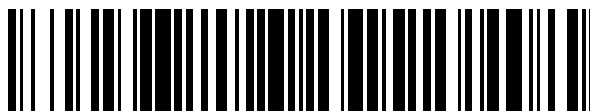


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 420**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2015** **E 15189775 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 3098237**

54 Título: **Receptor de antígeno quimérico anti-toso y su uso**

30 Prioridad:

28.05.2015 US 201562167419 P

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

20.11.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZU KÖLN (100.0%)
Albertus-Magnus-Platz
50923 Köln, DE**

72 Inventor/es:

**HOMBACH, ANDREAS;
FAITSCHUK, ELENA y
ABKEN, HINRICH**

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 690 420 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).

RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO ANTI-TOSO Y SU USO**DESCRIPCIÓN**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a células T modificadas genéticamente que tienen un receptor de antígeno quimérico (CAR) para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺, como leucemia/linfoma de células β , en un sujeto que lo necesita. En particular, la presente invención se refiere a una célula T modificada por ingeniería genética que contiene y que expresa un receptor de antígeno quimérico específico que es tóxico para células cancerosas TOSO⁺. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un receptor de antígeno quimérico específico y la molécula de ácido nucleico que codifica para el mismo, así como a vectores y células que contienen el mismo.

Técnica anterior

La terapia celular adoptiva para enfermedades cancerosas está resultando prometedora en recientes ensayos de fase temprana en el tratamiento de la leucemia/linfoma de células B. Las células T de pacientes modificadas por ingeniería genética con un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de tumor, producen regresión de leucemia completa y duradera. Sin embargo, el tratamiento se asocia con cierta toxicidad que requiere atención y el sector todavía se enfrenta a algunos obstáculos a nivel científico, tecnológico y clínico. Habitualmente, las células T derivadas de pacientes se modifican por ingeniería genética *ex vivo* para expresar una célula T recombinante (TCR), alternativamente, un receptor de antígeno quimérico (CAR). Dicho CAR normalmente está compuesto por un dominio de unión a antígeno extracelular derivado de un anticuerpo y un dominio de activación de células T intracelular derivado de un endodominio de receptor de células T de señalización. A diferencia de la TCR fisiológica, el CAR está compuesto por una sola cadena polipeptídica que combina la unión a antígenos por medio del resto extracelular con una maquinaria de activación de células T proporcionada por el resto de señalización intracelular. Por tanto, debido al dominio de unión derivado de anticuerpo, las células T modificadas con CAR reconocen a su diana, habitualmente, una antígeno de superficie celular, independientemente de la presentación por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Además, las células T modificadas por el receptor de antígeno quimérico no se ven comprometidas por variantes celulares tumorales con procesamiento de antígenos disminuido o deficiente que presenta un mecanismo observado frecuentemente de escape inmunitario de tumores.

Los CAR constituyen el centro de atención de amplias actividades de investigación durante los últimos años, en particular, desde que la leucemia linfática crónica (CLL) avanzada que no responde al tratamiento se convirtió en remisión completa y duradera mediante el tratamiento con células T modificadas por ingeniería genética (J. N. Kochenderfer, *et al.*, Blood, Bd. 122, n.º 25, S. 4129-4139, diciembre de 2013.). Células T de pacientes se redirigieron a células leucémicas mediante un receptor de antígeno quimérico (CAR) injertado con especificidad por CD19 ("CTL019"). Con pocas alternativas restantes pero todavía sensibles a algunos agentes quimioterápicos, los pacientes recibieron células T modificadas por CAR específicas de CD19 en dosis divididas en el plazo de 3 días hasta una dosis total de $1,1 \times 10^9$ células T modificadas con CAR, siendo la dosis menor $1,4 \times 10^7$ células T modificadas con CAR (M. Kalos, *et al.*, Sci Transl Med, Bd. 3, n.º 95, S. 95ra73, agosto de 2011.). La terapia con células T produjo remisión en 12 de 23 pacientes con CLL, con 6 respuestas completas que continúan libres de enfermedad hasta la fecha. La inducción de remisiones duraderas convierte al ensayo con células T modificadas con CAR que se dirigen a CD19 (NCT01029366) en un hito en el campo de CAR, aunque el ensayo en la Universidad de Pensilvania no es el primero ni el único estudio con células T modificadas con CAR en realizarse en seres humanos. Otros centros, incluyendo el Sloan Kettering Memorial Institute (Brentjens *et al.*, Blood. 3 de noviembre de 2011;118(18):4817-28. doi: 10.1182/blood-2011-04-348540) y el Baylor College of Medicine (Cruz *et al.*, Blood, Bd. 122, n.º 17, S. 2965-2973, Oct. 2013) también trataron satisfactoriamente pacientes con CLL con células T modificadas con CAR anti-CD19. En uno de los ensayos de seguimiento dirigidos a la leucemia linfoblástica aguda (ALL) pediátrica con células CTL019, el primer paciente tratado alcanzó remisión completa y duradera. Considerados juntas, la ALL pediátrica y de adulto, se lograron 27/30 remisiones completas, 19 pacientes permanecen en remisión hasta la fecha y 6 pacientes experimentados recidivas (NCT01626495, NCT01029366) (por ejemplo S. L. Maude, *et al.*, N. Engl. J. Med., Bd. 371, n.º 16, S. 1507-1517, Okt. 2014). Estos y otros ensayos con leucemia/linfoma demuestran el destacado potencial de las células T modificadas con CAR. Desde el primer ensayo clínico con células T modificadas con CAR anti-CD19 en tumores malignos de células B, se han tratado más de 70 pacientes en diferentes ensayos en los EE.UU.

Aunque el diseño de ensayo apenas puede compararse, se han hecho visibles algunas líneas básicas para la eficacia terapéutica. En primer lugar, no hay correlación entre el número de células T modificadas con CAR infundidas o la carga tumoral de los pacientes y el desenlace clínico, lo que señala al alto potencial proliferativo y las capacidades de eliminación en serie de las células T modificadas con CAR tras la administración (R. J. Brentjens, *et al.*, Sci Transl Med, Bd. 5, n.º 177, S. 177ra38, marzo de 2013). En segundo lugar, la destrucción de linfocitos antes de la terapia de células T modificadas con CAR parece ser obligatoria para conformar un entorno preferido para las células T transferidas de manera adoptiva, para erradicar células supresoras y para hacer que la médula ósea afectada gravemente sea más sensible a la penetración por células T (L. Gattinoni, *et al.*, Nat. Rev. Immunol., Bd. 6, n.º 5, S. 383-393, 2006). En tercer lugar, la coestimulación para empujar a las células T transferidas a la activación completa es un requisito previo para su persistencia y para el establecimiento de una memoria específica,

requeridos ambos para obtener una respuesta antitumoral duradera. En este contexto, los denominados CAR de segunda generación con señalización de CD3 ζ coestimuladora y primaria cointegrada en la propia molécula de CAR son una ventaja innegable con respecto a los CAR de primera generación con la señal de CD3 ζ solo (B. Savoldo, *et al.*, J. Clin. Invest., Bd. 121, n.º 5, S. 1822-1826, mayo de 2011).

Sin embargo, es obvio que las toxicidades y los riesgos sustanciales constituyen una parte inminente de la terapia de células T modificadas con CAR anti-CD 19. Entre ellos, se observó aplasia de células B como consecuencia principal de la toxicidad de "efecto específico, colateral al tumor" en todos los pacientes tratados hasta ahora. La destrucción de células B requiere atención clínica de por vida y actualmente se trata mediante terapia de sustitución con inmunoglobulinas. La elección de una diana adecuada sigue siendo el principal desafío con respecto a la toxicidad y la selectividad asociadas con células T modificadas con CAR en la selección como diana de células cancerosas. La amplia aplicación clínica de la terapia celular adoptiva en cáncer requiere CAR con más selectividad por células cancerosas y menos selección como diana de células sanas.

Se han realizado numerosos esfuerzos para identificar tales dianas adecuadas para la terapia con CAR y para diseñar CAR adecuados para la selección como diana selectiva. Los esfuerzos actuales incluyen unión de baja afinidad y reconocimiento combinatorio de dos antígenos en la misma célula diana. En el contexto de la selección como diana de células leucémicas, el reconocimiento combinatorio de CD5 y CD19 por dos CAR puede prevenir la aplasia de células B a la vez que se seleccionan como diana células leucémicas.

Aunque el direccionamiento de CAR es específico para el antígeno relacionado, las células cancerosas mutantes con antígenos mutados o regulados por disminución son invisibles para las células T modificadas con CAR. La pérdida de diana se produce bajo presión selectiva y se observó en un reciente ensayo para el tratamiento de B-ALL con células T modificadas por CAR (S. A. Grupp, *et al.*, New England Journal of Medicine, Bd. 368, n.º 16, S. 1509-1518, 20132013). Para impedir la recidiva de células cancerosas con pérdida de antígenos, el uso de células T modificadas con CAR bispecíficas podría ser una opción, o bien modificando por ingeniería genética con dos CAR, cada uno de especificidad diferente, o bien con un CAR con dos especificidades. Alternativamente, puede usarse una mezcla de dos poblaciones de células T, que expresan cada una un CAR con una especificidad definida.

En conjunto, un inconveniente significativo de la terapia de células T modificadas con CAR frente a CD19 de células B derivadas de leucemia y linfoma es la eliminación de las células B CD19⁺ sanas que requiere atención clínica de por vida y sustitución con inmunoglobulinas. Aunque actualmente está realizándose un tremendo esfuerzo, hasta ahora no se ha logrado una selección como diana preferente en la leucemia/linfoma.

En los últimos años, se han realizado esfuerzos en la optimización del diseño de CAR, (para una revisión, véase por ejemplo Bridgeman J.S., *et al.*, Curr Gene Ther 2010, 10, 77-90). Sin embargo, sigue habiendo muchos retos, en particular, la necesidad de una respuesta antitumoral más eficaz y la prolongación de la supervivencia de las células T, que permita la persistencia de las células T a largo plazo de dichas células T modificadas por ingeniería genética en el organismo. La selectividad en la selección como diana de células cancerosas frente a las células sanas constituye todavía un problema principal, en particular cuando se selecciona como diana leucemia/linfoma. Además, todavía tienen que identificarse las señales coestimuladoras requeridas para mantener la persistencia de las células T y la activación durante la aplicación clínica. Por tanto, todavía queda trabajo para optimizar CAR para diversos enfoques incluyendo inmunoterapia adaptativa.

Ya en 1999, Hombach A., *et al.*, J. Immunotherapy, 1999, 22(6), 473-480, describen un receptor de células T quimérico con especificidad para el antígeno CD30 asociado con el linfoma de Hodgkin. En ese documento se identifica que la reticulación específica del receptor quimérico mediante la unión a CD30 induce toxicidad celular no restringida por el MHC contra células diana CD30⁺, pro no contra células CD30⁻. Puesto que CD30 se expresa por células tumorales, aunque también por células B activadas normales, se dudó usar CD30 como diana para la eliminación de células de leucemia/linfoma. La hipótesis se mantuvo por el informe de Savoldo *et al.*, Blood, 2007, 110(7), 2620 - 2630, que demuestra que las células T modificadas con CAR presentan citólisis de líneas celulares linfoblastoides del tipo de células B (líneas celulares LCL). El CAR usado en ese documento es un CAR de "primera generación".

Para el tratamiento de la leucemia/linfoma, se notificó que los CAR dirigidos hacia otras dianas incluían CD19 (Cooper LJ, *et al.*, Leukemia. Abril de 2004;18(4):676-84), CD20 (Jensen MC, *et al.*, Mol Ther. Abril de 2004;9(4):577-86), CD22, (James SE, *et al.*, J Immunol. 15 de mayo de 2008 15;180(10):7028-38), CD23 (Giordano Attianese GM, *et al.*, Blood. 5 de mayo de 2011 5;117(18):4736-45. doi: 10.1182/blood-2010-10-311845), la cadena ligera de Ig kappa (Vera J, *et al.*, Blood. 1 de diciembre de 2006; 108(12):3890-7. Epub, 22 de agosto de 2006).

Hombach A. *et al.*, Gene Therapy, 2010, 17, 1206-1213 describen la modificación del dominio espaciador Fc de IgG1 en el resto extracelular de CAR para evitar la activación colateral por células receptoras⁺ de Fc y el inicio no deseado de una respuesta inmunitaria innata.

Hombach *et al.* (J Immunol. 1 de diciembre de 2001;167(11):6123-31.) y Finney *et al.* (J Immunol. 15 de septiembre de 1998 15;161 (6):2791-7.) notifican combinar el dominio intracelular de CD3zeta y CD28 en la misma molécula de

CAR para proporcionar coestimulación tras el acoplamiento a la diana. Como resultado, mejora la respuesta de células T con respecto a la liberación de citocina, la amplificación, la persistencia y la lisis entre otras funciones. Kofler *et al.*, 2011, Mol. Ther. 19, 760-767 describen una molécula de CAR que tiene un endodominio de CD28 modificado combinado con un endodominio de CD3zeta y un ectodominio de scFv derivado de anticuerpo específico para CEA. Se describe en ese documento que una delección del resto de unión Ick en el endodominio de CAR de CD28 mejora la actividad antitumoral redirigida en presencia de células T reguladoras (Treg) sin afectar a la secreción, proliferación y citólisis del interferón gamma (IFN- γ). Se especula que el CAR con el endodominio de CD28 modificado aceleran la implementación de la terapia de células T adoptiva en pacientes con una variedad de tipos de cáncer que están muy infiltrados por células Treg.

Además, en Hombach *et al.*, Current Molecular Medicine, 2013, 13(1), 1-10 se proporciona un resumen de la terapia adoptiva de cáncer con células T redirigidas por CAR. En ese documento, se resumen los efectos de CAR incluyendo la actividad de coestimulación, así como la mejora y la prolongación de la respuesta de células T antitumoral redirigida. Además, se describen los efectos adversos de este tipo de terapia adaptativa incluyendo la "tormenta de citocinas" y la "represión de células T".

Además del efecto beneficioso de las células T que expresan CAR en la terapia adoptiva, se conocen efectos secundarios adversos que actualmente obstaculizan el desarrollo preferido de la terapia respectiva, tal como se mencionó anteriormente. Tal como se describe en los documentos a los que se hace referencia, el desarrollo de CAR da como resultado CAR de segunda y tercera generación, que albergan uno o dos dominios de señalización coestimuladores, intentando superar los mismos. Sin embargo, un problema pendiente de la terapia adoptiva basada en CAR es que las células T modificadas por ingeniería genética que expresan el CAR no diferencian entre células malignas (células cancerosas) y células sanas (células no tumorales), mientras que ambos tipos de células expresan el mismo determinante antigénico del dominio de unión a antígeno presente en la molécula de CAR.

Por tanto, un problema principal de la terapia de células T modificadas con CAR específicas de cáncer es minimizar los efectos secundarios sobre tejidos sanos. Además, es necesaria una selección como diana más selectiva de las células tumorales. En particular, es necesaria la selección como diana selectiva de linfoma/leucemia con el fin de evitar la deficiencia inducida por la terapia inmunitaria que persiste siempre que las células T modificadas con CAR están activas.

TOSO, también conocida como molécula inhibidora de Fas 3 (FAIM3), es una proteína transmembrana y la función todavía no se ha elucidado completamente (Kubagawa H, *et al.*, J Immunol. 1 de mayo de 2015;194(9):4055-7). La inhibición de la apoptosis mediada por Fas está mediada por la unión del dominio C terminal de TOSO con FADD. TOSO también se describe como el receptor de Fc de IgM (Fc μ R) (Vire *et al.*, J Immunol 2011, 187: 4040-4050).

TOSO se sobreexpresa en la leucemia de células β incluyendo B-CLL. Se notificaron pruebas de que TOSO es un factor antiapoptótico en la patogenia de CLL, desencadenado por la señalización de BCR y regulado adicionalmente por la interacción del estroma por medio de la molécula de CD40.

Recientemente, Lang P.A., *et al.*, (Cell Death and Differentiation, 2015, 22, 164-173) describieron que TOSO tiene un papel esencial en la diferenciación y maduración de células dendríticas inflamatorias.

En el documento WO 2013/136193 A2 se han descrito métodos y composiciones para modular la actividad de TOSO, en particular, se describen proteínas TOSO solubles útiles en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos.

Pallasch C. P. y Wendtner C. M., Leukemia and Lymphoma, 2009, 50(3), 498-501 identifican que la sobreexpresión de la molécula inhibidora de Fas, TOSO, representa un factor antiapoptótico novedoso en la leucemia linfocítica crónica.

En Nguyen X.-H. *et al.*, Blood, 2011, 118 (3), 598-608 se describe que TOSO regula el equilibrio entre la señalización del receptor de muerte apoptótica y no apoptótica facilitando la ubiquitinación de RIP1.

Bérengère V. *et al.*, J. Immunol. 2011, 187, 4040-4050 se refiere a TOSO que se expresa mucho en células B de leucemia linfocítica crónica, se internaliza tras la unión a IgM, se traslada al lisosoma y se regula por disminución en respuesta a la activación de TLR.

Tan Y. *et al.*, Chin. Sce. Bull. 2014, 59 (13), 1374-1385 describe un tratamiento con anticuerpos anti-TOSO que promueve la muerte celular inducida por activación (AICD) de células T *in vitro* y *in vivo* que elimina células T.

Breve descripción de la presente invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺, incluyendo leucemia TOSO⁺ o linfoma TOSO⁺, en un sujeto que lo necesita, mediante lo cual el receptor de antígeno quimérico contiene los siguientes dominios del

extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO, en particular, 6B10, o un homólogo del mismo que se une específicamente a TOSO que tiene una identidad de al menos el 70% con SEQ ID No. 2; ii) opcionalmente un dominio espaciador; iii) un dominio transmembrana; y iv) un dominio de señalización citoplásmico; caracterizada porque dicha célula T con el receptor de antígeno quimérico inicia o

5 aumenta una respuesta inmunitaria contra o es tóxica para células cancerosas TOSO⁺, en particular, células de leucemia TOSO⁺ o células de linfoma TOSO⁺. Dichas células no son tóxicas o son menos tóxicas para las células no tumorales TOSO⁺ (sanas) en dicho sujeto. En aspectos alternativos de la divulgación, puede usarse otro anticuerpo o polipéptido que se une a TOSO o un ligando de TOSO como dominio de unión del receptor de antígeno quimérico.

10 En particular, la presente invención se refiere a una célula T que expresa el CAR que es un polipéptido de SEQ. ID No. 4 codificado por un ácido nucleico de Seq. ID. No. 3 o un homólogo del mismo tal como se define en las reivindicaciones. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de dicha célula T con un receptor de antígeno quimérico según la presente invención para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita. En particular, el cáncer TOSO⁺ es uno cualquiera de leucemia/linfoma derivado de células B o T, en particular leucemia

15 linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia linfocítica aguda y crónica, linfoma cutáneo, micosis fungoide, linfoma de Sezary, enfermedades linfoproliferativas, mastocitosis sistémica, tumores malignos derivados de células madre, células madre cancerosas u otros.

Además, la presente invención se refiere a un polipéptido de SEQ ID No. 4 o un homólogo del mismo que tiene una identidad de al menos el 90% con Seq. ID. No. 4, por lo que dicho polipéptido o un homólogo del mismo cuando se expresa en una célula T como receptor de antígeno quimérico presenta un efecto tóxico sobre células cancerosas TOSO⁺, siendo además dicho polipéptido no tóxico o menos tóxico sobre células no cancerosas TOSO⁺.

Además, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido según la presente invención así como a un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico, por ejemplo Seq. ID. No. 3. Además, se proporciona una célula, línea celular o una célula huésped que contiene dicha secuencia de ácido nucleico o dicho vector así como un kit o sistema que contiene el vector o una célula, una línea celular o una célula huésped que contiene dicho vector o dicha molécula de ácido nucleico o que contiene dicha molécula de ácido

25 nucleico.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: las células T con CAR específico de TOSO reconocen y eliminan células TOSO⁺. [A] Diagrama esquemático que representa la composición modular del CAR anti-TOSO usado en este estudio. El casete de expresión contiene el ADN que codifica para el scFv anti-TOSO (derivado de la línea celular de hibridoma 6B10) fusionado al ADN que codifica para la región bisagra-CH2CH3 de la IgG1 humana, el dominio de CD28 transmembrana y el dominio de CD3 ζ intracelular para la señalización. [B] Expresión de CAR sobre la superficie de las células T. Se modificaron por ingeniería genética células T de sangre periférica humana mediante transferencia génica retroviral con el CAR respectivo y se cultivaron en presencia de 500 U/ml de IL-2. Se detectó la expresión de CAR mediante citometría de flujo tras 48 horas usando el anticuerpo anti-IgG1 humana conjugado con PE que se une al dominio de IgG1 de CAR extracelular y con el anticuerpo anti-CD3 conjugado con FITC para identificar células T. Se usaron células T no modificadas (sin CAR) como control. Los números representan el porcentaje de células T que expresan el CAR sobre la superficie, en comparación con el número total de células T. [C] El dominio scFv anti-TOSO se une específicamente a células tumorales positivas para TOSO. Se incubaron células tumorales positivas para TOSO y negativas para TOSO (2x10⁵ células) con la proteína de fusión scFv anti-TOSO-Fc (en diluciones en serie) y una proteína de fusión scFv-Fc irrelevante (concentración de partida 0,025 mg/ml), respectivamente. Se detectó la proteína no unida mediante citometría de flujo tras 30 minutos usando anticuerpo anti-IgG1 humana conjugado con PE que se une al dominio Fc de IgG1. Los datos representan la intensidad de fluorescencia media (MFI). Cada barra representa la media de tres muestras $\pm$ desviación estándar. [D] La citólisis y la activación de las células T redirigidas por CAR son específicas de antígeno. Se modificaron por ingeniería genética células T de sangre periférica con el CAR anti-TOSO y se cocultivaron con células HEK293 modificadas por ingeniería genética con TOSO y negativas para TOSO (1,5x10⁴ células/pocillo) en el número de células T indicado (células efectoras). Células T no modificadas (sin CAR) sirvieron como control. Se determinó la citotoxicidad de las células tumorales mediante el ensayo de viabilidad basado en XTT. Se determinaron IFN- γ e IL-2 en el sobrenadante de cultivo mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los datos representan la media de tres muestras $\pm$ desviación estándar.

Figura 2: TOSO se expresa mucho en células de CLL en comparación con las células B sanas

60 [A] Se tiñeron células de CLL primarias (n=14) y células B de donante sano (n=8) mediante el AcM anti-TOSO 6B10 conjugado con FITC (línea negra continua) o un anticuerpo de control de isotipo correspondiente (línea discontinua) y se registraron mediante citometría de flujo. Se realizó análisis estadístico usando la prueba de la t de Student (*p=0,03). Los histogramas muestran los análisis de células de un donante sano representativo y un paciente con CLL.

65 [B] Detección de TOSO sobre la superficie celular de células mononucleares sanguíneas obtenidas de pacientes con

B-CLL en comparación con células sanguíneas de donante sano. Se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD5-APC humanas, anticuerpo anti-CD19-FITC para identificar células B y células B-CLL, seguido por tinción con el anticuerpo anti-TOSO conjugado con FITC (línea continua). Un anticuerpo conjugado con FITC de isotipo correspondiente sirvió como control (línea discontinua). El gráfico de puntos y los histogramas muestran los análisis de células de un donante sano representativo.

Figura 3: citólisis específica de células B-CLL mediante células T modificadas por ingeniería genética con CAR. Se marcaron células B-CLL con CFSE (0,83 μ M). Se modificaron células T sin modificar y células T alogénicas [A] o autólogas derivadas de paciente [B] con CAR anti-TOSO y CAR anti-CD19, respectivamente, y se co-incubaron con células B-CLL (1×10^5) durante 24 horas. Se registró la viabilidad de las células B-CLL mediante citometría de flujo. Cada punto representa un B-paciente con CLL individual. Se tiñeron las células apoptóticas y muertas con anexina V-APC. Se calculó la citólisis redirigida por CAR en comparación con la citólisis por células T sin CAR (sin). Los cálculos estadísticos se basaron en la prueba de la t de Student, * representa $p < 0,05$, ** representa $p < 0,01$, *** representa $p < 0,001$. n.s. representa no significativo. [C, D] Se cocultivaron células B-CLL con células T autólogas o alogénicas modificadas por ingeniería genética con CAR y se analizaron los sobrenadantes para determinar IFN- γ mediante ELISA. Cada punto representa un paciente con B-CLL individual. La prueba se realizó por triplicado. Los cálculos estadísticos se basaron en la prueba de la t de Student, * representa $p < 0,05$.

Descripción detallada de la presente invención

Los inventores pretenden proporcionar células T modificadas por ingeniería genética que contienen un receptor de antígeno quimérico, mediante lo cual dichas células T presentan una actividad tóxica sobre células cancerosas TOSO⁺, tal como se define en la reivindicación 1. Es decir, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a células T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en particular, linfoma TOSO⁺ o leucemia TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita, mediante lo cual el receptor de antígeno quimérico contiene al menos los siguientes dominios del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO, en particular derivado del anticuerpo anti-TOSO 6B10 y representado por Seq. ID. No. 2, o un homólogo que tiene especificidad de unión a TOSO que tiene una identidad de al menos el 70% con SEQ ID No. 2; ii) opcionalmente un dominio espaciador; iii) un dominio transmembrana; y iv) un dominio de señalización citoplásmico; caracterizadas por que dicha célula T con el receptor de antígeno quimérico inicia o aumenta una respuesta inmunitaria en o es tóxica para células cancerosas TOSO⁺, en particular, células de leucemia TOSO⁺ o células de linfoma TOSO⁺. Dichas células T no son tóxicas o son menos tóxicas para las células no cancerosas TOSO⁺ en dicho sujeto.

El anticuerpo anti-TOSO 6B10 se describe en Pallasch CP, *et al.*, Blood, 15 de noviembre de 2008;112(10):4213-9. doi: 10.182/blood-2008-05-157255.

En relación con esto, el término “células cancerosas TOSO⁺” se refiere a células malignas o células neoplásicas que expresan la molécula de TOSO.

Además, el término “células no cancerosas TOSO⁺” se refiere a células benignas (sanas) que expresan la molécula de TOSO, como las células B.

Los términos “células no tumorales” y “células tumorales” así como “células no cancerosas” y “células cancerosas” se usan en el presente documento de manera intercambiable a menos que se defina de otro modo.

Los términos “no tóxico” y “menos tóxico” se usan en el presente documento de manera intercambiable a menos que se indique de otro modo e identifican que el nivel o la cantidad de células no cancerosas eliminadas por CAR es menos significativo en comparación con el nivel o la cantidad de células cancerosas eliminadas por el mismo CAR.

Tal como se usa en el presente documento, el término “comprender” o “que comprende” así como los términos “contener” o “que contiene” se refiere a la realización de “consistir” o “que consiste en”.

El término “homólogo”, tal como se usa en el presente documento se refiere a moléculas, o bien ADN o bien polipéptidos, que tienen una homología de secuencia de una determinada cantidad, concretamente de al menos el 70%, como al menos el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% de la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia. Homología se refiere a la magnitud de identidad entre dos secuencias. Las secuencias homólogas tienen características iguales o similares, en particular, tienen propiedades iguales o similares a las de la secuencia identificada. Por ejemplo, el homólogo de la secuencia de 6B10 de Seq. ID. No. 2 tiene especificidad de unión igual o similar a la molécula de TOSO, como en el caso para la molécula de 6B10. Además, los homólogos incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican para el mismo péptido, pero pueden variar en su secuencia debido a la degeneración del código genético. Además, identidad se refiere a la presencia de moléculas de aminoácido o ácido nucleico idénticas en el orden descrito para la secuencia a la que se hace referencia. Es decir, en el caso de una identidad de al menos el 90%, el 90% o más de las moléculas de ácido nucleico y aminoácido, respectivamente, son idénticas en las posiciones respectivas. A menos que se identifique de otro modo, los términos “homología” e “identidad” se usan en el presente documento de manera intercambiable. En

una realización, el homólogo es un homólogo del péptido scFv de 6B10 de SEQ ID No. 2 que se une específicamente al mismo epítipo reconocido por el péptido scFv de 6B10 de SEQ ID No. 2.

Además, el término “modificado por ingeniería genética” se refiere a células que se han manipulado mediante ingeniería genética. Es decir, las células contienen una secuencia heteróloga que no se produce de manera natural en dichas células. Normalmente, la secuencia heteróloga se introduce por medio de un sistema de vector u otros medios para introducir moléculas de ácido nucleico en células incluyendo liposomas. La molécula de ácido nucleico heteróloga puede integrarse en el genoma de dichas células o puede estar presente de manera extracromosómica, por ejemplo en forma de plásmidos. El término también incluye realizaciones de introducir polipéptidos de CAR aislados, modificados por ingeniería genética, en la célula.

El término “inicia o aumenta una respuesta inmunitaria a células TOSO⁺” se refiere a realizaciones donde la respuesta inmunitaria del sujeto que recibe la terapia celular adoptiva contra esas células se inicia o aumenta, lo que puede determinarse basándose en la liberación de citocina o la citotoxicidad contra las células TOSO⁺.

Generalmente, los CAR son proteínas de fusión, que consisten en un dominio de reconocimiento extracelular de tipo anticuerpo fusionado a proteínas de señalización intracelulares de células T. Normalmente, el ectodominio que contiene la región de reconocimiento de antígeno comprende un péptido señal y una unidad de reconocimiento de antígeno. Según la presente invención, el ectodominio comprende un dominio de cadena sencilla anti-TOSO. Se prefiere que dicho dominio de cadena sencilla sea un dominio de cadena sencilla seleccionado de scFv de 6B10 de SEQ. ID. No. 2 o un homólogo del mismo que se une específicamente a TOSO que tiene una identidad de al menos el 70% con SEQ ID No. 2. Además, el dominio de cadena sencilla puede derivarse de otros anticuerpos anti-TOSO como los anticuerpos monoclonales anti-FAIM3, clon 1E4 de Abnova Corp., o clon OT1E6 (inicialmente 1E6) (TA507395) de Origene Technologies, clon EPR3811 (TA307218) de OriGene Technologies, MAAG745 de Creative BioMart, clon 2F5 de Creative BioMart, AcM A36 y A38 tal como se describe en Nguyen XH, *et al.*, Blood. 21 de julio de 2011;118(3):598-608. doi: 10.1182/blood-2010-10-313643. Dichos anticuerpos tienen especificidad de unión similar a TOSO como en el caso para el anticuerpo 6B10, concretamente unión a TOSO.

El ectodominio puede estar separado del dominio transmembrana por la presencia de un dominio espaciador. Dicho dominio espaciador opcional une el dominio de unión a antígeno al dominio transmembrana y se prefiere que dicho dominio transmembrana sea lo suficientemente flexible como permitir que el dominio de unión a antígeno se oriente en diferentes direcciones para facilitar el reconocimiento de antígenos.

El dominio transmembrana es normalmente una hélice alfa hidrófoba que abarca la membrana. También pueden usarse otros dominios transmembrana. Finalmente, en endodominio representa el dominio de señalización en la parte citoplásmica del CAR.

Se ha reconocido que una célula T que contiene el CAR tal como se ha descrito, concretamente, contiene un CAR que del extremo N-terminal al extremo C-terminal tiene la siguiente composición: un dominio de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO, opcionalmente, un dominio espaciador, un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático que puede presentar actividad de respuesta inmunitaria de manera distintiva entre células cancerosas TOSO⁺ y células no cancerosas TOSO⁺. Por tanto, las células T de la presente invención superan los problemas conocidos en la técnica de efectos citotóxicos en ambos tipos de células, por ejemplo células B malignas de leucemia/linfoma y células B sanas, tal como se describe en la técnica.

En una realización de la presente invención, el CAR comprende una secuencia líder que está ubicada en posición N-terminal con respecto al dominio de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO.

Además, en otra realización, el dominio de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO es un péptido scFv de 6B10, en particular, de SEQ. ID. No. 2. Se ha reconocido en el presente documento que un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO de la región variable (scFv), en particular, del anticuerpo 6B10, permite presentar la actividad deseada, concretamente, que sea tóxico para células cancerosas TOSO⁺.

En otra realización, el dominio espaciador de la molécula de CAR es un dominio bisagra-CH2CH3 de IgG₁ o un homólogo del mismo que tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de SEQ. ID. No. 5, con ello, preferiblemente, el dominio espaciador es un dominio bisagra-CH2CH3 mutado de IgG1 según SEQ. ID. No. 5.

En algunas realizaciones, entre el dominio espaciador y el dominio transmembrana puede estar ubicado un ligador. Por ejemplo, en el CAR de Seq. ID. No. 4 está ubicado un ligador de 4 aminoácidos entre el dominio espaciador y el dominio transmembrana.

Además, otra realización se refiere a una célula T con un receptor de antígeno quimérico en la que el dominio transmembrana se deriva de la molécula de CD28, por ejemplo el dominio transmembrana de la molécula de CD28 que incluye un dominio intracelular corto que carece del dominio Ick, por ejemplo de SEQ. ID. No. 6

El dominio de señalización o endodominio o dominio intracelular que se usan en el presente documento de manera

intercambiable, contiene una cadena de señalización de cadena gamma de receptor CD3 zeta o FcÉpsilon (receptor de IgE) y/o un dominio coestimulador. Por ejemplo, el dominio intracelular es un dominio de señalización de CD3 zeta de SEQ. ID. No. 7 o un homólogo del mismo que tiene una homología de al menos el 70%. En otra realización, el dominio intracelular es el dominio de señalización del receptor gamma Fc épsilon de SEQ. ID. No. 8 o un homólogo del mismo que tiene una identidad de al menos el 70%. El dominio de señalización es responsable de la activación de la actividad de respuesta inmunitaria en células T incluyendo la actividad citotóxica o secreción de interferón-gamma.

La molécula de CAR puede ser una denominada molécula de CAR de "segunda generación". Las moléculas de CAR de segunda generación tienen dominios de señalización mejorados que contienen adicionalmente un segundo dominio de señalización coestimulador, por ejemplo derivado de CD28, CD134 (OX40) o CD137 (4-1BB). Las moléculas de CAR de "tercera generación" contienen un dominio de señalización coestimulador combinado, por ejemplo, CD28 combinado con CD137 o CD134.

Una visión general sobre las moléculas de CAR se proporciona, por ejemplo, en Gilham D.E. *et al.*, Trends in Molecular Medicine, 2012, 18(7), 377-384.

En una realización preferida de la presente invención, la célula T es una célula T con un receptor de antígeno quimérico en la que el receptor de antígeno quimérico es un polipéptido de SEQ. ID. No. 3. Dicho CAR también se denomina en el presente documento como n.º 1389.

El CAR n.º 1389 anti-TOSO se expresa sobre la superficie de células T y está compuesto por partes extracelulares del fragmento de cadena sencilla de la región variable (scFv) del anticuerpo anti-TOSO 6B10 y el dominio CH2CH3 de IgG1 humana como espaciador entre scFv y el dominio transmembrana. En una realización de la invención, la modificación del dominio de IgG1 consiste en mutaciones puntuales para convertir la secuencia de aminoácidos de tipo natural PELLGGP X₁₃ MISRT (Seq. ID. No. 9) en PPVA-GP X₁₃ MIART (Seq. ID. No. 10) que reduce la unión no deseada del dominio Fc de CAR a receptores de Fc en otras células como células inmunitarias innatas que mediarían la activación no deseada y la activación de las células T modificadas con CAR. La parte proximal de membrana intracelular y transmembrana de CAR n.º 1389 se deriva de CD28 humano y se fusiona a la parte intracelular de CD3zeta humano. En una realización de la invención, la secuencia de CD28 se muta a P560 > A560, P563 > A563, P564 > A564 (Kofler *et al.*, Mol. Ther. 19, 760 - 767 (2011)). De ese modo, se destruye el sitio de unión de CD28 para la cinasa Ick con la consecuencia de que se impide la activación de la ruta de señalización de Ick y la secreción de IL-2 mediada por CAR posterior. Los modelos preclínicos implican que, en estas condiciones, se reduce la represión mediada por células Treg de las funciones efectoras de células T modificadas con CAR.

Tal como se demuestra en los ejemplo, las células T actúan de manera diferente en células TOSO⁺, concretamente, las células cancerosas TOSO⁺ se eliminan, mientras que las células no cancerosas TOSO⁺ permanecen vivas o se elimina un menor número en presencia de células T con CAR n.º 1389.

Como ejemplo, las células T que expresan el n.º 1389 no son tóxicas contra las células B TOSO⁺ humanas sanas, mientras que se eliminan las células de linfoma TOSO⁺.

Además, tal como se demuestra en el ejemplo, las células T que contienen el CAR n.º 1389 según la presente invención muestran menos actividad tóxica o ninguna hacia células B y T humanas sanas. No se produjo actividad autoinmunitaria significativa hacia células sanas autólogas y no se prevén efectos secundarios peores. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de la célula T con un receptor de antígeno quimérico según la presente invención en terapia celular adaptativa para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita. Por ejemplo, el cáncer TOSO⁺ puede ser leucemia/linfoma derivado de células B o T, en particular leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia linfocítica aguda, linfoma cutáneo, micosis fungoide, enfermedades linfoproliferativas, mastocitosis sistémica, tumores malignos derivados de células madre, o células madre cancerosas u otros.

Es decir, sorprendentemente las células T con el receptor de antígeno quimérico según la presente invención permiten tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita sin dañar a las células TOSO⁺ no cancerosas presentes en el sujeto que va a tratarse. A diferencia de las observaciones anteriores con una variedad tremenda de CAR que tienen diferentes dominios de unión a antígeno, el dominio de anticuerpo anti-TOSO permite eliminar células TOSO⁺ malignas mientras que las células TOSO⁺ benignas no resultan afectadas o lo hacen menos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al polipéptido de SEQ. ID. No. 4 que representa el polipéptido CAR indicado como n.º 1389 en el presente documento, o un homólogo del mismo que tiene una identidad de al menos el 90%, mediante lo cual dicho polipéptido o su homólogo, cuando se expresa en una célula T, es un receptor de antígeno quimérico que presenta un efecto tóxico sobre células cancerosas TOSO⁺, mientras que no es tóxico sobre células no cancerosas TOSO⁺. Por ejemplo, el polipéptido de Seq. ID. No. 4 está codificado por la secuencia de ácido nucleico de Seq. ID. No. 3.

El polipéptido está compuesto por el dominio de cadena sencilla scFv de 6B10 del anticuerpo anti-TOSO, un dominio

espaciador que es un dominio bisagra-CH₂CH₃ de IgG1, un dominio transmembrana derivado de CD28, en particular, un dominio transmembrana derivado de CD28 que incluye un dominio intracelular proximal, y el dominio intracelular de CD3 zeta.

Además, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido según la presente invención. Además, se proporcionan vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico según la presente invención que codifican para el polipéptido tal como se describe. El experto conoce vectores y sistemas de vectores adecuados, en particular, vectores que permiten la transfección y transducción de células eucariotas, en particular, células T.

Además, la presente invención proporciona una célula, una línea celular o una célula huésped que contiene el vector según la presente invención o una molécula de ácido nucleico según la presente invención. Preferiblemente, dicha célula, línea celular o célula huésped es una célula T, por ejemplo, una célula T CD4⁺ o una célula T CD8⁺.

Además, la presente invención proporciona un kit o sistema que contiene el vector según la presente invención, la célula, la línea celular o la célula huésped según la presente invención, o el polipéptido según la presente invención o una molécula de ácido nucleico según la presente invención o mezclas de los mismos para su uso en la producción de células T que expresan el receptor de antígeno quimérico. El kit o sistema según la presente invención puede contener componentes adicionales incluyendo medios para introducir el vector o polipéptido en moléculas de ácido nucleico en las células. El experto conocerá medios adecuados para realizar esto.

La presente invención se describe adicionalmente por medio de ejemplos. Dichos ejemplos ilustran la invención adicionalmente sin limitar la misma a ellos.

Ejemplos

Preparación de las células T con CAR n.º 1389

Se produjo el vector retroviral que codifica para el CAR n.º 1389 usando una envoltura pseudotipada de Galv. En resumen, la producción de partículas de vector se realizó de manera transitoria en la línea celular 293T de riñón embrionario humano tras la transfección de ADN mediada por Polifect®. Se pseudotiparon las partículas de vector con Galv. No se determinó el título de vector.

Se realizó la transducción de linfocitos sanguíneos humanos según técnicas convencionales (Cheadle, E.J., *et al.*, Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy. Capítulo 36, en: "Antibody engineering: methods and protocols", 2ª Edición, Ed. P. Chames, Met. Mol. Biol. 907, 645 - 666 (2012), doi: 10.1007/978-1-61779-974-7_36). Se expresó el CAR n.º 1389 en células T humanas, tal como se midió en el día 2 mediante citometría de flujo usando un anticuerpo dirigido al dominio extracelular CH₂ CH₃ de IgG1 del CAR. Por motivos de comparación, se expresó el CAR anti-CD19 tal como se describe en Koehler, P., *et al.*, Adv. Hematol., 2012, artículo ID 595060, doi: 10.1155/2012/595060, (2012) en células T humanas, tal como se mide mediante el mismo procedimiento.

Ejemplo 1: Actividad de células T modificadas con CAR n.º 1389 hacia tumor TOSO⁺ y células sanas

Células T modificadas por ingeniería genética con CAR n.º 1389

Se evaluó el injerto de células T periféricas humanas con el CAR n.º 1389 mediante citometría de flujo de dos colores 12 h tras la transducción. La figura 1B muestra un análisis de transferencia puntual de células T modificadas por ingeniería genética con CAR. El número de células T con expresión de CAR n.º 1389 fue del 37,5% de todas las células T (figura 1B).

Activación de células T mediante el CAR n.º 1389

Las células T modificadas por ingeniería genética con el CAR n.º 1389 se unen específicamente a células 293 que expresan TOSO y se activa, lo que se indica por la secreción aumentada de citocinas incluyendo IFN- γ e IL-2, aumentando la proliferación y la citólisis de células diana TOSO⁺ (figura 1D). La activación de las células T modificadas con n.º 1389 es específica de antígeno tal como se define por la especificidad del CAR, puesto que las células TOSO-293 no desencadenan activación de células T.

Expresión de TOSO en células de leucemia y sanas.

Se registraron células B-CLL procedentes de pacientes con leucemia y células B procedentes de donantes sanos mediante citometría de flujo para TOSO usando el anticuerpo 6B10 (figura 2A, B). La tinción para CD5 y CD19 identificó las células B-CLL. El nivel de TOSO fue como promedio superior en células B-CLL de pacientes con leucemia que en células B de donantes sanos.

Toxicidad redirigida de células T con CAR n.º 1389 hacia células de leucemia B-CLL TOSO⁺ frente a células B

sanas.

Se coincubaron células de leucemia B-CLL TOSO⁺ con células T modificadas por ingeniería genética con CAR n.º 1389 anti-TOSO. Como controles, se coincubaron las mismas células TOSO⁺ con células T sin CAR. Las células CLL y las células T se derivaron del mismo donante (células autólogas) o las células T se derivaron de un donante sano (células alogénicas).

El número total de células diana se determinó mediante FACS y se normalizó usando un patrón de recuento. Las células muertas se identificaron tiñendo con anexina V. Las células B-CLL se tiñeron con CFSE 0,83 µM antes de la coincubación. La prueba se realizó por triplicado y los datos se resumen en la figura 3A, B. Para determinar la toxicidad de las células T CAR n.º 1389 contra células tumorales y sanas TOSO⁺, se determinó el número de células B-CLL teñidas con CFSE muertas por medio de citometría de flujo. Las células T con CAR anti-TOSO aumentaron el número de células B-CLL muertas, lo que se indica por el aumento en células positivas para CFSE, positivas para anexina V. Esto fue el caso con las células CLL alogénicas y autólogas. Se obtuvo el mismo resultado con células T modificadas con CAR anti-CD19. Por consiguiente, se indujo que las células T modificadas con CAR anti-TOSO liberaran IFN-γ tras la coincubación con células de CLL alogénicas y autólogas (figura 3C, D). Las células T modificadas con CAR anti-TOSO no eliminaron a las células B sanas coincubadas (alogénicas o autólogas), mientras que las T modificadas con CAR anti-CD19 sí lo hicieron (figura 3A, B). Las células T modificadas con CAR anti-TOSO liberaron algo de IFN-γ en la coincubación con las células B alogénicas, lo que se debe a una alorrespuesta y no aumentó en la situación autóloga.

Conclusiones

Se sometió a prueba la toxicidad de las células T con el CAR n.º 1389 anti-TOSO contra células de leucemia TOSO⁺ humanas sanas en comparación con direccionamiento a células B sanas TOSO⁺. Se modificaron por ingeniería genética células T procedentes de donantes sanos, así como procedentes de pacientes para que expresaran el CAR n.º 1389 y se usaron células T sin CAR procedentes del mismo lote de transducción. Se registró la toxicidad de las células T n.º 1389 hacia células de CLL TOSO⁺ mientras que no hubo toxicidad sustancial hacia las células B sanas. No se registró toxicidad específica de las células T no modificadas por ingeniería genética hacia células de leucemia TOSO⁺. En cambio, las células T modificadas por ingeniería genética con el CAR anti-CD19 fueron tóxicas hacia las células B-CLL y las células B sanas.

Lista de secuencias

<110> Universidad de Koeln
 <120> Receptor de antígeno quimérico anti-TOSO y su uso
 <130> 4677-007
 <150> Documento US62/167.419
 <151> 28-05-2015
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 738
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> 6B10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(738)
 <400> 1

ES 2 690 420 T3

gag	gtg	cag	ctc	gtg	gaa	aca	ggg	ggg	ggc	ttg	gtg	cag	cct	ggg	aaa	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Lys	
1				5					10					15		
tct	cta	gaa	ctc	acc	tgt	gcc	acc	tca	gga	ttc	act	ttc	aat	acg	gcc	96
Ser	Leu	Glu	Leu	Thr	Cys	Ala	Thr	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Thr	Ala	
			20					25					30			
tgg	atg	cac	tgg	gtt	cgc	cag	tct	cca	gat	aag	cga	cta	gag	tgg	att	144
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
gct	cga	att	aaa	gac	aca	tct	aac	aat	tat	gca	acc	gac	tat	gtg	gag	192
Ala	Arg	Ile	Lys	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Asp	Tyr	Val	Glu	
	50					55				60						
tct	atg	aaa	gga	aga	ttc	acc	atc	tca	aga	gat	gat	tcc	aaa	ggg	agc	240
Ser	Met	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Gly	Ser	
65					70				75					80		
gtt	aac	ttg	cag	atg	aac	agc	cta	aaa	gag	gag	gac	act	gcc	act	tat	288
Val	Asn	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	
			85					90					95			
tac	tgt	act	acg	gat	ttc	tat	gat	ggg	act	tat	tat	tgg	aat	tac	tgg	336
Tyr	Cys	Thr	Thr	Asp	Phe	Tyr	Asp	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Tyr	Trp	
			100					105					110			
ggc	caa	gga	gtc	atg	gtc	aca	gtc	tcc	tca	gga	ggg	ggg	gga	tcg	ggc	384
Gly	Gln	Gly	Val	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
		115					120					125				
ggg	ggc	ggg	tcg	ggg	ggc	ggc	gga	tct	agc	tat	gag	ctg	atc	caa	cca	432
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Leu	Ile	Gln	Pro	

ES 2 690 420 T3

130					135					140										
cct	tca	gct	gca	gtc	act	ctg	gga	aat	act	gtc	tca	ctc	act	tgt	gtt		480			
Pro	Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Gly	Asn	Thr	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Val					
145					150					155					160					
gga	gat	gaa	tta	cca	aaa	aga	tat	gct	tat	tgg	tat	caa	caa	aag	cca		528			
Gly	Asp	Glu	Leu	Pro	Lys	Arg	Tyr	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro					
165					170					175										
gac	cag	tcc	att	gtg	aga	gtg	ata	tat	gaa	gat	agc	gta	cgg	ccc	cca		576			
Asp	Gln	Ser	Ile	Val	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu	Asp	Ser	Val	Arg	Pro	Pro					
180					185					190										
ggc	atc	tct	gac	cga	ttt	tct	ggg	tcc	agc	tct	ggg	aca	aca	gcc	act		624			
Gly	Ile	Ser	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Thr					
195					200					205										
ctg	aca	atc	cgt	gac	gcc	cag	aat	gag	gat	gag	gct	gat	tat	tac	tgt		672			
Leu	Thr	Ile	Arg	Asp	Ala	Gln	Asn	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys					
210					215					220										
cag	tca	aca	tat	ggt	gat	gat	aaa	ctt	tat	att	ttc	ggc	ggt	gga	acc		720			
Gln	Ser	Thr	Tyr	Gly	Asp	Asp	Lys	Leu	Tyr	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr					
225					230					235					240					
aag	ctc	act	gtc	cta	ggg												738			
Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly															
245																				

<210> 2
<211> 246
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 2

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

ES 2 690 420 T3

Tyr Cys Thr Thr Asp Phe Tyr Asp Gly Thr Tyr Tyr Trp Asn Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro
130 135 140

Pro Ser Ala Ala Val Thr Leu Gly Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Val
145 150 155 160

Gly Asp Glu Leu Pro Lys Arg Tyr Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Asp Gln Ser Ile Val Arg Val Ile Tyr Glu Asp Ser Val Arg Pro Pro
180 185 190

Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr
195 200 205

Leu Thr Ile Arg Asp Ala Gln Asn Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Ser Thr Tyr Gly Asp Asp Lys Leu Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr
225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Leu Gly
245

<210> 3

<211> 2079

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> antígeno quimérico n.º 1389

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2079)

15 <400> 3

atc	ctc	tag	act	gcc	atg	gat	ttt	cag	gtg	cag	att	ttc	agc	ttc	ctg	48
Ile	Leu		Thr	Ala	Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	
1					5					10					15	

cta	atc	agt	gcc	tca	gtc	ata	atg	tct	aga	gag	gtg	cag	ctc	gtg	gaa	96
Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	Val	Ile	Met	Ser	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	
				20					25					30		

ES 2 690 420 T3

aca ggg ggg ggc ttg gtg cag cct ggg aaa tct cta gaa ctc acc tgt	144
Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Glu Leu Thr Cys	
35 40 45	
gcc acc tca gga ttc act ttc aat acg gcc tgg atg cac tgg gtt cgc	192
Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Ala Trp Met His Trp Val Arg	
50 55 60	
cag tct cca gat aag cga cta gag tgg att gct cga att aaa gac aca	240
Gln Ser Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Ile Ala Arg Ile Lys Asp Thr	
65 70 75	
tct aac aat tat gca acc gac tat gtg gag tct atg aaa gga aga ttc	288
Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Asp Tyr Val Glu Ser Met Lys Gly Arg Phe	
80 85 90 95	
acc atc tca aga gat gat tcc aaa ggt agc gtt aac ttg cag atg aac	336
Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Gly Ser Val Asn Leu Gln Met Asn	
100 105 110	
agc cta aaa gag gag gac act gcc act tat tac tgt act acg gat ttc	384
Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Thr Asp Phe	
115 120 125	
tat gat ggt act tat tat tgg aat tac tgg ggc caa gga gtc atg gtc	432
Tyr Asp Gly Thr Tyr Tyr Trp Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val	
130 135 140	
aca gtc tcc tca gga ggt ggt gga tcg ggc ggt ggc ggg tcg ggt ggc	480
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
145 150 155	
ggc gga tct agc tat gag ctg atc caa cca cct tca gct gca gtc act	528
Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Ala Ala Val Thr	
160 165 170 175	
ctg gga aat act gtc tca ctc act tgt gtt gga gat gaa tta cca aaa	576
Leu Gly Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Val Gly Asp Glu Leu Pro Lys	
180 185 190	
aga tat gct tat tgg tat caa caa aag cca gac cag tcc att gtg aga	624
Arg Tyr Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Ile Val Arg	
195 200 205	
gtg ata tat gaa gat agc gta cgg ccc cca ggc atc tct gac cga ttt	672
Val Ile Tyr Glu Asp Ser Val Arg Pro Pro Gly Ile Ser Asp Arg Phe	
210 215 220	
tct ggg tcc agc tct ggg aca aca gcc act ctg aca atc cgt gac gcc	720
Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Ala	
225 230 235	
cag aat gag gat gag gct gat tat tac tgt cag tca aca tat ggt gat	768
Gln Asn Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Thr Tyr Gly Asp	
240 245 250 255	
gat aaa ctt tat att ttc ggc ggt gga acc aag ctc act gtc cta ggg	816
Asp Lys Leu Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
260 265 270	
gat ccc gcc gag ccc aaa tct cct gac aaa act cac aca tgc cca ccg	864
Asp Pro Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro	

ES 2 690 420 T3

275	280	285	
tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro 290 295 300			912
cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr 305 310 315			960
tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn 320 325 330 335			1008
tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 340 345 350			1056
gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val 355 360 365			1104
ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser 370 375 380			1152
aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 385 390 395			1200
ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp 400 405 410 415			1248
gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe 420 425 430			1296
tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu 435 440 445			1344
aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe 450 455 460			1392
ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly 465 470 475			1440
aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr 480 485 490 495			1488
acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa aaa gat ccc aaa ttt Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe 500 505 510			1536
tgg gtg ctg gtg gtg gtt ggt gga gtc ctg gct tgc tat agc ttg cta Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu 515 520 525			1584
gta aca gtg gcc ttt att att ttc tgg gtg agg agt aag agg agc agg			1632

Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg		
		530					535					540					
ctc	ctg	cac	agt	gac	tac	atg	aac	atg	act	ccc	cgc	cgc	ccc	ggg	ccc		1680
Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro		
	545					550					555						
acc	cgc	aag	cat	tac	cag	ccc	tat	gcc	ccc	cca	cgc	gac	ttc	gca	gcc		1728
Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala		
560					565					570					575		
tat	cgc	tcc	ctg	aga	gtg	aag	ttc	agc	agg	agc	gca	gac	gcc	ccc	gcg		1776
Tyr	Arg	Ser	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala		
				580					585					590			
tac	cag	cag	ggc	cag	aac	cag	ctc	tat	aac	gag	ctc	aat	cta	gga	cga		1824
Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg		
			595					600					605				
aga	gag	gag	tac	gat	gtt	ttg	gac	aag	aga	cgt	ggc	cgg	gac	cct	gag		1872
Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu		
		610					615					620					
atg	ggg	gga	aag	ccg	aga	agg	aag	aac	cct	cag	gaa	ggc	ctg	tac	aat		1920
Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn		
	625					630					635						
gaa	ctg	cag	aaa	gat	aag	atg	gcg	gag	gcc	tac	agt	gag	att	ggg	atg		1968
Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met		
640					645					650					655		
aaa	ggc	gag	cgc	cgg	agg	ggc	aag	ggg	cac	gat	ggc	ctt	tac	cag	ggt		2016
Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly		
				660					665					670			
ctc	agt	aca	gcc	acc	aag	gac	acc	tac	gac	gcc	ctt	cac	atg	cag	gcc		2064
Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala		
			675					680					685				
ctg	ccc	cct	cgc	taa													2079
Leu	Pro	Pro	Arg														
			690														

<210> 4
 <211> 689
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 4

Thr	Ala	Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser		
1				5					10					15			
Ala	Ser	Val	Ile	Met	Ser	Arg	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Gly	Gly		
			20					25					30				
Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Leu	Thr	Cys	Ala	Thr	Ser		

ES 2 690 420 T3

35	40	45																	
Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Thr	Ala	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro				
50						55					60								
Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Ile	Ala	Arg	Ile	Lys	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn				
65					70					75					80				
Tyr	Ala	Thr	Asp	Tyr	Val	Glu	Ser	Met	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser				
				85					90					95					
Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Gly	Ser	Val	Asn	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys				
			100					105					110						
Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Thr	Asp	Phe	Tyr	Asp	Gly				
		115					120					125							
Thr	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Met	Val	Thr	Val	Ser				
	130					135					140								
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser				
145					150					155					160				
Ser	Tyr	Glu	Leu	Ile	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Gly	Asn				
				165					170					175					
Thr	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Val	Gly	Asp	Glu	Leu	Pro	Lys	Arg	Tyr	Ala				
			180					185					190						
Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Ile	Val	Arg	Val	Ile	Tyr				
		195					200					205							
Glu	Asp	Ser	Val	Arg	Pro	Pro	Gly	Ile	Ser	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser				
	210					215					220								
Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Arg	Asp	Ala	Gln	Asn	Glu				
225					230					235					240				
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Thr	Tyr	Gly	Asp	Asp	Lys	Leu				
				245					250					255					
Tyr	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Asp	Pro	Ala				
			260					265					270						
Glu	Pro	Lys	Ser	Pro	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala				
		275					280					285							

ES 2 690 420 T3

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 290 295 300
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 305 310 315 320
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 325 330 335
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 340 345 350
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 355 360 365
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 370 375 380
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 385 390 395 400
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 405 410 415
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 420 425 430
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 435 440 445
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 450 455 460
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 465 470 475 480
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 485 490 495
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu
 500 505 510
 Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val
 515 520 525
 Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
 530 535 540

ES 2 690 420 T3

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
545 550 555 560

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
565 570 575

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
580 585 590

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
595 600 605

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
610 615 620

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
625 630 635 640

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
645 650 655

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
660 665 670

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
675 680 685

Arg

<210> 5

<211> 702

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 5

gatcccgccg agcccaaadc tcctgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct	60
ccagtcgcgg gaccgtcagt cttcctcttc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgatc	120
tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc	180
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag	240
gagcagtaca acagcacgta ccgggtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg	300
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag	360
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca	420

ES 2 690 420 T3

	tccccgggatg agctgaccaa gaaccagggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat	480
	cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc	540
	acgcctccccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac	600
	aagagcagggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac	660
	aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa	702
5	<210> 6 <211> 213 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> secuencia sintética <400> 6	
	gatcccaaat tttgggtgct ggtgggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta	60
	gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt	120
	gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccaggcctat	180
	gccgccgcac gcgacttcgc agcctatcgc tcc	213
15	<210> 7 <211> 342 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> secuencia sintética <400> 7	
	ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag	60
	ctctataccg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg atgttttgga caagagacgt	120
	ggccggggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggctgtac	180
	aatgacctgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag	240
	cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac	300
25	acctacgacg cccttcacat gcaggccctg cccctcgt aa	342
30	<210> 8 <211> 129 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> secuencia sintética	
35	<400> 8	
	cgactgaaga tccaagtgcg aaaggcagct ataaccagct atgagaaatc agatgggtgtt	60

tacacggggcc tgagcaccag gaaccaggag acttacgaga ctctgaagca tgagaaacca 120

ccacagtag 129

<210> 9
 <211> 25
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>

10 <223> péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(20)
 15 <223> SVFLFPPKPKDTL

<400> 9

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Met Ile Ser Arg Thr
 20 25

20 <210> 10
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> péptido sintético

<220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(19)
 <223> SVFLFPPKPKDTL

<400> 10

35 Pro Pro Val Ala Gly Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Met Ile Ala Arg Thr
 20

REIVINDICACIONES

1. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita, en la que el receptor de antígeno quimérico contiene al menos los siguientes dominios del extremo N-terminal al extremo C-terminal: i) un dominio de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO, en particular, scFv de 6B10 de SEQ. ID. No. 2 o un homólogo del mismo que se une específicamente a TOSO que tiene una identidad de al menos el 70% con SEQ. ID. No. 2; ii) opcionalmente un dominio espaciador; iii) un dominio transmembrana; y iv) un dominio de señalización citoplásmico; caracterizada porque dicha célula T con el receptor de antígeno quimérico inicia o aumenta la respuesta inmunitaria a o es tóxica para células cancerosas TOSO⁺ en dicho sujeto.
2. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita según la reivindicación 1, que comprende además una secuencia líder que está ubicada en posición N-terminal con respecto al dominio de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO.
3. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el dominio de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO es el péptido scFv de 6B10 de SEQ ID No. 2.
4. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio espaciador es un dominio CH2CH3 de IgG1 o un homólogo del mismo que tiene una identidad de al menos el 70% con la secuencia de Seq. ID. No. 5, preferiblemente, el dominio espaciador es un dominio CH2CH3 de IgG1 mutado según SEQ. ID. No. 5.
5. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio transmembrana se deriva de CD28.
6. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio intracelular contiene una cadena de señalización CD3zeta o FcepsilonRlgamma y/o un dominio coestimulador.
7. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio intracelular es el dominio de señalización CD28.
8. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el receptor de antígeno quimérico es un polipéptido de SEQ. ID. No. 4.
9. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el cáncer es leucemia TOSO⁺ o linfoma TOSO⁺.
10. Célula T con un receptor de antígeno quimérico para su uso en terapia celular adoptiva para tratar cáncer TOSO⁺ en un sujeto que lo necesita según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el cáncer TOSO⁺ es una cualquiera de leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia linfocítica aguda, linfoma cutáneo, micosis fungoide, enfermedades linfoproliferativas, mastocitosis sistémica o tumores malignos derivados de células madre o células madre cancerosas.
11. Polipéptido de SEQ. ID. No. 4 o un homólogo del mismo que tiene una identidad de al menos el 90% con SEQ ID. No: 4 que contiene un dominio de anticuerpo de cadena sencilla anti-TOSO en el que dicho polipéptido cuando se expresa en una célula T como receptor de antígeno quimérico presenta un efecto tóxico sobre células cancerosas TOSO⁺.
12. Molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido según la reivindicación 11.
13. Vector que comprende la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 12.
14. Célula aislada, línea celular o una célula huésped que contiene un vector según la reivindicación 13 o una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12.

15. Kit o sistema que contiene un vector según la reivindicación 13, una célula, una línea celular o una célula huésped según la reivindicación 14, la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 12 y/o el polipéptido según la reivindicación 11 para su uso en la producción de células T que expresan el receptor de antígeno quimérico.
- 5

Figura 1

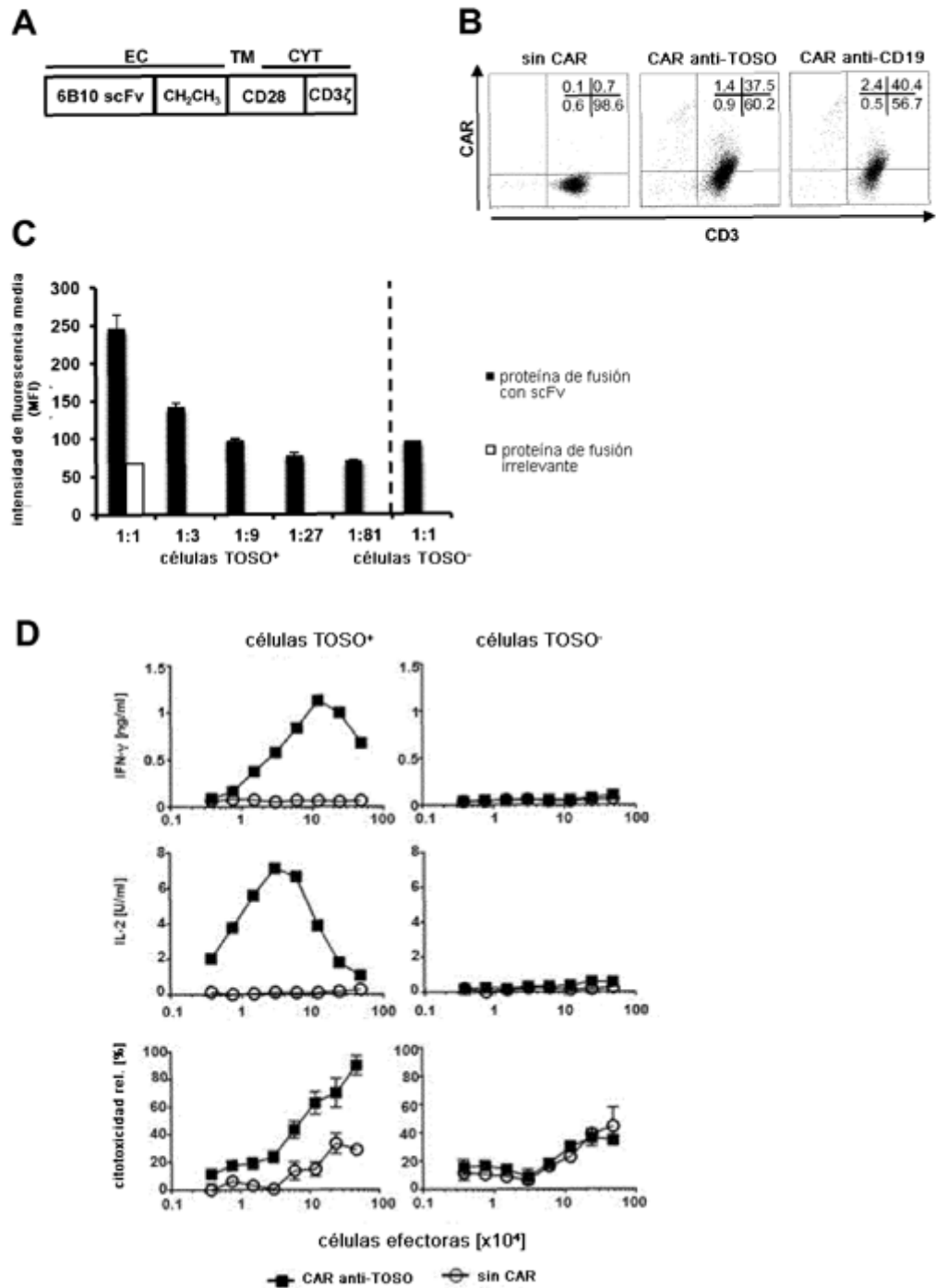


Figura 2

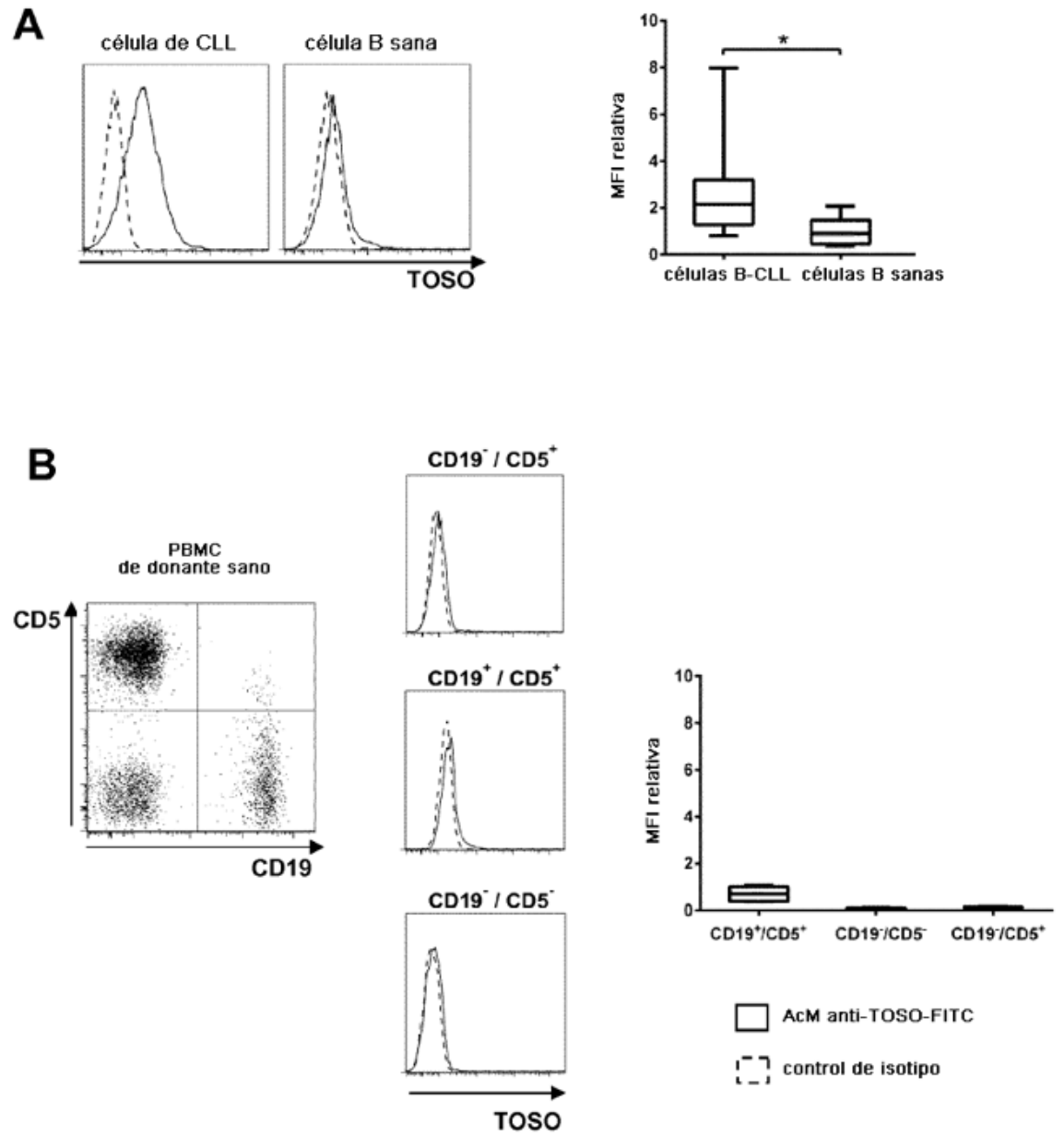


Figura 3

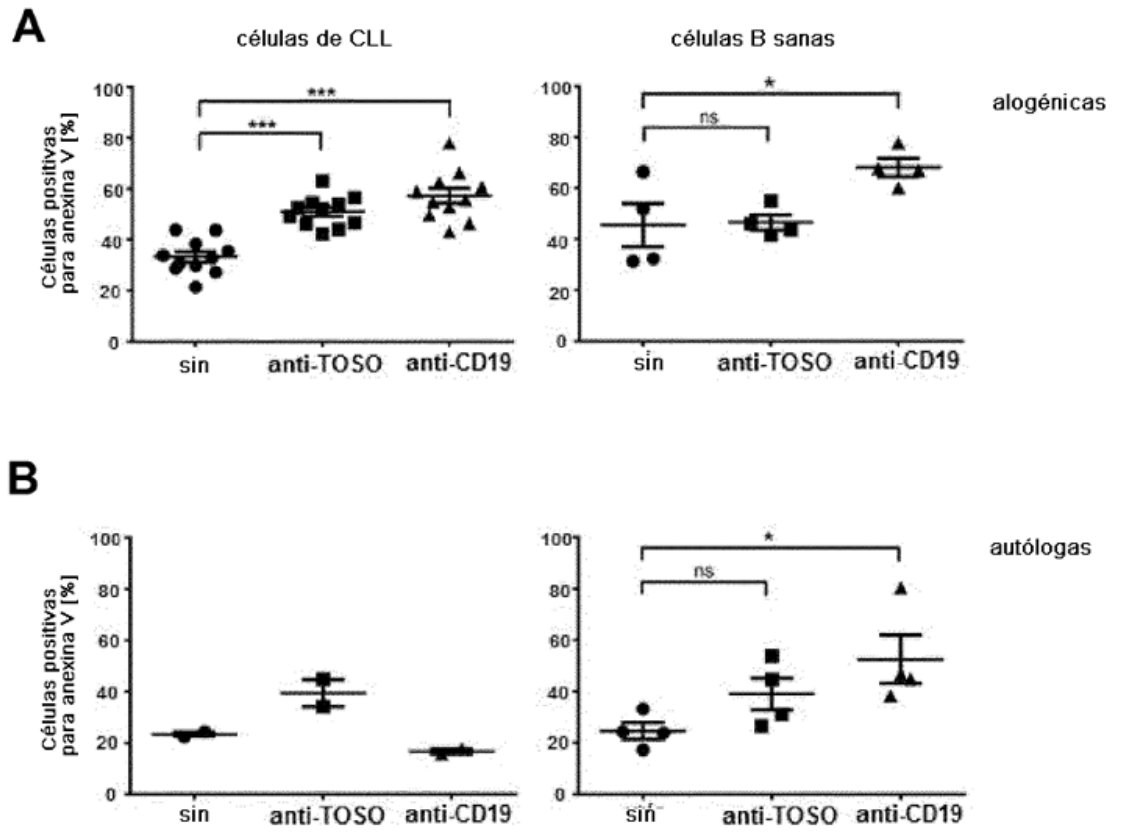


Figura 3

