jeannin,P., Bonnefoy,J.Y. y Delneste,Y.  
 TÍTULO Identification of an alternatively spliced variant of human CD86 mRNA  
 PUBLICACIÓN Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (5), 1211-1215 (2001)  
 PUBMED [11162656](#)

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNm] (ISOFORMA 3).  
 REFERENCIA 4 (restos 1 a 329)  
 AUTORES Halleck,A., Ebert,L., Mkoundinya,M., Schick,M., Eisenstein,S., Neubert,P., Kstrang,K., Schatten,R., Shen,B., Henze,S., Mar,W., Korn,B., Zuo,D., Hu,Y. y LaBaer,J.  
 TÍTULO Presentación directa  
 PUBLICACIÓN Presentado (??-JUNIO-2004)  
 OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNm A GRAN ESCALA] (ISOFORMA 2).  
 REFERENCIA 5 (restos 1 a 329)  
 AUTORES Livingston,R.J., Shaffer,T., McFarland,I., Nguyen,C.P., Stanaway,I.B., Rajkumar,N., Johnson,E.J. , da Ponte,S.H., Willa,H., Ahearn,M.O., Bertucci,C., Acklestad,J. , Carroll,A., Swanson, J., Gildersleeve,H.I. y Nickerson,D.A.  
 TÍTULO Presentación directa  
 PUBLICACIÓN Presentado (??-OCT-2006)  
 OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ADN GENÓMICO].  
 REFERENCIA 6 (restos 1 a 329)  
 AUTORES Gerhard,D.S., Wagner,L., Feingold,E.A., Shenmen,C.M., Grouse,L.H., Schuler,G., Klein,S.L., Old,S., Rasooly,R., Good,P., Guyer,M., Peck,A.M., Derge,J.G., Lipman,D., Collins,F.S. , Jang,W., Sherry,S., Feolo,M., Misquitta,L., Lee,E., Rotmistrovsky,K., Greenhut,S.F., Schaefer,C.F., Buetow,K., Bonner,T.I., Haussier,D., Kent,J., Kiekhaus,M., Furey,T., Brent,M., Prange,C., Schreiber,K., Shapiro,N., Bhat,N.K., Hopkins,R.F., Hsie,F., Driscoll,T., Soares,M.B., Casavant,T.L., Scheetz,T.E. , Brown-stein,M.J., Usdin,T.B., Toshiyuki,S., Carninci,P., Piao,Y., Dudekula,D.B., Ko,M.S. , Kawakami,K., Suzuki,Y., Sugano,S., Gruber,C.E., Smith,M.R., Simmons,B., Moore,T., Waterman,R., Johnson,S.L., Ruan,Y., Wei,C.L., Mathavan,S., Gunaratne, P.H. , Wu,J., Garcia,A.M., Hulyk,S.W., Fuh,E., Yuan,Y., Sneed,A., Kowis,C., Hodgson,A. , Muzny,D.M., McPherson,J., Gibbs,R.A., Fahey,J., Helton,E., Ketteman,M., Madan,A., Rodrigues,S., Sanchez,A., Whiting,M., Madari,A., Young,A.C., Wetherby,K.D., Granite,S.J., Kwong,P.N., Brinkley,C.P., Pearson,R.L., Bouffard,G.G., Blakesly,R.W., Green,E.D., Dickson,M.C., Rodriguez,A.C. , Grimwood,J., Schmutz,J., Myers,R.M., Butterfield,Y.S., Griffith,M. , Griffith,O.L., Krzywinski,M.I., Liao,N., Morin,R., Palmquist,D., Petrescu,A.S., Skalska,U., Smailus,D.E., Stott,J.M., Schnerch,A., Schein,J.E., Jones,S.J., Holt,R.A., Baross,A., Marra,M.A., Clifton,S., Makowski,K.A. , Bosak.S. y Malek,J.

CONSRM MGC Project Team  
 TÍTULO The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)  
 PUBLICACIÓN Genome Res. 14 (10B), 2121-2127 (2004)  
 PUBMED [15489334](#)

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNm A GRAN ESCALA] (ISOFORMA 1), Y VARIANTE THR-310.  
TEJIDO=Cerebro  
Errata: [Genome Res. 2006 Jun; 16 (6): 804. Morrin, Ryan [corregido a Morin, Ryan]]

REFERENCIA 7 (restos 1 a 329)

AUTORES Jellis,C.L., Wang,S.S., Rennert,P., Borriello,F., Sharpe,A.H., Green,N.R. y Gray,G.S.

TÍTULO Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86)

PUBLICACIÓN Immunogenetics 42 (2), 85-89 (1995)

PUBMED [7541777](#)

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ADN GENÓMICO] DE 7-329. TEJIDO=Prepucio

REFERENCIA 8 (restos 1 a 329)

AUTORES Lanier,L.L., O'Fallon,S., Somoza,C., Phillips,J.H., Linsley,P.S., Okumura,K., Ito,D. and Azuma,M.

TÍTULO CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL

PUBLICACIÓN J. Immunol. 154 (1), 97-105 (1995)

PUBMED [7527824](#)

OBSERVACIÓN CARACTERIZACIÓN.

REFERENCIA 9 (restos 1 a 329)

AUTORES Engel,P., Gribben,J.G., Freeman,G.J., Zhou,L.J., Nozawa,Y., Abe,M., Nadler,L.M., Wakasa,H. y Tedder,T.F.

TÍTULO The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen

PUBLICACIÓN Blood 84 (5), 1402-1407 (1994)

PUBMED [7520767](#)

OBSERVACIÓN IDENTIFICACIÓN COMO CD86.

REFERENCIA 10 (restos 1 a 329)

AUTORES Goto,E., Ishido,S., Sato,Y., Ohgimoto,S., Ohgimoto,K., Nagano-Fujii,M. y Hotta,H.

TÍTULO c-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity

PUBLICACIÓN J. Biol. Chem. 278 (17), 14657-14668 (2003)

PUBMED [12582153](#)

OBSERVACIÓN UBIQUITINACIÓN E INTERACCIÓN CON MARCH8.

COMENTARIO En o antes del 27 de febrero de 2007 esta versión de secuencia reemplazó gi:[74721835](#), gi:[74757610](#), gi:[627415](#), gi:[25392201](#).  
[FUNCIÓN] Receptor implicado en la señal coestimuladora esencial para la proliferación de linfocitos T y producción e interleucina 2, mediante la unión de CD28 o CTLA-4. Puede desempeñar un papel crítico en los acontecimientos tempranos de la activación de linfocitos T y coestimulación de linfocitos T vírgenes, tales como decidir entre inmunidad y anergia que se realiza por linfocitos T en un periodo de 24 horas después de la activación. La isoforma 2 interfiere con la formación de grupos de CD86 y actúa de este modo como un regulador negativo de la activación de linfocitos T.  
[SUBUNIDAD] Interacciona con MARCH8. Interacciona con la proteína MIR2 de herpes virus humano 8 (probable).  
[LOCALIZACIÓN SUBCELULAR] Membrana; proteína de membrana de tipo I de paso único.  
[PRODUCTOS ALTERNATIVOS] Acontecimiento=corte y empalme alternativo; isoformas nombradas=3; Nombre=1; IsoId=P42081-1; Secuencia = Presentada; Nombre=2; IsoId=P42081-3; Secuencia=VSP\_023124; Nombre=3; Sinónimos=CD86 deltaEC; IsoId=P42081-2; Secuencia=VSP\_009125.  
[ESPECIFICIDAD TISULAR] Expresado por linfocitos B activados y monocitos.  
[PTM] Poliubiquitinado; promovido por MARCH8 y da como resultado la endocitosis y la degradación de lisosomas.

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

[SIMILITUD] Contiene 1 dominio de tipo C2 similar a Ig (de tipo inmunoglobulina).  
 [SIMILITUD] Contiene 1 dominio de tipo V similar a Ig (de tipo inmunoglobulina).  
 [RECURSO WEB] Nombre=Wikipedia; Nota=CD86 entrada;  
 URL='http://en.wikipedia.org/wiki/CD86'.

CARACTERÍSTICAS FUENTE Localización/Modificadores  
 1. .329  
 /organism="Homo Sapiens"  
 /db\_xref="taxón:9606"

gen 1..329  
 /gene="CD86"  
 /note=sinónimo: CD28LG2"

Proteína 1..329  
 /gene="CD86"  
 /product="precursor de antígeno de activación de linfocitos T CD86 "

Región 1..23  
 /gene="CD86"  
 /region\_name="Señal"  
 /inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
 /note="Potencial."

Región 1. .6  
 /gene="CD86"  
 /region\_name="variante de corte y empalme"  
 /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
 /note="Ausente (en isoforma 2). /FTId=VSP\_023124."

Región 22..234  
 /gene="CD86"  
 /region\_name="variante de corte y empalme"  
 /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
 /note="Ausente (en isoforma 3). /FTId=VSP\_009125."

Región 24..329 /gene="CD86"  
 /region\_name="Cadena madura"  
 /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
 /note="antígeno de activación de linfocitos T CD86.  
 /FTId=PRO\_0000014550."

Región 24..247  
 /gene="CD86"  
 /region\_name="dominio topológico"  
 /inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales "  
 /note="Extracelular (Potencial)."

Región 27.. 31  
 /gene="CD86"  
 /region\_name="Región de cadena beta"  
 /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"

Región 27  
 /gene="CD86"  
 /region\_name="Conflicto"  
 /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
 /note="K -> E (en Ref. 7; AAA86473)."

Región 33. .131 /gene="CD86"

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

```

        /region_name="Dominio"
        /experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
        /note="tipo V similar a Ig"
Sitio      33
        /gene="CD86"
        /site_type="glicosilación"
        /inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"
        /note="ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."
```

Región 35..110

```

        /gene="CD86"
        /region_name="IGv"
        /note="Inmunoglobulina de tipo V; smart00406"
        /db_xref="CDD:47715"
```

Región 36..38

```

        /gene="CD86"
        /region_name="región de cadena beta"
        /experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
Enlace  enlace(40,110)
        /gene="CD86"
        /bond_type="disulfuro"
        /inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"
        /note="Potencial. "
```

Sitio 47

```

        /gene="CD86"
        /site_type="glicosilación"
        /inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"
        /note="ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."
```

Región 54..58

```

        /gene="CD86"
        /region_name="región de cadena beta"
        /experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
```

Región 64..69

```

        /gene="CD86"
        /region_name="región de cadena beta"
        /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
```

Región 80..84

```

        /gene="CD86"
        /region_name="giro con enlace de hidrógeno"
        /experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
```

Región 85..88

```

        /gene="CD86"
        /region_name="región de cadena beta"
        /experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
```

Región 90..92

```

        /gene="CD86"
        /region_name="giro con enlace de hidrógeno"
        /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
```

Región 95..97

```

        /gene="CD86"
        /region_name="región de cadena beta"
        /experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
```

## Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

Región 106..113  
/gene="CD86"  
/region\_name="región de cadena beta"  
/experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"

Región 122..133  
/gene="CD86"  
/region\_name="región de cadena beta"  
/experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"

Sitio 135  
/gene="CD86"  
/site\_type="glicosilación"  
/experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
/note="ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."

Sitio 146  
/gene="CD86"  
/site\_type="glicosilación"  
/inference=" pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
/note="ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."

Región 150..225 /gene="CD86"  
/region\_name="Dominio"  
/experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
/note = "tipo C2 similar a Ig."

Sitio 154  
/gene="CD86"  
/site\_type="glicosilación"  
/inference=" pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales "  
/note="ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."

Enlace enlace(157,218)  
/gene="CD86"  
/bond\_type="disulfuro"  
/inference=" pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
/note="Potencial."

Región 170  
/gene="CD86"  
/region\_name="Variante"  
/experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
/note = S -> N (in dbSNP:rs9282642). /FTId=VAR\_021916. "

Sitio 177  
/gene="CD86"  
/site\_type="glicosilación"  
/inference=" pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
/note="ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."

Sitio 192  
/gene="CD86"  
/site\_type="glicosilación"  
/experiment= "pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"  
/note="ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."

Visualizador de secuencias v2.0 del NCBI

```

Sitio          213
                 /gene="CD86"
                 /site_type="glicosilación"
                 /inference=" pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales "
                 /note="ligado a N (GlcNAC...) (Potencial)."
```

Región

```

                248..268 /gene="CD86"
                 /region_name="Región transmembrana"
                 /inference=" pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales "
                 /note="Potencial."
```

Región

```

                269..329 /gene="CD86 "
                 /region_name="Dominio topológico"
                 /inference=" pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales "
                 /note="Citoplasmática (Potencial)."
```

Región

```

                310
                 /gene="CD86"
                 /region_name="Variante"
                 /experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
                 /note="A -> T (en dbSNP:rs1129055). /FTId=VAR_014650."
```

Región

```

                323
                 /gene="CD86"
                 /region_name="Variante"
                 /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
```

ORIGEN

```

                 /note="D -> N (en dbSNP:rs9282648). /FTId=VAR_021917."
```

```

· 1 mdpqctmgls nilfvmafll sgaaplkiqa yfnetadlpc qfansqngsl selvfwqdq
  61 enlvlnevyl gkekfdsvhs kymgrtsfds dswtlrlhnl qikdkglyqc iihhkkptgm
 121 irihqmsel svlanfsqpe ivpisniten vyinltcssi hgypepkms vllrtnsti
 181 eydgimqksq dnvteydvvs islsvsfpdv tsnmtifcil etdktrllss pfsieledpq
 241 pppdhipwit avlptviicv mvfclilkw kkkkrprnsy kcgtnmere eseqtkkrek
 301 ihipersdea qrvfksskts scdksdtcf
```

//

Descargo de responsabilidad | Escribir a la oficina de asistencia  
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

28 de agosto de 2007 16:53:42

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=1168851>

31/3/2008