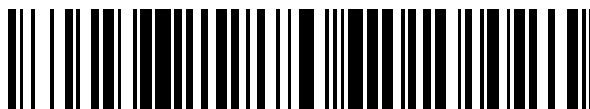


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 629**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2013** **PCT/US2013/038921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013** **WO13166051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2013** **E 13784744 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 2844742**

54 Título: **Composiciones de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T**

30 Prioridad:

30.04.2012 US 201213459664

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2019

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE
(100.0%)**

**11 Rope Ferry Road
Hanover, NH 03755, US**

72 Inventor/es:

SENTMAN, CHARLES, L.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 711 629 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

Composiciones de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T

5 **Antecedentes de la invención*****Campo de la invención***

La invención se refiere a linfocitos T deficientes en TCR, a métodos para fabricar y utilizar linfocitos T deficientes en TCR y a estos linfocitos T deficientes en TCR para su uso para tratar enfermedades y trastornos. La invención se refiere en general a los linfocitos T deficientes en TCR, a las poblaciones aisladas de los mismos, y a las composiciones que comprenden los mismos. En un aspecto, dichos linfocitos T deficientes en TCR se diseñan además para expresar un receptor funcional no TCR. La invención también se refiere a métodos para fabricar dichos linfocitos T deficientes en TCR, y a dichos linfocitos T deficientes en TCR para su uso en métodos para reducir o mejorar, o prevenir o tratar, enfermedades y trastornos que utilizan dichos linfocitos T deficientes en TCR, poblaciones de los mismos, o composiciones que comprenden los mismos.

Descripción de la técnica relacionada

La carga mundial de cáncer se duplicó entre 1975 y 2000, y se espera que el cáncer se convierta en la principal causa de muerte en todo el mundo para el año 2010. Según la American Cancer Society, se proyecta que se duplicará de nuevo para 2020 y se triplicará para 2030. Por lo tanto, existe una necesidad de terapias más eficaces para tratar varias formas de cáncer. Idealmente, cualquier terapia contra el cáncer debe ser eficaz (para matar células cancerosas), dirigida (es decir, selectiva, para evitar la muerte de células sanas, permanente (para evitar recaídas y metástasis) y asequible. Los estándares actuales de atención para la mayoría de los cánceres no cumplen con algunos o todos estos criterios.

Se ha demostrado que la inmunoterapia celular da como resultado la eliminación específica del tumor y tiene el potencial de proporcionar una terapia contra el cáncer específica y eficaz (Ho, W.Y. et al. 2003). Cancer Cell 3:1318-1328; Morris, E.C. et al. 2003. Clin. Exp. Immunol. 131:1-7; Rosenberg, S.A. 2001. Nature 411:380-384; Boon, T. y P. van der Bruggen. 1996. J. Exp. Med. 183:725-729). Los linfocitos T a menudo han sido las células efectoras de elección para la inmunoterapia del cáncer debido a su reconocimiento selectivo y poderosos mecanismos efectores. Los linfocitos T reconocen péptidos específicos procedentes de proteínas celulares internas en el contexto del propio complejo principal de histocompatibilidad (MHC, de sus siglas en inglés) que utiliza sus receptores de linfocitos T (TCR, de sus siglas en inglés).

Se reconoce en la materia que el complejo TCR se asocia de manera precisa mediante la formación de dímeros y la asociación de estos dímeros (el dímero TCR-alfa/beta, CD3-gamma/épsilon, CD3-delta/épsilon y CD3-zeta) en un complejo TCR que se puede exportar a la superficie celular. La incapacidad de cualquiera de estos complejos para formarse correctamente inhibirá el ensamblaje y la expresión del TCR (Call, M.E. et al., (2007) Nature Rev. Immunol., 7:841-850; Call, M.E. et al., (2005) Annu. Rev. Immunol., 23:101-125).

Se han identificado restos de aminoácidos particulares en las respectivas cadenas de TCR como importantes para la formación correcta de dímeros y el ensamblaje de TCR. En particular, para TCR-alfa, estos aminoácidos clave en la porción transmembrana son arginina (para asociación con CD3-zeta) y lisina (para asociación con el dímero CD3-épsilon/delta). Para TCR-beta, el aminoácido clave en la porción transmembrana es una lisina (para asociación con el dímero CD3-épsilon/gamma). Para CD3-gamma, el aminoácido clave en la porción transmembrana es un ácido glutámico. Para CD3-delta, el aminoácido clave en la porción transmembrana es un ácido aspártico. Para CD3-épsilon, el aminoácido clave en la porción transmembrana es un ácido aspártico. Para CD3-zeta, el aminoácido clave en la porción transmembrana es un ácido aspártico (Call, M.E. et al., (2007) Nature Rev. Immunol., 7:841-850; Call, M.E. et al., (2005) Annu. Rev. Immunol., 23:101-125).

Los péptidos procedentes de proteínas alteradas o mutadas en tumores se pueden reconocer mediante TCR específicos. Varios estudios clave han llevado a la identificación de antígenos asociados con tumores específicos que han sido capaces de inducir respuestas efectivas de linfocitos T citotóxicos (CTL, de sus siglas en inglés) en pacientes (Ribas, A. et al. 2003). J. Clin. Oncol. 21:2415-2432). Los mecanismos efectores de los linfocitos T incluyen la capacidad de matar células tumorales directamente y la producción de citocinas que activan otras células inmunitarias del hospedador y cambian el microambiente tumoral local. Teóricamente, los linfocitos T podrían identificar y destruir una célula tumoral que expresa un único péptido mutado. La inmunoterapia adoptiva con clones de CTL específicos para MART1 o gp100 con dosis bajas de IL-2 ha sido eficaz en la reducción o estabilización de la carga tumoral en algunos pacientes (Yee, C. et al. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16168-16173). Otros enfoques utilizan linfocitos T con un receptor antitumoral definido. Estos enfoques incluyen CTL que modifican genéticamente con nuevos receptores de linfocitos T específicos de antígeno que reconocen péptidos tumorales y MHC, receptores de antígeno quimérico (CAR, de sus siglas en inglés) procedentes de fragmentos de anticuerpos de cadena única (scFv) acoplados a un elemento de señalización apropiado, o la utilización de receptores de células NK quiméricos (Ho, W.Y. et al. 2003. Cancer Cell 3:431-437; Eshhar, Z. et al. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA

90:720-724; Maher, J. y E.T. Davies. 2004. Br. J. Cancer 91:817-821; Zhang, T. et al. 2005. Blood 106:1544-1551).

Las terapias basadas en células se utilizan en pacientes que han fallado los tratamientos convencionales de quimioterapia o radiación, o que han recaído, a menudo han intentado más de un tipo de terapia. Las células inmunitarias de pacientes con cáncer avanzado, que pueden haber pasado por rondas de quimioterapia, no responden tan sólidamente como las personas sanas. Además, los pacientes con cáncer a menudo son ancianos y pueden sufrir otras enfermedades que pueden limitar el potencial de sus células inmunitarias para convertirse en células efectoras cebadas, incluso después de la activación y expansión *in vitro*. Además, cada paciente con cáncer debe proporcionar un número suficiente de sus propias células inmunitarias para que puedan ser diseñadas para expresar un nuevo receptor inmunitario. Debido a que cada terapia debe ser personalizada para el paciente, este proceso requiere semanas desde el momento en que se toma la decisión de emprender dicha terapia; mientras tanto, el cáncer sigue creciendo. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2002/0039576 desvela un método para modular la actividad de los linfocitos T, donde los linfocitos T utilizados tienen un fenotipo de CD3+ $\alpha\beta$ -TcR+CD4⁺CD8⁺CD28⁺NK1.1⁻. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º US 2006/0166314 desvela la utilización de linfocitos T mutados para tratar el cáncer donde los linfocitos T son aquellos con un receptor de linfocitos T- $\alpha\beta$ específico de la proteína MDM2 mediadora de la respuesta de los linfocitos T.

El cáncer no es la única enfermedad donde la manipulación de linfocitos T podría ser una terapia eficaz. Se sabe que los receptores de linfocitos T activos en los linfocitos T son críticos para la respuesta del cuerpo para estimular la actividad del sistema inmunitario. Por ejemplo, se ha demostrado que la diversidad de receptores de linfocitos T desempeña un papel en la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD, de sus siglas en inglés), en particular la GVHD crónica (Anderson et al. (2004) Blood 104: 1565-1573). De hecho, se ha demostrado que la administración de anticuerpos del receptor de linfocitos T reduce los síntomas de la GVHD aguda (Maeda et al. (2005) Blood 106: 749-755).

Hwang et al., desvela "Reduced TCR signaling potential impairs negative selection but does not result in autoimmune disease" (Journal of Experimental Medicine, vol. 209, n.º 10, septiembre de 2012, páginas 1781-1795). Chae et al., desvela "Qualitatively differential regulation of T cell activation and apoptosis by T cell receptor zeta chain ITAMs and their tyrosine residues" (International Immunology, vol. 16, n.º 9, septiembre de 2004, páginas 1225-1236). Love et al., desvela "T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex" (Science, vol. 261, n.º 5123, 1993, páginas 918-921). Liu et al., desvela "Abnormal T cell development in CD3-zeta-/- mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine" (EMBO Journal, vol. 12, n.º 12, 1993, páginas 4863-4875). El documento WO 2011/059836 A2 desvela composiciones de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T.

Sigue existiendo una necesidad de terapias más eficaces basadas en linfocitos T para el tratamiento de ciertas enfermedades y trastornos, y métodos de tratamiento basados en el diseño de nuevos tipos de linfocitos T.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para producir uno o más linfocitos T primarios humanos modificados, que comprende expresar en uno o más linfocitos T primarios humanos al menos una molécula inhibidora de TCR (TIM, de sus siglas en inglés) codificada mediante una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 72, 74, 76, y 78. La invención proporciona además un linfocito o linfocitos T primarios humanos modificados producidos de acuerdo con el método, una composición farmacéutica que comprende dicho linfocito o linfocitos T primarios humanos modificados y dicho linfocito o linfocitos T primarios humanos modificados para su uso en terapia, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de cáncer. Aún más, la presente invención proporciona un vector para modificar linfocitos T primarios humanos que contienen un ácido nucleico que codifica el polipéptido CD3-zeta truncado de SEQ ID NO: 77 o 79, y un linfocito T humano que expresa el polipéptido CD3-zeta truncado de SEQ ID NO: 77 o 79.

En un ejemplo, esta descripción se refiere en general a linfocitos T modificados aislados que no expresan un receptor de linfocitos T (TCR) funcional. En este ejemplo, los linfocitos T son deficientes en TCR en la expresión de un TCR funcional. En otro ejemplo de la descripción, los linfocitos T deficientes en TCR están diseñados para expresar un receptor funcional no TCR, tal como, por ejemplo, un receptor quimérico. Estas células también funcionan como una plataforma para permitir la expresión de otros receptores de direccionamiento, por ejemplo, receptores que pueden ser útiles en enfermedades específicas, mientras que conservan las funciones efectoras de los linfocitos T, aunque sin un TCR funcional.

La descripción contempla poblaciones de linfocitos T deficientes en TCR y composiciones que comprenden los mismos. La descripción también contempla métodos para producir dichos linfocitos T deficientes en TCR, y métodos para reducir o mejorar, o prevenir o tratar, enfermedades y trastornos que utilizan dichos linfocitos T deficientes en TCR, poblaciones de los mismos, o composiciones terapéuticas que comprenden los mismos. En un ejemplo, esta composición se puede utilizar para tratar cáncer, infección, uno o más trastornos autoinmunitarios, enfermedad por radiación, o para prevenir o tratar la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) o el rechazo del trasplante en un sujeto que se somete a una cirugía de trasplante.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra los receptores NK quiméricos descritos en el presente documento. Se indican las porciones extracelular (EC), transmembrana (TM) y citoplasmática (Cyp). Se indican formas de tipo silvestre (TS) y quiméricas (QU) de los receptores, donde NH₂ indica el extremo N y COOH indica el extremo C.

La Figura 2 ilustra que las TIM reducen el reconocimiento y la función de TCR en los linfocitos T humanos durante el cultivo con PBMC alogénicas. El panel (A) muestra que los linfocitos T transducidos con TIM cultivados con PMBC alogénicas tienen una reducción en la producción de IFN-γ. Se muestra la producción total de IFN-γ. El panel (B) muestra las cantidades de IFN-γ después de restar la cantidad de IFN-γ autólogo. Este valor representa el IFN-γ específico producido mediante el reconocimiento de las PBMC alogénicas. La Figura 3 ilustra la activación de los linfocitos T que expresan TIM utilizando un receptor de direccionamiento recombinante para el cáncer. Los linfocitos T que expresan TIM y que expresan de forma conjunta un receptor quimérico NKG2D (quNKG2D), que reconoce ligandos específicos en muchos tipos de células tumorales, produjeron una mayor cantidad de IFN-γ tras el cultivo conjunto con células tumorales de mieloma RPMI8226. En algunos pocillos, se incluyó un AcM NKG2D de bloqueo para evitar que quNKG2D reconociera sus ligandos en las células tumorales, y esto demuestra la respuesta específica del receptor quNKG2D en estos linfocitos T.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Definiciones

Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, especies o géneros animales y reactivos descritos, ya que tales pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Como se utiliza en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a "la proteína" incluye una referencia a una o más proteínas y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia a la cual pertenece esta invención, a menos que se indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "linfocito T deficiente en TCR", o una frase similar, se refiere a un linfocito(s) T aislado que carece de expresión de un TCR funcional, siendo internamente capaz de inhibir su propia producción de TCR, y además donde también puede esperarse razonablemente que la progenie de dicho linfocito(s) T sea internamente capaz de inhibir su propia producción de TCR. La capacidad interna es importante en el contexto de la terapia donde las escalas de tiempo de rotación de TCR (~ horas) son mucho más rápidas que las escalas de tiempo de eficacia demostrable (días-meses), es decir, se requiere capacidad interna para mantener el fenotipo deseado durante el período terapéutico. Esto puede, por ejemplo, lograrse por diferentes medios, como se describe *infra*, por ejemplo, mediante el diseño de un linfocito T de modo que no exprese ningún TCR funcional en su superficie celular, o mediante el diseño del linfocito T de modo que no exprese una o más de las subunidades que comprenden un TCR funcional y, por lo tanto, no produce un TCR funcional o mediante el diseño de un linfocito T de modo que produzca muy poco TCR funcional en su superficie, o que exprese un TCR sustancialmente dañado, por ejemplo, mediante el diseño del linfocito T para que exprese formas mutadas o truncadas de una o más de las subunidades que comprenden el TCR, lo que hace que el linfocito T sea incapaz de expresar un TCR funcional o que dé como resultado una célula que exprese un TCR sustancialmente dañado. Las diferentes subunidades que comprenden un TCR funcional se describen *infra*. Se puede determinar si una célula expresa un TCR funcional utilizando métodos de ensayo conocidos, como se conoce en la materia descrita en el presente documento. Por un "TCR sustancialmente dañado", los solicitantes significan que este TCR no provocará sustancialmente una reacción inmunitaria adversa en un hospedador, por ejemplo, una reacción de la GVHD.

Como se describe en detalle *infra*, opcionalmente estas células deficientes en TCR pueden diseñarse para que comprendan otras mutaciones o transgenes, por ejemplo, mutaciones o transgenes que afectan el crecimiento o proliferación de linfocitos T, que den como resultado la expresión o ausencia de expresión de un gen o construcción de genes deseado, por ejemplo, otro receptor o una citocina u otro polipéptido inmunomodulador o terapéutico o un marcador seleccionable tal como un gen marcador seleccionable dominante, por ejemplo, DHFR o neomicina transferasa.

"Linfocitos T alogénicos" se refiere a un linfocito T de un donante que tiene un tipo de HLA tisular que coincide con el receptor. Normalmente, el emparejamiento se realiza sobre la base de la variabilidad en tres o más loci del gen HLA, y se prefiere un emparejamiento perfecto en estos loci. En algunos casos, los donantes de trasplantes alogénicos pueden estar relacionados (por lo general, un hermano muy compatible con HLA), *singénicos* (un gemelo "idéntico" monocigótico del paciente) o no relacionados (donante que no está relacionado y se ha encontrado que tiene un

grado muy alto de compatibilidad HLA). Los genes HLA se dividen en dos categorías (Tipo I y Tipo II). En general, los desapareamientos de los genes de Tipo I (es decir, HLA-A, HLA-B o HLA-C) aumentan el riesgo de rechazo del injerto. Un desapareamiento de un gen HLA Tipo II (es decir, HLA-DR o HLA-DQB1) aumenta el riesgo de enfermedad de injerto contra hospedador.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, un "banco de linfocitos T deficientes en TCR coincidentes con el tejido" se refiere a diferentes composiciones que contienen cada una linfocitos T de un alotipo HLA específico que se convierten en deficientes en TCR de acuerdo con la descripción. Idealmente, este banco comprenderá composiciones que contienen linfocitos T de una amplia gama de diferentes tipos de HLA que son representativos de la población humana. Dicho banco de linfocitos T deficientes en TCR diseñados será útil ya que facilitará la disponibilidad de linfocitos T adecuados para su uso en diferentes receptores, tales como, por ejemplo, pacientes con cáncer. La descripción proporciona métodos para producir un banco de linfocitos T deficientes en TCR que tienen diferentes haplotipos HLA. Los métodos comprenden obtener un conjunto de linfocitos T aislados que tienen un haplotipo HLA definido, que se determina mediante procedimientos de tipificación estándar (por ejemplo, anticuerpos, PCR o secuenciación de ADN) y expresar una molécula inhibitoria de TCR (TIM) en estos linfocitos T que desestabilizan el complejo TCR mediante la reducción o bloqueo de la expresión de los componentes del complejo TCR. Esto se hace para los linfocitos T obtenidos de una variedad de individuos diferentes con diferentes haplotipos HLA. Esta colección de diferentes linfocitos T de donantes que expresan TIM comprende el banco de linfocitos T deficiente en TCR. El banco de linfocitos T comprende diferentes grupos de linfocitos T que contienen cada uno linfocitos T deficientes en TCR de un tipo de HLA específico. Preferentemente, el banco de linfocitos T comprende una variedad de diferentes tipos de HLA, por ejemplo, al menos 10 tipos diferentes de HLA tisular, al menos 50 tipos diferentes de HLA tisular, al menos 100 tipos diferentes de HLA tisular. En un ejemplo, el banco de linfocitos T comprende linfocitos T de al menos 10 tipos diferentes de HLA tisular. En otra realización, el banco de linfocitos T comprende linfocitos T de al menos 100 tipos diferentes de HLA tisular.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es identificada mediante un experto en la materia como una cantidad de linfocitos T deficientes en TCR que, cuando se administra a un paciente, alivia los signos y/o síntomas de la enfermedad (por ejemplo, cáncer, infección o GVHD). La cantidad real que se administrará se puede determinar en función de los estudios realizados *in vitro* o *in vivo* donde los linfocitos T deficientes en TCR funcionales exhiben actividad farmacológica contra la enfermedad. Por ejemplo, los linfocitos T deficientes en TCR funcionales pueden inhibir el crecimiento de células tumorales ya sea *in vitro* o *in vivo* y la cantidad de linfocitos T deficientes en TCR funcionales que inhibe dicho crecimiento se identifica como una cantidad terapéuticamente eficaz.

35 Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición química o biológica adecuada para la administración a un mamífero. Dichas composiciones pueden formularse específicamente para la administración *mediante* una o más de numerosas rutas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, bucal, intraarterial, intracardial, intracerebroventricular, intradérmica, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, rectal, *mediante* un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica, y transmucosal. Además, la administración puede producirse mediante medio de inyección, líquido, gel, gotas, u otros medios de administración.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, una construcción de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico pretende significar una molécula de ADN que se puede transformar o introducir en un linfocito T y transcribirse y traducirse para producir un producto (por ejemplo, un receptor quimérico o una proteína suicida).

Los ácidos nucleicos están "unidos operativamente" cuando se colocan en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia señal está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en el marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se logra mediante la ligadura en sitios de restricción convenientes o, alternativamente, a través de un método de PCR/recombinación familiar para los expertos en la materia (Gateway® Technology; Invitrogen, Carlsbad California). Si tales sitios no existen, los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

La descripción contempla composiciones y métodos para reducir o mejorar, o prevenir o tratar, enfermedades o afecciones como el cáncer, enfermedades infecciosas, GVHD, rechazo de trasplantes, uno o más trastornos autoinmunitarios o enfermedad por radiación. En un ejemplo no limitativo, las composiciones se basan en el concepto de proporcionar una fuente alogénica de linfocitos T humanos aislados, es decir, linfocitos T deficientes en TCR, que pueden fabricarse antes de la necesidad del paciente y de manera económica. La capacidad de crear un solo producto terapéutico en un solo sitio utilizando procesos que están bien controlados es atractiva en términos de consideraciones de coste y calidad. El cambio de una fuente autóloga a una alogénica para linfocitos T ofrece ventajas significativas. Por ejemplo, se ha estimado que un solo donante sano podría suministrar linfocitos T suficientes para tratar a docenas de pacientes después de la transducción y expansión.

Como se describe en el presente documento, se producen linfocitos T alogénicos modificados que no expresan receptores de linfocitos T funcionales (TCR). Debe entenderse que algunas, o incluso todas, las subunidades/dímeros de TCR pueden expresarse en la superficie celular, pero que el linfocito T no expresa suficiente TCR funcional para inducir una reacción indeseable en el hospedador. Sin TCR funcionales en su superficie, los linfocitos T alogénicos no pueden montar una respuesta inmunitaria no deseada a las células hospedadoras. Como resultado, estos linfocitos T deficientes en TCR no pueden causar GVHD, por ejemplo, ya que no pueden reconocer las moléculas MHC del hospedador. Adicionalmente, estos linfocitos T deficientes en TCR pueden diseñarse para expresar simultáneamente receptores específicos de enfermedades funcionales, no TCR.

Como es bien conocido por un experto en la materia, hay varios métodos fácilmente disponibles para aislar linfocitos T alogénicos de un sujeto. Por ejemplo, utilizando la expresión de marcador de superficie celular o utilizando kits disponibles comercialmente (por ejemplo, ISOCELL™ de Pierce, Rockford, Ill.).

Para el tratamiento del cáncer, el enfoque abarca la producción de un conjunto aislado de linfocitos T efectores deficientes en TCR, por ejemplo, de un alotipo tisular deseado que no expresa una forma funcional de sus TCR endógenos o que expresa niveles sustancialmente reducidos de TCR endógeno en comparación con linfocitos T de tipo silvestre de manera que no provocan una respuesta inmunitaria tras la administración (como la GVHD), sino que expresan un receptor funcional no TCR que reconoce las células tumorales, o expresan otro polipéptido que no ataca de manera apreciable, o no del todo, a células no asociadas a la enfermedad, por ejemplo, células normales (no tumorigénicas) que no expresan el antígeno o ligando reconocido por el receptor específico del tumor o que expresan dicho antígeno o ligando a niveles reducidos con relación a las células tumorales. Los expertos en la materia entenderán que ciertos antígenos asociados a tumores se expresan en tejidos no cancerosos, pero son dianas terapéuticas viables en un hospedador portador de tumores. Con respecto a esto, los expertos en la materia entienden generalmente que ciertos receptores específicos de tumores, no TCR, se expresan en tejidos no cancerosos, pero son dianas terapéuticas viables en un hospedador portador de tumores, ya que pueden expresarse a unos niveles significativamente reducidos en células normales que en tumorales.

Aunque no es necesario para la mayoría de los usos terapéuticos de los linfocitos T deficientes en TCR del sujeto, en algunos casos puede ser deseable eliminar algunos o todos los linfocitos T del donante del hospedador poco después de que hayan mediado su efecto antitumoral. Esto puede facilitarse mediante el diseño de los linfocitos T para expresar receptores o marcadores adicionales que faciliten su eliminación y/o identificación en el hospedador, tal como GFP y similares. Si bien la presente descripción debe eliminar sustancialmente cualquier posibilidad de GVHD u otra reacción inmunitaria adversa en el receptor, esto puede ser deseable en algunos individuos. Esto no debería comprometer la eficacia, ya que ya se ha demostrado que los linfocitos T del donante no necesitan permanecer mucho tiempo en el hospedador para que se inicie un efecto antitumoral a largo plazo (Zhang, T., et al. 2007. *Cancer Res.* 67:11029-11036; Barber, A. et al. 2008. *J. Immunol.* 180:72-78).

En un ejemplo, las construcciones de ácido nucleico introducidas en linfocitos T modificados por ingeniería genética contienen además un gen suicida como la timidina quinasa (TK, de sus siglas en inglés) del virus HSV (herpesvirus) tipo I (Bonini, et al. (1997) *Science* 276: 1719-1724), un "gen suicida artificial" basado en Fas (Thomis, et al. (2001) *Blood* 97: 1249-1257), o el gen de la citosina desaminasa de *E. coli* que se activan mediante ganciclovir, AP1903 o 5-fluorocitosina, respectivamente. El gen suicida se incluye ventajosamente en la construcción de ácido nucleico para proporcionar la oportunidad de extirpar los linfocitos T transducidos en caso de toxicidad y destruir la construcción quimérica una vez que se haya reducido o eliminado un tumor. La utilización de genes suicidas para eliminar células transformadas o transducidas es bien conocido en la materia. Por ejemplo, Bonini, et al. ((1997) *Science* 276: 1719-1724) enseñan que los linfocitos del donante transducidos con el gen suicida HSV-TK proporcionan actividad antitumoral en pacientes de hasta un año y la eliminación de las células transducidas se logra utilizando ganciclovir. Además, González, et al. ((2004) *J. Gene Med.* 6:704-711) describen la orientación del neuroblastoma con clones de linfocitos T citotóxicos modificados genéticamente para expresar un inmunorreceptor quimérico scFvFc:zeta específico para un epítipo en L1-CAM, donde la construcción expresa además el gen suicida de la higromicina timidina quinasa (HyTK) para eliminar los clones transgénicos.

Se contempla que el gen suicida se puede expresar a partir del mismo promotor que el ARNhc, el minigen o el receptor no TCR, o de un promotor diferente. En general, sin embargo, las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína suicida y el ARNhc, el minigen o el receptor no TCR residen en la misma construcción o vector. La expresión del gen suicida a partir del mismo promotor que el ARNhc, el minigen o el receptor no TCR se puede lograr utilizando cualquier sitio de entrada al ribosoma interno (IRES, de sus siglas en inglés) bien conocido. Las secuencias de IRES adecuadas que se pueden utilizar en la construcción de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, IRES de EMCV, c-myc, FGF-2, poliovirus y HTLV-1. Solo a modo de ilustración, una construcción de ácido nucleico para expresar un receptor quimérico puede tener la siguiente estructura: promotor -> receptor quimérico -> IRES -> gen suicida. Como alternativa, el gen suicida se puede expresar desde un promotor diferente al del receptor quimérico (por ejemplo, promotor 1-> receptor quimérico -> promotor 2-> gen suicida).

Debido a la amplia aplicación de los linfocitos T para terapias celulares, y la naturaleza mejorada de los linfocitos T de la invención, la presente invención abarca cualquier método o composición donde los linfocitos T sean terapéuticamente deseables. Tales composiciones y métodos incluyen aquellos para reducir o mejorar, o prevenir o

tratar cáncer, GVHD, rechazo de trasplantes, infección, uno o más trastornos autoinmunitarios, enfermedad por radiación u otras enfermedades o afecciones que se basan en la utilización de linfocitos T procedentes de una fuente alogénica que carece de expresión de TCR funcionales.

- 5 Como se indica, las realizaciones adicionales de la invención abarcan la expresión recombinante de receptores en dichos linfocitos T deficientes en TCR, tales como NKG2D quimérico, dominios Fv quiméricos, NKG2D, o cualquier otro receptor para iniciar señales a los linfocitos T, creando así linfocitos T efectores específicos y potentes. Un experto en la materia puede seleccionar el receptor apropiado para ser expresado por el linfocito T deficiente en TCR basándose en la enfermedad a tratar. Por ejemplo, los receptores que se pueden expresar mediante los
- 10 linfocitos T deficientes en TCR para el tratamiento del cáncer incluirían cualquier receptor en un ligando que se haya identificado en las células cancerosas. Dichos receptores incluyen, pero no se limitan a, NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LLT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), DNAM-1 y NKp80.

- 15 En otra realización de la invención, dichos receptores incluyen, pero sin limitación, receptores quiméricos que comprenden un dominio de unión a ligando obtenido de NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LLT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), DNAM-1 y NKp80, o un anticuerpo antitumoral tal como anti-Her2neu o anti-EGFR, y un dominio de señalización obtenido de CD3-zeta, Dap10, CD28, 41BB y CD40L. Un ejemplo de receptor quimérico es chNKG2D, en el que el NKG2D está unido al dominio citoplásmico de CD3zeta y se asocia con Dap10 para proporcionar señales de activación primarias y secundarias a los linfocitos T (Zhang, T. et al. 2006).
- 20 Cancer Res. 66(11): 5927-5933). En una realización de la invención, el receptor quimérico se une a MIC-A, MIC-B, Her2neu, EGFR, mesotelina, CD38, CD20, CD19, PSA, MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19, MUC20, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, RON, o uno o más miembros de la familia ULBP/RAET1, incluyendo ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 y ULBP6.

- 25 En los usos médicos de la presente invención, a un paciente que padece cáncer, GVHD, rechazo de trasplantes, infección, uno o más trastornos autoinmunitarios o enfermedad por radiación se le debe administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende dichos linfocitos T deficientes en TCR. En otra realización de la invención, debe administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende dichos linfocitos T deficientes en TCR para prevenir, tratar o reducir la GVHD, el rechazo del trasplante o el cáncer.
- 30

Métodos para producir linfocitos T deficientes en TCR

- 35 Los linfocitos T que carecen de forma estable de la expresión de un TCR funcional de acuerdo con la invención pueden producirse utilizando una variedad de enfoques. Los linfocitos T internalizan, clasifican y degradan todo el receptor de linfocitos T como un complejo, con una semivida de aproximadamente 10 horas en linfocitos T en reposo y 3 horas en linfocitos T estimulados (von Essen, M. et al. 2004). J. Immunol. 173:384-393). El correcto funcionamiento del complejo TCR requiere la relación estequiométrica propia de las proteínas que componen el
- 40 complejo TCR. La función del TCR también requiere dos proteínas zeta TCR funcionales con motivos ITAM. La activación del TCR tras el acoplamiento de su ligando MHC-péptido requiere el compromiso de varios TCR en el mismo linfocito T, que todos deben indicar correctamente. Por lo tanto, si un complejo TCR se desestabiliza con proteínas que no se asocian adecuadamente o no pueden emitir una señal óptima, el linfocito T no se activará lo suficiente como para comenzar una respuesta celular.

- 45 Los métodos incluyen la expresión de moléculas inhibitoras de TCR (TIM) en linfocitos T para desestabilizar el complejo TCR mediante el bloqueo de la expresión de componentes esenciales del complejo TCR y/o la interrupción de la expresión o función de TCR. Hay varias clases de TIM, que incluyen, pero sin limitación a, ARN de horquilla corta (ARNhc) y proteínas inhibitoras negativas dominantes, por ejemplo, proteínas truncadas que carecen de importantes motivos de señalización; proteínas de fusión KIR que promueven señales inhibitoras; y proteínas con mutaciones que interrumpen la asociación adecuada con otros componentes del TCR y/o la señalización adecuada. En general, los TIM se pueden utilizar para generar linfocitos T deficientes en TCR mediante el impedimento de la expresión de cualquiera o muy poco de TCR funcional en la superficie celular, y/o promueven la expresión de un TCR sustancialmente dañado en la superficie celular.
- 50

- 55 Los resultados en los ejemplos experimentales *infra*, demuestran que la expresión o función de TCR se puede interrumpir o eliminar utilizando TIM, por ejemplo, ARNhc y/o inhibidores dominantes negativos, produciendo así linfocitos T deficientes en TCR. Tales líneas celulares deficientes en TCR son muy adecuadas para su uso en terapias basadas en linfocitos T para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades y trastornos, como se describe a continuación.
- 60

- En un ejemplo, la expresión de TCR se elimina utilizando ARN de horquilla corta (ARNhc) que se dirige a los ácidos nucleicos que codifican TCR específicos (por ejemplo, TCR- α y TCR- β) y/o cadenas de CD3 (por ejemplo, CD3 zeta) en linfocitos T primarios. Mediante el bloqueo de la expresión de una o más de estas proteínas, el linfocito T ya no producirá uno o más de los componentes clave del complejo TCR, desestabilizando así el complejo TCR y evitando la expresión en la superficie celular de un TCR funcional. Aunque algunos complejos TCR se pueden reciclar a la
- 65

superficie celular, el ARNhc evitará que la nueva producción de proteínas de TCR dé lugar a la degradación y la eliminación de todo el complejo TCR, lo que dará como resultado la producción de un linfocito T con una deficiencia estable en la expresión del TCR funcional.

- 5 La expresión de los ARNhc en linfocitos T primarios se puede lograr utilizando cualquier sistema de expresión convencional, por ejemplo, un sistema de expresión lentiviral. Aunque los lentivirus son útiles para el direccionamiento de linfocitos T primarios en reposo, no todos los linfocitos T expresarán los ARNhc. Algunos de estos linfocitos T pueden no expresar cantidades suficientes de los ARNhc para permitir una inhibición suficiente de la expresión de TCR para alterar la actividad funcional del linfocito T. Por lo tanto, los linfocitos T que conservan la expresión de TCR de moderada a alta después de la transducción viral se pueden eliminar, por ejemplo, mediante técnicas de separación o clasificación celular, de manera que los linfocitos T restantes sean deficientes en TCR o CD3 en la superficie celular, lo que permite la expansión de una población aislada de linfocitos T deficientes en la expresión de TCR o CD3 funcional.
- 10
- 15 Los ARNhc dirigidos a modo de ejemplo se han diseñado para componentes clave del complejo TCR como se establece a continuación (Tabla 1).

Tabla 1

Diana	Base de la diana	Secuencia del ARNhc	% de GC	SEQ ID NO:
TCR- β	18 ^a	AGTGCGAGGAGATTCGGCAGCTTAT	52	1
	21 ^a	GCGAGGAGATTCGGCAGCTTATTTTC	52	2
	48 ^a	CCACCATCCTCTATGAGATCTTGCT	48	3
	54 ^a	TCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAA	44	4
TCR- α	3 ^b	TCTATGGCTTCAACTGGCTAGGGTG	52	5
	76 ^b	CAGGTAGAGGCCTTGTCACCTAAT	52	6
	01 ^b	GCAGCAGACACTGCTTCTTACTTCT	48	7
	07 ^b	GACACTGCTTCTTACTTCTGTGCTA	44	8
	89 ^c	CCTCTGCCTCTTATCAGTTGGCGTT	52	9
	27 ^c	GAGCAAAGTGGTTATTATGTCTGCT	40	10
	62 ^c	AAGCAAACCAGAAGATGCGAACTTT	40	11
	45	GACCTGTATTCTGGCCTGAATCAGA	48	12
		GGCCTCTGCCTCTTATCAGTT	52	13
		GCCTCTGCCTCTTATCAGTTG	52	14
		GCCTCTTATCAGTTGGCGTTT	48	15
CD3- ϵ		AGGATCACCTGTCACTGAAGG	52	16
		GGATCACCTGTCACTGAAGGA	52	17
		GAATTGGAGCAAAGTGGTTAT	38	18
		GGAGCAAAGTGGTTATTATGT	38	19
		GCAAACCAGAAGATGCGAACT	48	20
		ACCTGTATTCTGGCCTGAATC	48	21
		GCCTGAATCAGAGACGCATCT	52	22
		CTGAAATACTATGGCAACACAATGATAAA	31	23
		AAACATAGGCAGTGATGAGGATCACCTGT	45	24
		ATTGTCATAGTGGACATCTGCATCACTGG	45	25
		CTGTATTCTGGCCTGAATCAGAGACGCAT	48	26
CD3- δ^d		GATACCTATAGAGGAACCTGA	38	27
		GACAGAGTGTTTGTGAATTGC	43	28
		GAACACTGCTCTCAGACATTA	43	29
		GGACCCACGAGGAATATATAG	48	30
		GGTGTAATGGGACAGATATAT	38	31

Diana	Base de la diana	Secuencia del ARNhc	% de GC	SEQ ID NO:
		GCAAGTTCATTATCGAATGTG	38	32
		GGCTGGCATCATTGTCACTGA	52	33
		GCTGGCATCATTGTCACTGAT	48	34
		GCATCATTGTCACTGATGTCA	43	35
		GCTTTGGGAGTCTTCTGCTTT	48	36
		TGGAACATAGCACGTTTCTCTCTGGCCTG	52	37
		CTGCTCTCAGACATTACAAGACTGGACCT	48	38
		ACCGTGGCTGGCATCATTGTCACTGATGT	52	39
		TGATGCTCAGTACAGCCACCTTGGAGGAA	52	40
CD3- γ^e		GGCTATCATTCTTCTTCAAGG	43	41
		GCCAGTCAATCAAAGGAAAC	48	42
		GGTTAAGGTGTATGACTATCA	38	43
		GGTTCGGTACTTCTGACTTGT	48	44
		GAATGTGTCAGAACTGCATTG	43	45
		GCAGCCACCATATCTGGCTTT	52	46
		GGCTTTCTCTTTGCTGAAATC	43	47
		GCTTTCTCTTTGCTGAAATCG	43	48
		GCCACCTTCAAGGAAACCAGT	52	49
		GAAACCAGTTGAGGAGGAATT	43	50
		GGCTTTCTCTTTGCTGAAATCGTCAGCAT	45	51
		AGGATGGAGTTCGCCAGTCGAGAGCTTCA	55	52
		CCTCAAGGATCGAGAAGATGACCAGTACA	48	53
		TACAGCCACCTTCAAGGAAACCAGTTGAG	48	54
CD3- ζ^f		TGCTGTTGACAGTGAGCGACCTCTTGCCAGG ATATTTATTTAGTGAAGCCACAGATGTAAAT AAATATCCTGGCAAGAGGGTGCCTACTGCCT CGGA		68
		TGCTGTTGACAGTGAGCGACCTCTTGCCAG GATATTTATTTAGTGAAGCCACAGATGTAAAT AATATCCTGGCAAGAGGGTGCCTACTGCCT CGGA		69
		TGCTGTTGACAGTGAGCGACCTCAGTATCCTG GATCTGAATAGTGAAGCCACAGATGTATTCA GATCCAGGATACTGAGGGTGCCTACTGCCTC GGA		70
		TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGATGGAATCCT CTTCATCTATAGTGAAGCCACAGATGTATAG ATGAAGAGGATTCCATCCATGCCTACTGCCTC GGA		71
^a Con referencia al número de acceso EU030678. ^b Con referencia al número de acceso AY247834. ^c Con referencia al número de acceso NM_000733. ^d Con referencia al número de acceso NM_000732. ^e Con referencia al número de acceso NM_000073. ^f Con referencia al número de acceso NM-000734.				

Los ARNm de TCR-alfa, TCR-beta, TCR-gamma, TCR-delta, CD3-gamma, CD3-delta, CD3-épsilon o CD3-zeta se

pueden dirigir por separado o juntos utilizando una variedad de ARNhc de direccionamiento. Las cadenas TCR- β y TCR- α están compuestas de porciones variables y constantes. Se han diseñado varios ARNhc dirigidos para las porciones constantes de estas secuencias TCR/CD3. Se puede utilizar uno o una combinación de ARNhc para cada diana molecular para identificar el inhibidor más eficaz de la expresión de TCR. Utilizando los protocolos establecidos, cada construcción de ARNhc se clona en, *por ejemplo*, un plásmido pLko.1 o vector pSMc2, con la expresión controlada mediante un promotor que se utiliza rutinariamente en la materia, *por ejemplo*, el promotor U6p. La construcción resultante se puede seleccionar y confirmar para su precisión mediante secuenciación. El plásmido de expresión del ARNhc se puede luego transfectar en cualquier célula hospedadora adecuada (por ejemplo, 293T), junto con un plásmido de empaquetamiento y un plásmido de envoltura para empaquetar. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica humana primarias (PBMC) de donantes sanos y se activan con anti-CD3 soluble a dosis bajas y, por ejemplo, rhuIL-2 de 25 U/ml a 50 U/ml, durante 72 horas. Aunque no es necesario activar los linfocitos T para la transducción retroviral, la transducción funciona de manera más eficaz y permite que las células continúen expandiéndose en la IL-2. Las células activadas se lavan y se transducen, por ejemplo, utilizando una centrifugación de 1 hora a 30 °C, seguida de un período de descanso de 7 horas.

En otro ejemplo, la sobreexpresión de una proteína inhibidora negativa dominante es capaz de interrumpir la expresión o función de TCR. En este ejemplo, un minigen que incorpora parte, o la totalidad, de un polinucleótido que codifica para uno de los componentes del TCR (por ejemplo, TCR-alfa, TCR-beta, CD3-gamma, CD3-delta, CD3-epsilon o CD3-zeta) se prepara, pero se modifica de manera que: (1) carece de motivos de señalización clave (por ejemplo, una ITAM) necesarios para la función de la proteína; (2) se modifica para que no se asocie correctamente con sus otros componentes naturales de TCR; o (3) puede asociarse correctamente pero no se une a los ligandos (por ejemplo, un minigen de TCR beta truncado). Además, el minigen puede modificarse para incluir un motivo de señal inhibidora, por ejemplo, un dominio citoplásmico de una proteína KIR, que altera la señalización celular y promueve señales inhibidoras a través del reclutamiento de fosfatasa, por ejemplo, SHP1 y SHP2.

Estos minigenes también pueden codificar una porción de una proteína que sirve como medio para identificar el minigen sobreexpresado. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican una proteína CD19 truncada, que contiene el sitio de unión para los AcM anti-CD19, se pueden unir operativamente al minigen de modo que la célula resultante que expresa el minigen expresará la proteína codificada y se pueda identificar con AcM anti-CD19. Esta identificación permite determinar la extensión de la expresión de minigenes y aislar células que expresan esta proteína (y, por lo tanto, carecen de un TCR funcional).

En un ejemplo, la sobreexpresión de un minigen que carece de motivos de señalización conduce a un complejo TCR que no puede señalar correctamente cuando el TCR está activado mediante su ligando MHC-péptido en una célula opuesta. En un ejemplo no limitativo, la alta expresión de este minigen (y el polipéptido codificado) compite con la proteína completa natural cuando los componentes del TCR se asocian, lo que resulta en un complejo TCR que no puede señalar. En otro ejemplo, el minigen comprende o, alternativamente, consiste en, un polinucleótido que codifica los polipéptidos completos o parciales de CD3-zeta, CD3-gamma, CD3-delta o CD3-epsilon que carecen de los motivos ITAM requeridos para la señalización. La proteína CD3-zeta contiene tres motivos ITAM en la porción citoplásmica, y en la invención, la eliminación de todos estos a través del truncamiento inhibe la señalización del TCR adecuada en cualquier complejo donde se incorpore esta proteína modificada. Véase, por ejemplo, TIM5-8 en la Tabla 2, que corresponde a las SEQ ID NO: 72-79. La construcción puede incorporar ITIM u otros motivos de señalización, que se sabe que alteran la señalización celular y promueven señales inhibidoras a través del reclutamiento de fosfatasa tales como SHP1 y SHP2. Véase, por ejemplo, TIM9-13 en la Tabla 2, que corresponde a las SEQ ID NO: 80-89.

En un ejemplo, el minigen comprende un polinucleótido que codifica polipéptidos completos o parciales de CD3-zeta, CD3-gamma, CD3-delta o CD3-epsilon con mutaciones, por ejemplo, una sola alteración de nucleótidos, que da como resultado un cambio del aminoácido codificado mediante el polinucleótido. Véase, por ejemplo, TIM14-19 en la Tabla 2, que corresponde a las SEQ ID NO: 90-101.

En otro ejemplo, la sobreexpresión de un minigen se modifica para que el polipéptido codificado se pueda asociar con algunos, pero no todos, de sus socios naturales, creando una competencia con la proteína normal para aquellas proteínas asociadas. En otra hipótesis no limitante, la expresión de alto nivel del minigen (y del polipéptido codificado) compite con las proteínas asociadas naturales y evita el ensamblaje de un complejo TCR funcional, que requiere que todos los componentes se asocien en las proporciones adecuadas y las interacciones proteína-proteína. En otro ejemplo, los minigenes comprenden o, alternativamente, consisten en, todos o parte de los polinucleótidos que codifican proteínas de longitud completa (por ejemplo, TCR-alfa, TCR-beta, CD3-gamma, CD3-delta, CD3-epsilon o CD3-zeta), pero que contienen delecciones seleccionadas en la secuencia que codifica los aminoácidos en la porción transmembrana de la proteína que se sabe que se requieren para ensamblar con otras proteínas TCR/CD3.

En una realización preferida, las delecciones seleccionadas en la secuencia que codifica los aminoácidos en la porción transmembrana de la proteína que se sabe que se requieren para ensamblar con otras proteínas TCR/CD3 incluyen, aunque no de forma limitativa: el resto de arginina en la posición 5 en la región transmembrana de TCR-alfa; el resto de lisina en la posición 10 en la región transmembrana de TCR-alfa; el resto de lisina en la posición 9

en la región transmembrana de TCR-beta; el resto de ácido glutámico en la región transmembrana de CD3-gamma; el resto de ácido aspártico en la región transmembrana de CD3-delta-epsilon; el resto de ácido aspártico en la región transmembrana de CD3-epsilon; y el resto de ácido aspártico en la región transmembrana de CD3-zeta.

5 La sobreexpresión de una proteína TCR-alfa, TCR-beta, TCR-gamma o TCR-delta truncada da como resultado un complejo TCR que no puede unirse a los ligandos MHC-péptido, y por lo tanto no funcionará para activar el linfocito T. Véase, la Figura 2, paneles (A) y (B). En otro ejemplo, los minigenes comprenden o, alternativamente, consisten en, polinucleótidos que codifican las porciones enteras citoplasmáticas y transmembrana de estas proteínas y porciones de la región extracelular, pero carecen de polinucleótidos que codifican todo o parte del primer dominio extracelular (es decir, el dominio más externo que contiene el sitio de unión al ligando). En una realización preferida, dichos polinucleótidos de minigenes no codifican polipéptidos Valfa y Vbeta de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta. En un ejemplo, los polinucleótidos de minigenes pueden estar unidos operativamente a polinucleótidos que codifican una etiqueta de epítipo de proteína (por ejemplo, CD19), permitiendo así la identificación de AcM de las células que expresan estos genes.

15 En otro ejemplo, estos minigenes se pueden expresar utilizando un promotor viral fuerte, como el 5'LTR de un retrovirus, o un promotor de CMV o SV40. Normalmente, este promotor está inmediatamente cadena arriba del minigen y conduce a una alta expresión del ARNm del minigen. En otro ejemplo, la construcción codifica una segunda secuencia de polinucleótidos bajo el mismo promotor (utilizando, por ejemplo, una secuencia de ADN de IRES entre ellos) u otro promotor. Esta segunda secuencia de polinucleótidos puede codificar para un receptor funcional no TCR que proporciona especificidad para el linfocito T. Los ejemplos de este polinucleótido incluyen, pero no se limitan a, NKG2D quimérico, NKp30 quimérico, NKp46 quimérico o anti-Her2neu quimérico. En un ejemplo adicional, los minigenes-promotores se construyen en un retroviral u otro plásmido de expresión adecuado y se transfectan o transducen directamente en linfocitos T utilizando métodos estándar (Zhang, T. et al., (2006) Cancer Res., 66(11) 5927-5933; Barber, A. et al., (2007) Cancer Res., 67(10):5003-5008).

Después de la transducción y expansión viral utilizando cualquiera de los métodos discutidos anteriormente, cualquier linfocito T que aún exprese TCR/CD3 se elimina utilizando AcM anti-CD3 y perlas magnéticas utilizando columnas de selección Miltenyi como se describió anteriormente (Barber, A. et al., (2007) Cancer Res., 67(10):5003-5008). Posteriormente, los linfocitos T se lavan y se cultivan en IL-2 (25 U/ml) durante 3 a 7 días para permitir la expansión de las células efectoras de una manera similar a la de la utilización de las células *in vivo*.

La expresión de TCR $\alpha\beta$ y CD3 se puede evaluar mediante citometría de flujo y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). La expresión del ARNm de TCR- α , TCR- β , CD3 ϵ , CD3- ζ y GAPDH (como control) se puede analizar mediante qRT-PCR utilizando un instrumento de PCR en tiempo real ABI7300 y cebadores TAQMAN® específicos del gen utilizando métodos similares a los utilizados en Sentman, C.L. et al. ((2004) J. Immunol. 173:6760-6766). Los cambios en la expresión de la superficie celular se pueden determinar utilizando anticuerpos específicos para TCR- α , TCR- β , CD3 ϵ , CD8, CD4, CD5 y CD45.

40 Es posible que una única especie de ARNhc no inhiba suficientemente la expresión de TCR en la superficie celular. En este caso, se pueden utilizar múltiples ARNhc de TCR simultáneamente para dirigir múltiples componentes del complejo TCR. Se requiere cada componente para el ensamblaje del complejo TCR en la superficie celular, por lo que la pérdida de una de estas proteínas puede ocasionar la pérdida de la expresión de TCR en la superficie celular. Si bien puede permanecer algo o incluso toda la expresión de TCR, es la función del receptor la que determina si el receptor induce una respuesta inmunitaria. La deficiencia funcional, en lugar de la ausencia completa de la superficie celular, es la medida crítica. En general, cuanto más baja sea la expresión de TCR, menos probable será la posibilidad de que se produzca una reticulación de TCR para conducir a la activación de los linfocitos T a través del complejo TCR. Si bien los ejemplos particulares abarcan el direccionamiento de TCR-alfa, TCR-beta y CD3-epsilon, otros componentes del complejo TCR, tales como CD3-gamma, CD3-delta o CD3-zeta, también pueden dirigirse.

50 El objetivo principal de eliminar el TCR de la superficie celular es prevenir la activación del linfocito T a alelos MHC incompatibles. Para determinar si la reducción en la expresión de TCR con cada construcción de ARNhc o minigen es suficiente para alterar la función de los linfocitos T, los linfocitos T pueden analizarse para: (1) supervivencia celular *in vitro*; (2) la proliferación en presencia de PBMC alogénicas tratadas con mitomicina C; y (3) la producción de citocinas en respuesta a PBMC alogénicas, AcM anti-CD3 o AcM anti-TCR.

Para probar la supervivencia celular, los linfocitos T transducidos se propagan en medio RPMI completo con rhuIL-2 (por ejemplo, 25 U/ml a 50 U/ml). Las células se colocan en placas a densidades similares al comienzo del cultivo y se puede extraer una muestra para el recuento y la viabilidad de las células diariamente durante 7 o más días. Para determinar si los linfocitos T expresan suficiente TCR para inducir una respuesta contra células alogénicas, los linfocitos T transducidos o de control se cultivan con PBMC alogénicas o singénicas tratadas con mitomicina C, por ejemplo, en una proporción de 4:1. Los linfocitos T están precargados con CFSE, que es un colorante permeable a las células que se divide por igual entre las células hijas después de la división. La extensión de la división celular se puede determinar fácilmente mediante citometría de flujo. Otro sello distintivo de la activación de los linfocitos T es la producción de citocinas. Para determinar si cada construcción de ARNhc inhibe la función de los linfocitos T, los linfocitos T transducidos se cultivan con diferentes dosis de AcM anti-CD3 (1,6 a 5000 ng/ml). Después de 24 horas,

se recogieron los sobrenadantes libres de células y la cantidad de IL-2 y/o IFN- γ producida se cuantificó mediante ELISA. La PMA/ionomicina se utiliza como control positivo para estimular los linfocitos T, y los linfocitos T solos se utilizan como control negativo.

- 5 El efecto de las TIM ejemplares, por ejemplo, ARNhc, proteínas dominantes negativas truncadas, proteínas dominantes negativas de fusión KIR y proteínas dominantes negativas con secuencia de aminoácidos alterada como resultado de alteraciones de un solo nucleótido, diseñadas para componentes clave del complejo TCR, por ejemplo, CD3-epsilon o CD3-zeta, en la función efectora de los linfocitos T se evaluó y los resultados se proporcionan a continuación en la Tabla 2. Estos resultados demuestran que los linfocitos T deficientes en TCR pueden producirse
10 utilizando TIM.

Es posible que la eliminación de los componentes TCR-alfa o TCR-beta permita la expansión preferencial de los linfocitos T de TCR-gamma/delta. Estos linfocitos T son bastante raros en la sangre, sin embargo, la presencia de estas células se puede determinar con anticuerpos anti-TCR-gamma/delta. Si hay un crecimiento excesivo de estas
15 células, se puede utilizar el direccionamiento de CD3-epsilon, que se requiere para la expresión en la superficie celular de TCR-alfa/beta y TCR-gamma/delta en la superficie de la célula. Tanto IL-2 como IFN- γ son citocinas efectoras clave que impulsan la expansión de los linfocitos T y la activación de macrófagos. Por lo tanto, la falta de producción de estas citocinas es un signo de inactivación funcional. También es posible medir cambios en otras citocinas, tales como el TNF- α . Cualquier reducción en la supervivencia de los linfocitos T tras la eliminación de la
20 expresión de TCR se puede determinar mediante el cultivo de los linfocitos T deficientes en TCR con PBMC, que refleja mejor el entorno *in vivo* y proporciona soporte para la supervivencia de los linfocitos T.

Métodos para producir linfocitos T deficientes en TCR que expresan un receptor funcional no de linfocitos T

- 25 En otra realización de la invención, los linfocitos T deficientes de manera estable en la expresión de TCR funcional expresan un receptor funcional no TCR. En esta realización, la eliminación de la función de TCR (como se describió anteriormente) se combina adicionalmente con la expresión de uno o más receptores de direccionamiento exógenos no TCR (tal como, por ejemplo, NKG2D quimérico (quNKG2D) o moléculas Fv). Esta realización proporciona productos celulares "universales", que se pueden almacenar para futuras terapias de cualquier paciente con
30 cualquier tipo de cáncer, siempre que se emplee un receptor de direccionamiento adecuado.

Las realizaciones adicionales de la invención abarcan la expresión recombinante de receptores en dichos linfocitos T deficientes en TCR, tales como quNKG2D, dominios Fv quiméricos, NKG2D, o cualquier otro receptor para iniciar señales a los linfocitos T, creando así linfocitos T efectores específicos y potentes. Un experto en la materia puede
35 seleccionar el receptor apropiado para ser expresado por el linfocito T deficiente en TCR basándose en la enfermedad a tratar. Por ejemplo, los receptores que se pueden expresar mediante los linfocitos T deficientes en TCR para el tratamiento del cáncer incluirían cualquier receptor en un ligando que se haya identificado en las células cancerosas. Dichos receptores incluyen, pero no se limitan a, NKG2D (número de acceso de GENBANK BC039836), NKG2A (número de acceso de GENBANK AF461812), NKG2C (número de acceso de GENBANK AJ001684),
40 NKG2F, LIT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30 (por ejemplo, número de acceso de GENBANK AB055881), NKp44 (por ejemplo, número de acceso de GENBANK AJ225109), NKp46 (por ejemplo, número de acceso de GENBANK AJ001383), CD244 (2B4), DNAM-1 y NKp80.

En otra realización de la invención, dichos receptores incluyen, pero sin limitación a, receptores quiméricos que comprenden un dominio de unión a ligando obtenido de NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LIT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), DNAM-1, y NKp80, o un anticuerpo antitumoral, tal como anti-Her2neu y anti-EGFR, y un dominio de señalización obtenido de CD3-zeta (CD3 ζ) (por ejemplo, número de acceso de GENBANK humano NM_198053) (SEQ ID NO: 62), Dap10 (por ejemplo, número de acceso de GENBANK AF072845), CD28, 41BB y/o CD40L.
50

En una realización adicional de la invención, el receptor quimérico se une a MIC-A, MIC-B, Her2neu, EGFR, mesotelina, CD38, CD20, CD19, PSA, MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19, MUC20, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, RON, o uno o más miembros de la familia ULBP/RAET1, incluyendo ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4,
55 ULBP5 y ULBP6.

Solo a modo de ilustración, los ARNhc o minigenes que muestran la eliminación de la expresión en la superficie celular del complejo TCR se expresan conjuntamente con el receptor quNKG2D a través de uno o más vectores virales. Para lograr la expresión conjunta en un vector, el ARNhc se puede dirigir mediante un promotor U6 y el receptor quNKG2D mediante un promotor PGK. En otro ejemplo, si se utiliza una secuencia IRES para separar los
60 elementos genéticos, entonces solo se utiliza un promotor.

Una proteína receptora de células NK tipo C de tipo lectina particularmente adecuada para su uso en el receptor quimérico incluye un receptor expresado en la superficie de las células citotóxicas naturales, donde tras la unión a su ligando(s) relacionado(s) altera la activación de las células NK. El receptor puede trabajar solo o en concierto con otras moléculas. Los ligandos para estos receptores generalmente se expresan en la superficie de uno o más tipos
65

de células tumorales, por ejemplo, tumores asociados con cánceres de colon, pulmón, mama, riñón, ovario, cuello del útero y próstata; melanomas; mielomas; leucemias; y linfomas (Wu, et al. (2004) J. Clin. Invest. 114:60-568; Groh, et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6879-6884; Pende, et al. (2001) Eur. J. Immunol. 31:1076-1086) y no se expresan ampliamente en la superficie de las células de tejidos normales.

Ejemplos de dichos ligandos incluyen, pero no se limitan a, MIC-A, MIC-B, proteínas de choque térmico, proteínas de unión a ULBP (por ejemplo, ULBP 1-4), y moléculas de HLA no clásicas como HLA-E y HLA-G, mientras que las moléculas de MHC clásicas como HLA-A, HLA-B o HLA-C y sus alelos, por lo tanto, no se consideran generalmente, ligandos fuertes de la proteína receptora de células NK tipo C de tipo lectina de la presente invención. Los receptores de células NK tipo C de tipo lectina que se unen a estos ligandos generalmente tienen una estructura de proteína de tipo II, donde el extremo N-terminal de la proteína es intracelular. Además de cualquier receptor de células NK enumerado anteriormente, otros receptores de células NK ejemplares de este tipo incluyen, pero no se limitan a, Dectin-1 (número de acceso de GENBANK AJ312373 o AJ312372), antígeno asociado a la función de mastocitos (número de acceso de GENBANK AF097358), HNKRP-1A (número de acceso de GENBANK U11276), LLT1 (número de acceso de GENBANK AFI33299), CD69 (número de acceso de GENBANK NM_001781), homólogo de CD69, CD72 (número de acceso de GENBANK NM_001782), CD94 (número de acceso de GENBANK NM_002262 o NM_007334), KLRFL (número de acceso de GENBANK NM_016523), receptor de LDL oxidado (número de acceso de GENBANK NM_002543), CLEC-1, CLEC-2 (número de acceso de GENBANK NM_016509), NKG2D (número de acceso de GENBANK BC039836), NKG2C (número de acceso de GENBANK AJ001684), NKG2A (número de acceso de GENBANK AF461812), NKG2E (número de acceso de GENBANK AF461157), WUGSC:H_DJ0701016.2, o lectina que asocia DAP12 mielóide (MDL-1; número de acceso de GENBANK AJ271684). En una realización preferida de la invención, el receptor de células NK es NKG2D humano (SEQ ID NO: 58) o NKG2C humano (SEQ ID NO: 59).

Los receptores de tipo I similares que serían útiles en el receptor quimérico incluyen NKp46 (número de acceso de GENBANK AJ001383), NKp30 (número de acceso de GENBANK AB055881), o NKp44 (número de acceso de GENBANK AJ225109).

Como alternativa a la proteína receptora de células NK tipo C de tipo lectina, se puede utilizar una proteína asociada con una proteína receptora de células NK tipo C de tipo lectina en la proteína receptora quimérica. En general, las proteínas asociadas con el receptor de células NK tipo C de tipo lectina se definen como proteínas que interactúan con el receptor y transducen las señales del mismo. Las proteínas humanas adecuadas que funcionan de esta manera incluyen además, pero no se limitan a, DAP10 (por ejemplo, número de acceso de GENBANK AF072845) (SEQ ID NO: 60), DAP12 (por ejemplo, número de acceso de GENBANK AF019562) (SEQ ID NO: 61) y FcR gamma.

Al extremo N del receptor de células NK tipo C de tipo lectina se fusiona un receptor de señalización inmunitario que tiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM, de sus siglas en inglés), (Asp/Glu)-Xaa-Xaa-Tyr*-Xaa-Xaa-(Ile/Leu)-Xaa₆₋₈-Tyr*-Xaa-Xaa-(Ile/Leu) (SEQ ID NOS: 55-57) que se implica en la activación de las respuestas celulares a través de los receptores inmunitarios. De forma similar, cuando se emplea una proteína asociada con un receptor de células NK tipo C de tipo lectina, se puede fusionar un receptor de señalización inmunitario al extremo C de dicha proteína (Figura 1). Los receptores de señalización inmunitarios adecuados para su uso en el receptor quimérico incluyen, pero no se limitan a, la cadena zeta del receptor de linfocitos T, la cadena eta que difiere de la cadena zeta solo en su exón más C-terminal como resultado de una alternativa que empalma el ARNm zeta, las cadenas delta, gamma y épsilon del receptor de linfocitos T (cadenas CD3) y la subunidad gamma del receptor FcR1. En realizaciones particulares, además de los receptores de señalización inmunitarios identificados previamente, el receptor de señalización inmunitario es CD3-zeta (CD3ζ) (por ejemplo, número de acceso de GENBANK humano NM_198053 y NM-000734) (SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 64, respectivamente), o la cadena gamma del receptor Fc épsilon humano (por ejemplo, número de acceso de GENBANK M33195) (SEQ ID NO: 63) o el dominio citoplásmico o una variante de empalme del mismo. En particular, por ejemplo, CD3-zeta tiene 2 variantes de transcripción empalmadas alternativamente que codifican distintas isoformas, es decir, la variante 1 de transcripción (SEQ ID NO: 62) y la variante 2 de transcripción (SEQ ID NO: 64). La isoforma codificada de la variante 2 (SEQ ID NO: 65) carece de un aminoácido interno, en comparación con la variante 1.

En realizaciones particulares, un receptor quimérico es una fusión entre NKG2D y CD3-zeta, o Dap10 y CD3-zeta.

En la construcción de ácido nucleico de la presente descripción, el promotor está unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor quimérico, es decir, se posiciona de manera que promueva la transcripción del ARN mensajero del ADN que codifica el receptor quimérico. El promotor puede ser de origen genómico o generarse sintéticamente. Una variedad de promotores para su uso en linfocitos T son bien conocidos en la materia (por ejemplo, el promotor CD4 desvelado por Marodon, et al. (2003) Blood 101 (9): 3416-23). El promotor puede ser constitutivo o inducible, donde la inducción está asociada con el tipo celular específico o un nivel específico de maduración. Como alternativa, también son adecuados varios promotores virales bien conocidos. Los promotores de interés incluyen el promotor de la actina β, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor de inmunoglobulina, el promotor de citomegalovirus humano, el promotor de retrovirus y el promotor del virus de Friend formador de foco del bazo. Los promotores pueden o no estar asociados con potenciadores, donde los

potenciadores pueden estar asociados naturalmente con el promotor particular o asociados con un promotor diferente.

La secuencia del marco de lectura abierto que codifica el receptor quimérico se puede obtener a partir de una fuente de ADN genómico, una fuente de ADNc, o se puede sintetizar (por ejemplo, *mediante* PCR), o combinaciones de los mismos. Dependiendo del tamaño del ADN genómico y el número de intrones, puede ser deseable utilizar ADNc o una combinación de los mismos, ya que se encuentra que los intrones estabilizan el ARNm o proporcionan expresión específica de linfocitos T (Barthel y Goldfeld (2003) J. Immunol. 171(7):3612-9). Asimismo, también puede ser ventajoso utilizar regiones no codificantes endógenas o exógenas para estabilizar el ARNm.

Para la expresión de un receptor quimérico, la región de iniciación de la transcripción de origen natural o endógena de la secuencia de ácido nucleico que codifica el componente N-terminal del receptor quimérico se puede utilizar para generar el receptor quimérico en el hospedador diana. Como alternativa, se puede utilizar una región de iniciación de la transcripción exógena que permita la expresión constitutiva o inducible, donde la expresión se puede controlar dependiendo del hospedador diana, el nivel de expresión deseado, la naturaleza del hospedador diana y similares.

Del mismo modo, la secuencia señal que dirige el receptor quimérico a la membrana superficial puede ser la secuencia señal endógena del componente N-terminal del receptor quimérico. Opcionalmente, en algunos casos, puede ser deseable intercambiar esta secuencia por una secuencia señal diferente. Sin embargo, la secuencia señal seleccionada debe ser compatible con la vía secretora de linfocitos T para que el receptor quimérico se presente en la superficie del linfocito T.

De forma similar, se puede proporcionar una región de terminación mediante la región de terminación de la transcripción de origen natural o endógena de la secuencia de ácido nucleico que codifica el componente C-terminal del receptor quimérico. Como alternativa, la región de terminación puede proceder de una fuente diferente. En su mayor parte, la fuente de la región de terminación generalmente no se considera crítica para la expresión de una proteína recombinante y se puede emplear una amplia variedad de regiones de terminación sin afectar adversamente a la expresión.

Como apreciará un experto en la materia, en algunos casos, se pueden eliminar algunos aminoácidos en los extremos del receptor de células citolíticas naturales tipo C de tipo lectina (o una proteína asociada con él) o del receptor de señalización inmunitario, generalmente, no más de 10, más generalmente no más de 5 restos. Asimismo, puede ser deseable introducir una pequeña cantidad de aminoácidos en los bordes, generalmente, no más de 10, más generalmente no más de 5 restos. La eliminación o inserción de aminoácidos generalmente será como resultado de las necesidades de la construcción, que proporciona sitios de restricción convenientes, facilidad de manipulación, mejora en los niveles de expresión o similares. Además, la sustitución de uno o más aminoácidos con un aminoácido diferente puede ocurrir por razones similares, generalmente, no sustituyendo más de aproximadamente cinco aminoácidos en cualquier dominio.

La construcción quimérica, que codifica el receptor quimérico, se puede preparar de manera convencional. Puesto que, en su mayor parte, se emplean secuencias naturales, los genes naturales se aíslan y se manipulan, según corresponda (por ejemplo, cuando se emplea un receptor de Tipo II, el componente del receptor de señalización inmunitario puede tener que invertirse), para permitir la unión adecuada de los diversos componentes. Por lo tanto, las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas N-terminal y C-terminal del receptor quimérico se pueden aislar mediante el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que utiliza cebadores apropiados que dan como resultado la eliminación de las porciones no deseadas del gen. Como alternativa, se pueden utilizar digestiones de restricción de genes clonados para generar la construcción quimérica. En cualquier caso, las secuencias se pueden seleccionar para proporcionar sitios de restricción que tengan extremos romos o superposiciones complementarias.

Las diversas manipulaciones para preparar la construcción quimérica pueden llevarse a cabo *in vitro* y, en realizaciones particulares, la construcción quimérica se introduce en vectores para la clonación y la expresión en un hospedador apropiado utilizando métodos estándar de transformación o transfección. Por lo tanto, después de cada manipulación, la construcción resultante de la unión de las secuencias de ADN se clona, el vector se aísla y la secuencia se selecciona para asegurar que la secuencia codifica el receptor quimérico deseado. La secuencia se puede seleccionar mediante análisis de restricción, secuenciación o similares.

Se contempla que la construcción quimérica se puede introducir en linfocitos T como ADN desnudo o en un vector adecuado. Los métodos para transfectar establemente linfocitos T mediante electroporación utilizando ADN desnudo son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.410.319. El ADN desnudo generalmente se refiere al ADN que codifica un receptor quimérico contenido en un vector de expresión de plásmido en la orientación apropiada para la expresión. Ventajosamente, la utilización de ADN desnudo reduce el tiempo requerido para producir linfocitos T que expresan el receptor quimérico.

Como alternativa, se puede utilizar un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector

viral adenoasociado, o un vector lentiviral) para introducir la construcción quimérica en los linfocitos T. Los vectores adecuados para su uso de acuerdo con el método de la presente invención no se replican en los linfocitos T del sujeto. Se conoce un gran número de vectores que se basan en virus, donde el número de copias del virus que se mantiene en la célula es lo suficientemente bajo para mantener la viabilidad de la célula. Los vectores ilustrativos incluyen los vectores pFB-neo (STRATAGENE™), así como los vectores basados en el VIH, SV40, EBV, HSV o BPV. Una vez que se establece que el linfocito T transfectado o transducido es capaz de expresar el receptor quimérico como una proteína de membrana de superficie con la regulación deseada y en un nivel deseado, se puede determinar si el receptor quimérico es funcional en la célula hospedadora para proporcionar la inducción de señal deseada (por ejemplo, producción de Rantes, Mipl-alfa, GM-CSF tras la estimulación con el ligando apropiado).

Tal como se ha descrito anteriormente, las PBMC humanas primarias se aíslan de donantes sanos y se activan con dosis bajas de anti-CD3 soluble (por ejemplo, 40 ng/ml) y rhIL-2 (por ejemplo, 50 U/ml), perlas anti-CD3/anti-CD28 y rhIL-2, o células presentadoras de antígenos irradiados y rhIL-2. Luego, los linfocitos T activados se lavan y se transducen con retrovirus, por ejemplo, una inoculación por centrifugación de 1 hora a 32 °C, seguida de un período de descanso de 7 horas. Aunque no es necesario activar los linfocitos T para la transducción lentiviral, la transducción es más eficaz y las células continúan expandiéndose en la IL-2. Las células activadas se lavan y se transducen, tal como se describe en el presente documento, seguido de un período de descanso y el sometido a selección, por ejemplo, G418 durante 3 días. Después de la selección, las células se lavan y se cultivan en IL-2 durante 2 a 7 días para permitir la expansión de las células efectoras de una manera similar a la de la utilización de las células *in vivo*. Los cambios en la expresión de la superficie celular de los receptores se analizan utilizando anticuerpos específicos para CD3, CD4, NKG2D o CD5. Se espera que la expresión del receptor exógeno no TCR se incremente en las células que se han transducido para expresar ese receptor particular, por ejemplo, se espera que los linfocitos T transducidos con retrovirus que expresan quNKG2D tengan un mayor nivel de expresión en la superficie de quNKG2D.

La expresión de TCRap, CD3 y NKG2D se puede evaluar mediante citometría de flujo y qRT-PCR cuantitativa como se describe en el presente documento. También se puede determinar el número de linfocitos T CD4+ y CD8+. El número total de células y el porcentaje de linfocitos T deficientes en complejos de TCR, competentes para TCR y que expresan quNKG2D se pueden determinar mediante citometría de flujo. Estos números se pueden comparar con las PBMC que se han transducido con los genes ARNhc o quNKG2D solo (como controles). Las células transducidas con solo vector también se pueden incluir como controles.

Después de la transducción y expansión viral, los linfocitos TCR+ y TCR- se pueden separar mediante AcM con perlas magnéticas sobre columnas Miltenyi y se identifican y aíslan los linfocitos T deficientes en TCR que expresan el receptor chNKG2D. Por ejemplo, la expresión de quNKG2D se puede verificar mediante QRT-PCR utilizando cebadores específicos para el receptor quNKG2D (Zhang, T. et al. (2007) Cancer Res. 67:11029-11036; Barber, A. et al. (2008) J. Immunol. 180:72-78). La función de estas células quNKG2D+ deficientes en TCR se puede determinar mediante el cultivo de las células con PBMC alogénicas o células tumorales que expresan ligandos NKG2D. La proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas (por ejemplo, IFN-γ y/o IL-2) se pueden determinar mediante citometría de flujo y ELISA, respectivamente. Para determinar si los linfocitos T que perdieron la función de TCR y retuvieron la función de quNKG2D, los linfocitos T transducidos o de control se cultivarán con anti-CD3 (1,6 a 5000 ng/ml), PBMC alogénicas tratadas con mitomicina C o PBMC singénicas. Los sobrenadantes celulares se recolectan y el grado de producción de citocinas (por ejemplo, IFN-γ y/o IL-2) se determina mediante ELISA. Los linfocitos T se pueden precargar con CFSE, que es un colorante permeable a las células que se divide por igual entre las células hijas después de la división. La extensión de la división celular se puede determinar fácilmente mediante citometría de flujo.

Otro sello distintivo de la activación de los linfocitos T es la producción de citocinas. Para determinar si las células quNKG2D+ deficientes en TCR inducen la activación de los linfocitos T, los linfocitos T se cultivan con PBMC alogénicas tratadas con mitomicina C, PBMC singénicas o células tumorales: P815-MICA (un tumor murino que expresa MICA humana, un ligando para NKG2D), P815, A2008 (una célula tumoral de ovario humano, ligando+ NKG2D) y U266 (una línea celular de mieloma humano, ligando+ NKG2D). Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes libres de células y la cantidad de IL-2 y IFN-γ producida se cuantificó mediante ELISA. Los linfocitos T solos y el cultivo con PBMC singénicas se utilizan como controles negativos. Se observó una reducción mayor del 40 % en la producción de IFN-γ en los linfocitos T que expresan TIM7 y TIM8 que también expresan conjuntamente quNKG2D (los resultados no se muestran en la Figura 3).

Posteriormente, los linfocitos T transducidos se reintroducen o administran al sujeto para activar respuestas antitumorales en dicho sujeto. Para facilitar la administración, los linfocitos T transducidos de acuerdo con la invención se pueden transformar en una composición farmacéutica o en un implante apropiado para la administración *in vivo*, con vehículos o diluyentes apropiados, que además pueden ser farmacéuticamente aceptables. Los medios para hacer dicha composición o un implante se han descrito en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mack, ed. (1980)). Cuando sea apropiado, los linfocitos T transducidos se pueden formular en una preparación en forma semisólida o líquida, como una cápsula, solución, inyección, inhalador o aerosol, en las formas habituales por su vía de administración respectiva. Se pueden utilizar medios conocidos en la materia para prevenir o minimizar la liberación y absorción de la composición hasta que

alcance el tejido u órgano diana, o para asegurar la liberación programada de la composición. Deseablemente, sin embargo, se emplea una forma farmacéuticamente aceptable que no afecta a las células que expresan el receptor quimérico. Por lo tanto, deseablemente, los linfocitos T transducidos se pueden transformar en una composición farmacéutica que contiene una solución salina equilibrada, preferentemente solución salina equilibrada de Hanks, o solución salina normal.

Métodos para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar, o prevenir, enfermedades y trastornos que utilizan linfocitos T deficientes en TCR

La descripción también está dirigida a métodos para reducir o mejorar, o prevenir o tratar, enfermedades y trastornos que utilizan los linfocitos T deficientes en TCR descritos en el presente documento, las poblaciones aisladas de los mismos o las composiciones terapéuticas que comprenden los mismos. En un ejemplo, los linfocitos T deficientes en TCR descritos en el presente documento, las poblaciones aisladas de los mismos, o las composiciones terapéuticas que los comprenden se utilizan para reducir o mejorar, o prevenir o tratar, cáncer, infección, uno o más trastornos autoinmunitarios, enfermedad por radiación, o para prevenir o tratar la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) o el rechazo del trasplante en un sujeto que se somete a una cirugía de trasplante.

Los linfocitos T deficientes en TCR descritos en el presente documento, las poblaciones aisladas de los mismos o las composiciones terapéuticas que los comprenden son útiles para alterar el rechazo autoinmunitario o el trasplante porque estas células efectoras pueden crecer en TGF- β durante el desarrollo y se diferenciarán para convertirse en linfocitos T reguladores inducidos. En un ejemplo, el TCR no funcional se utiliza para dar a estos linfocitos T reguladores inducidos la especificidad funcional que se requiere para que realicen su función inhibidora en el sitio del tejido de la enfermedad. Por lo tanto, un gran número de linfocitos T reguladores específicos de antígeno se cultivan para su uso en pacientes. La expresión de FoxP3, que es esencial para la diferenciación de los linfocitos T reguladores, se puede analizar mediante citometría de flujo, y la inhibición funcional de la proliferación de linfocitos T mediante estos linfocitos T reguladores se puede analizar examinando las disminuciones en la proliferación de linfocitos T después de la estimulación con anti-CD3 tras el cultivo conjunto.

Otro ejemplo se dirige al uso de linfocitos T deficientes en TCR descritos en el presente documento, poblaciones aisladas de los mismos, o composiciones terapéuticas que comprenden los mismos para la prevención o el tratamiento de la enfermedad por radiación. Un desafío después del tratamiento o exposición con radiación (por ejemplo, exposición a una bomba sucia, fuga de radiación) u otra condición que elimina las células de la médula ósea (ciertas terapias con fármacos) es reconstituir el sistema hematopoyético. En pacientes sometidos a un trasplante de médula ósea, el recuento absoluto de linfocitos en el día 15 posterior al trasplante se correlaciona con un resultado exitoso. Los pacientes con un alto recuento de linfocitos se reconstituyen bien, por lo que es importante tener una buena reconstitución de linfocitos. El motivo de este efecto no está claro, pero puede deberse a la protección de los linfocitos de la infección y/o la producción de factores de crecimiento que favorecen la reconstitución hematopoyética.

En este ejemplo, los linfocitos T deficientes en TCR descritos en el presente documento, las poblaciones aisladas de los mismos, o las composiciones terapéuticas que comprenden las mismas dan lugar a la producción de un gran número de linfocitos T que no son capaces de responder a los antígenos MHC alogénicos. Por lo tanto, estos linfocitos T se pueden utilizar para reconstituir a las personas y ofrecer protección contra las infecciones, lo que lleva a una autorreconstitución más rápida de las personas que sufren de ablación parcial o total de la médula ósea debido a la exposición a la radiación. En el caso de una exposición catastrófica o inesperada a altas dosis de radiación, los linfocitos T deficientes en TCR descritos en el presente documento que tienen otro receptor funcional, poblaciones aisladas de los mismos o composiciones terapéuticas que comprenden los mismos se pueden infundir rápidamente en los pacientes para ofrecer cierta reconstitución de su respuesta inmunitaria y la producción del factor de crecimiento durante días a semanas hasta que sus propias células hematopoyéticas se hayan reconstituido, o hasta que la persona haya sido tratada con una fuente adicional de células madre hematopoyéticas (por ejemplo, un trasplante de médula ósea).

Un experto entendería cómo tratar el cáncer, infección, rechazo de trasplantes, uno o más trastornos autoinmunitarios, enfermedad por radiación o GVHD según su experiencia con la utilización de otros tipos de linfocitos T.

Además de los linfocitos T quNKG2D+ deficientes en TCR descritos en el presente documento, se contempla que los linfocitos T deficientes en TCR se pueden modificar o desarrollar para expresar otros receptores funcionales útiles en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer o la infección como se describió anteriormente. En resumen, los métodos de tratamiento contemplan la utilización de linfocitos T deficientes en TCR que expresan receptores funcionales no-TCR, tales como quNKG2D, dominios Fv quiméricos, NKG2D, o cualquier otro receptor para iniciar señales a los linfocitos T, creando así linfocitos T efectores potentes y específicos. Un experto en la materia puede seleccionar el receptor apropiado para ser expresado por el linfocito T deficiente en TCR basándose en la enfermedad a tratar. Por ejemplo, los receptores que se pueden expresar mediante los linfocitos T deficientes en TCR para el tratamiento del cáncer incluirían cualquier receptor que se une a un ligando que se haya identificado en las células cancerosas. Dichos receptores incluyen, pero no se limitan a, NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F,

LLT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), DNAM-1 y NKp80.

En otro ejemplo, dichos receptores incluyen, pero sin limitación a, receptores quiméricos que comprenden un dominio de unión a ligando obtenido de NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LLT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), DNAM-1 y NKp80, o un anticuerpo antitumoral tal como anti-Her2neu o anti-EGFR, y un dominio de señalización obtenido de CD3zeta, Dap10, CD28, 41BB y CD40L.

En un ejemplo adicional, el receptor quimérico se une a MIC-A, MIC-B, Her2neu, EGFR, mesotelina, CD38, CD20, CD19, PSA, MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19, MUC20, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, RON, o uno o más miembros de la familia ULBP/RAET1, incluyendo ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 y ULBP6.

La presente descripción también abarca los linfocitos T deficientes en TCR que expresan un receptor asociado a patógenos no TCR y la utilización de los linfocitos T deficientes en TCR que expresan el receptor de patógenos para tratar o prevenir enfermedades infecciosas. En este ejemplo, el receptor no TCR se une al antígeno del virus o al antígeno inducido por el virus que se encuentra en la superficie de una célula infectada. La infección que se debe prevenir o tratar, por ejemplo, puede ser causada por un virus, una bacteria, un protozoo o un parásito. Los virus que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, HCMV, EBV, hepatitis tipo A, hepatitis tipo B (HBV), hepatitis tipo C (HBV), virus del ébola, VSV, gripe, varicela, adenovirus, herpes simple tipo I (HSV-1), herpes simple tipo 2 (HSV-2), peste bovina, rinovirus, virus ECHO, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, citomegalovirus (CMV), equinovirus, arbovirus, hantavirus, virus de Cocksackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la poliomielitis y/o virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 o tipo 2 (VIH-1, VIH-2). Las infecciones no virales que se pueden tratar con los linfocitos T deficientes en TCR incluyen, pero no se limitan a, *Staphylococcus* sp. infeccioso, *Enterococcus* sp., *Bacillus anthracis*, *Lactobacillus* sp., *Listeria* sp., *Corynebacterium diphtheriae*, *Nocardia* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Gardnerella* sp., *Streptomyces* sp., *Thermoactinomyces vulgaris*, *Treponema* sp., *Campylobacter* sp., *Raeruginosa* sp., *Legionella* sp., *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *F. meningosepticum*, *F. odoratum*, *Brucella* sp., *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *Edwardsiella*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Streptobacillus*, *R. fickettsii*, *C. psittaci*, *C. trachomatis*, *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. laprae*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. lepraemurium*, trypanosomes, Chlamydia, o rickettsia.

La eficacia de las composiciones de la presente invención se puede demostrar en el sistema modelo *in vivo* más apropiado que depende del tipo de producto farmacéutico que se está desarrollando. La literatura médica proporciona una divulgación detallada sobre las ventajas y usos de una amplia variedad de dichos modelos. Por ejemplo, hay muchos tipos diferentes de modelos de cáncer que se utilizan de forma rutinaria para examinar la actividad farmacológica de los fármacos contra el cáncer, como los modelos de ratón con xenoinjerto (por ejemplo, Mattern, J. et al. 1988. Cancer Metastasis Rev. 7:263-284; Macor, P. et al. 2008. Curr. Pharm. Des. 14:2023-2039) o incluso la inhibición del crecimiento de células tumorales *in vitro*. En el caso de la GVHD, hay modelos en ratones con GVHD aguda (por ejemplo, He, S. et al. 2008. J. Immunol. 181:7581-7592) y GVHD crónica (por ejemplo, Xiao, Z.Y. et al. 2007. Life Sci. 81:1403-1410).

Una vez que se ha demostrado que las composiciones de la presente invención son eficaces *in vivo* en animales, los estudios clínicos pueden diseñarse basándose en las dosis que se muestran seguras y eficaces en animales. Un experto en la materia puede diseñar dichos estudios clínicos utilizando protocolos estándar como se describe en libros de texto como Spilker (2000). Guide to Clinical Trials. Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia).

Administración

En una realización de la invención, los linfocitos T deficientes en TCR deben administrarse a un sujeto receptor en una cantidad de entre aproximadamente 10^6 a 10^{11} células. En una realización preferida de la invención, los linfocitos T deficientes en TCR deben administrarse a un sujeto receptor en una cantidad de entre 10^8 a 10^9 células. En una realización preferida de la invención, los linfocitos T deficientes en TCR deben administrarse a un sujeto receptor con una frecuencia de una vez cada veintiséis semanas o menos, como una vez cada dieciséis semanas o menos, una vez cada ocho semanas o menos, o una vez cada cuatro semanas o menos.

Estos valores proporcionan una guía general del intervalo de linfocitos T transducidos que utilizará el profesional al optimizar el método de la presente descripción. La enumeración en el presente documento de tales intervalos no excluye de ninguna manera la utilización de una cantidad mayor o menor de un componente, como podría estar justificado en una aplicación particular. Por ejemplo, la dosis real y el programa pueden variar dependiendo de si las composiciones se administran en combinación con otras composiciones farmacéuticas, o dependiendo de las diferencias interindividuales en la farmacocinética, la disposición de los fármacos y el metabolismo. Un experto en la materia puede realizar fácilmente los ajustes necesarios de acuerdo con las exigencias de la situación particular.

Una persona experta en la materia sería capaz de determinar una dosis y una frecuencia de administración eficaz basada en las enseñanzas de la materia o mediante experimentación rutinaria, guiada, por ejemplo, por la divulgación en el presente documento y las enseñanzas en Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., &

Parker, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Nueva York: McGraw-Hill; Howland, R. D., Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe, P. C., & Mycek, M. J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins; y Golan, D. E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Filadelfia, Pa., [etc.]: Lippincott Williams & Wilkins. El programa de dosificación se puede basar en terapias basadas en células bien establecidas (véase, por ejemplo, Topalian y Rosenberg (1987) Acta Haematol. 78 Suppl 1:75-6; Patente de EE.UU. n.º 4.690.915.) o se puede emplear una estrategia alternativa de infusión continua.

En otra realización de la invención, los linfocitos T deficientes en TCR deben administrarse a un sujeto en una formulación farmacéutica.

En una realización de la invención, los linfocitos T deficientes en TCR pueden ser opcionalmente para administración en combinación con uno o más agentes activos. Dichos agentes activos incluyen agentes analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios, antibióticos, antivirales y anticitocinas. Los agentes activos incluyen agonistas, antagonistas y moduladores de TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IFN- α , IFN- γ , BAFF, CXCL13, IP-10, VEGF, EPO, EGF, HRG, Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), Hecpídina, incluyendo anticuerpos reactivos contra cualquiera de los anteriores, y anticuerpos reactivos contra cualquiera de sus receptores. Los agentes activos también incluyen ácidos 2-arilpropiónicos, Aceclofenaco, Acemetacina, Ácido acetilsalicílico (aspirina), Alclofenaco, Alminoprofeno, Amoxiprin, Ampirona, Ácidos arilalcanoicos, Azapropazona, Benorilato/Benorilato, Benoxaprofeno, Bromfenaco, Carprofeno, Celecoxib, Salicilato de magnesio colino, Clofezona, Inhibidores de COX-2, Dexibuprofeno, Dextetopropeno, Diclofenaco, Diflunisal, Droxicam, Etenzamida, Etodolac, Etoricoxib, Faislamina, ácidos fenámicos, Fenbufen, Fenoprofeno, Ácido flufenámico, Flunoxaprofeno, Flurbiprofeno, Ibuprofeno, Ibuproxam, Indometacina, Indoprofeno, Kebuzone, Cetoprofeno, Cetorolac, Lornoxicam, Loxoprofeno, Lumiracoxib, Salicilato de magnesio, Ácido meclofenámico, Ácido mefenámico, Meloxicam, Metamizol, Salicilato de metilo, Mofebutazona, Nabumetona, Naproxeno, Ácidos N-Arilantranílicos, Factor de crecimiento nervioso (NGF), Oxametacina, Oxaprozina, Oxicams, Oxifenbutazona, Parecoxib, Fenazona, Fenilbutazona, Fenilbutazona, Piroxicam, Pirprofeno, profenos, Proglumetacina, Derivados de pirazolidina, Rofecoxib, Salicilato de salicilo, Salicilamida, Salicilatos, Sulfinpirazona, Sulindac, Suprofeno, Tenoxicam, Ácido tiaprofénico, Ácido tolfenámico, Tolmetin, y Valdecocib.

Los antibióticos incluyen Amikacina, Aminoglucósidos, Amoxicilina, Ampicilina, Ansamincinas, Arsfenamina, Azitromicina, Azlocilina, Aztreonam, Bacitracina, Carbacefem, Carbapenems, Carbenicilina, Cefaclor, Cefadroxilo, Cefalexina, Cefalotina, Cefalotina, Cefamandol, Cefazolina, Cefdinir, Cefditoren, Cefepima, Cefixima, cefoperazona, Cefotaxima, Cefoxitina, Cefpodoxima, Cefprozil, Ceftazidima, Ceftibuten, Ceftizoxime, Ceftobiprol, Ceftriaxona, Cefuroxima, Cefalosporinas, Cloranfenicol, Cilastatina, Ciprofloxacina, Claritromicina, Clindamicina, Cloxacilina, Colistina, Co-trimoxazol, Dalfopristina, Demeclociclina, Dicloxacilina, Diritromicina, Doripenem, Doxiciclina, Enoxacina, Ertapenem, Eritromicina, Etambutol, Flucloxacilina, Fosfomicina, Furazolidona, Ácido fusídico, Gatifloxacina, Geldanamycin, Gentamicina, Glucopéptidos, Herbimicina, Imipenem, Isoniacida, Kanamicina, Levofloxacina, Lincomicina, Linezolid, Lomefloxacina, Loracarbef, Macrólidos, Mafenida, Meropenem, Meticilina, Metronidazol, Mezlocilina, Minociclina, Monobactam, Moxifloxacina, Mupirocina, Nafcilina, Neomicina, Netilmicina, Nitrofurantoina, Norfloxacina, Ofloxacina, Oxacilina, Oxitetraciclina, Paromomicina, Penicilina, Penicilinas, Piperacilina, Platensimicina, Polimixina B, Polipéptidos, Prontosil, Pirazinamida, Quinolones, Quinupristina, Rifampicina, Rifampina, Roxitromicina, Espectinomycin, Estreptomycin, Sulfacetamida, Sulfametizol, Sulfanilimida, Sulfasalazina, Sulfisoxazol, Sulfonamidas, Teicoplanina, Telitromicina, Tetraciclina, Tetraciclina, Ticarcilina, Tinidazol, Tobramicina, Trimetoprim, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Troleandomicina, Trovafloxacina y Vancomicina.

Los agentes activos también incluyen la Aldosterona, Beclometasona, Betametasona, Corticoesteroides, Cortisol, Acetato de cortisona, Acetato de desoxicorticosterona, Dexametasona, Acetato de fludrocortisona, Glucocorticoides, Hidrocortisona, Metilprednisolona, Prednisolona, Prednisona, Esteroides y Triamcinolona. También se contempla cualquier combinación adecuada de estos agentes activos.

Un "excipiente farmacéutico" o un "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un vehículo, usualmente un líquido, donde se formula un agente terapéutico activo. En una realización de la invención, el agente terapéutico activo es una población de linfocitos T deficientes en TCR. En una realización de la invención, el agente terapéutico activo es una población de linfocitos T deficientes en TCR que expresan un receptor funcional, no TCR. El excipiente generalmente no proporciona ninguna actividad farmacológica a la formulación, aunque puede proporcionar estabilidad química y/o biológica. Las formulaciones ejemplares se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed., Grennaro, A., Ed., 1995.

Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción que son fisiológicamente compatibles. En una realización, el vehículo es adecuado para la administración parenteral. Como alternativa, el vehículo puede ser adecuado para la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o sublingual. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea

incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

En una realización particularmente preferida de la invención, los vehículos apropiados incluyen, pero no se limitan a, solución salina equilibrada de Hank (HBSS, de sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato (PBS, de sus siglas en inglés), o cualquier medio de congelación que tenga, por ejemplo, DMSO al 10 % y suero humano al 90 %.

Las composiciones farmacéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La invención contempla que la composición farmacéutica esté presente en forma liofilizada. La composición se puede formular como una solución. El vehículo puede ser un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua.

Para cada una de las realizaciones enumeradas, los compuestos se pueden administrar en una variedad de formas de dosificación. Se contempla cualquier forma de dosificación biológicamente aceptable conocida por personas normalmente expertas en la materia, y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de dichas formas de dosificación incluyen, sin limitación, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, inyectables (incluyendo subcutáneos, intramuscular, intravenosos, e intradérmicos), infusiones, y combinaciones de los mismos.

La descripción anterior de varias realizaciones ilustradas de la invención no pretende ser exhaustiva o limitar la invención a la forma precisa desvelada.

En general, en las siguientes reivindicaciones, los términos utilizados no deben interpretarse para limitar la invención a las realizaciones específicas desveladas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

La invención puede ponerse en práctica de formas distintas a las descritas particularmente en la descripción y ejemplos anteriores. Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la invención a la luz de las enseñanzas anteriores y, por lo tanto, están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ciertas enseñanzas relacionadas con la producción de linfocitos T que expresan receptores quiméricos y métodos de utilización de los mismos se desvelaron en la publicación de la patente de EE.UU. n.º US 2010/0029749, publicada el 4 de febrero de 2010.

Ciertas secuencias polinucleotídicas útiles en la producción de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T de la invención se desvelan en el listado de secuencias que acompaña a esta solicitud de patente, y la divulgación de dicho listado de secuencias se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de cómo realizar y utilizar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que se considera como la invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etc.) pero se deben permitir algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados; y la presión está en o cerca de la atmosférica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T (TCR)

Los minigenes se codifican en un plásmido de expresión de retrovirus (por ejemplo, pFB-neo o pSFG) que contiene las secuencias LTR en 5' y 3'. Los plásmidos se empaquetan en una línea celular de empaquetamiento retroviral, como PT67 o PG13, y las partículas virales se recolectan una vez que las células de empaquetamiento han crecido hasta la confluencia. Luego, los linfocitos T se activan con PHA, AcM anti-CD3 o anti-CD3/28 durante 1 a 3 días en medio completo (o medio libre de suero) más rIL-2 (25 U/ml), y los linfocitos T se transducen mediante inoculación por centrifugación a 32 °C en presencia de retronectina o polibreno. Después de descansar durante unas 5 a 7 horas, las células se lavan y se colocan en placas en medio fresco más IL-2 durante 2 a 7 días. Las células se cuentan periódicamente para evitar una concentración celular excesiva (es decir, $> 2 \times 10^6$ células/ml) y se vuelven a colocar en placas a 7×10^5 células/ml. El medio de selección para eliminar los linfocitos T no transducidos se utiliza opcionalmente después de 2 días durante un período de 3 a 5 días. Se recolectan las células vivas con un gradiente de Lymphoprep™ (Sentinel, Milán, Italia) y se expanden adicionalmente durante 1 a 3 días.

Después de la incubación, se analizan las células para determinar la expresión y la función del TCR. La expresión del receptor funcional no TCR también se puede analizar en este momento, si es apropiado. La citometría de flujo se utiliza para probar la expresión de TCR/CD3 utilizando anticuerpos marcados con fluorocromo. Las células vivas se tiñen con anticuerpos contra CD5, CD8, y CD4, en combinación con un anticuerpo contra CD3ε, TCRα, TCRβ, TCRγ, o TCRδ. Si se utiliza la expresión de cualquiera de los genes CD3 o TCR, la expresión de las proteínas TCR y las proteínas CD3 se debe reducir severamente en comparación con los linfocitos T tratados con el vector de control. Los anticuerpos de control de isotipos se utilizan para controlar la fluorescencia de fondo. Para identificar los

linfocitos T, las células se clasifican en CD5, luego se determina la expresión de CD4, CD8, CD3 y TCR. Se utilizan múltiples muestras para cada tratamiento y se utiliza la compensación apropiada de los espectros de emisión de fluorocromo. La expresión de otro receptor (por ejemplo, quNKG2D) se determina utilizando anticuerpos específicos y citometría de flujo, como se describió anteriormente en la materia (Zhang, T. et al., (2006) Cancer Res., 66(11) 5927-5933; Barber, A. et al., (2007) Cancer Res., 67(10):5003-5008).

Para probar la deficiencia funcional del TCR, se utiliza la estimulación anti-CD3 de las células efectoras al final del cultivo para medir la producción de interferón (IFN)-gamma después de 24 horas. Los linfocitos T (2×10^5) se cultivan con AcM anti-CD3 (OKT3) solubles en medio completo. Después de 24 horas, el medio condicionado libre de células se recoge y se analiza mediante ELISA para IFN-gamma. Los cambios en la expresión o función de TCR deben reflejarse en una producción reducida de IFN-gamma.

Para probar la función del no-TCR funcional, se utiliza la producción de citocinas específicas mediante linfocitos T incubados con células tumorales que expresan o no su ligando específico. Por ejemplo, para probar la función de quNKG2D, se incuban 10^5 linfocitos T con 10^5 células tumorales P815-MICA (ligando+), 10^5 células P815 (ligando-), 10^5 células RPMI8226 (ligando+) o linfocitos T solo. Después de 24 horas, se recoge el medio acondicionado libre de células y se mide el IFN-g mediante ELISA. Los linfocitos T NKG2D quiméricos producen IFN- γ después del cultivo con células tumorales que expresan el ligando (Zhang, T. et al., (2006) Cancer Res., 66(11) 5927-5933; Barber, A. et al., (2007) Cancer Res., 67(10):5003-5008). También es posible probar la citotoxicidad celular contra las células tumorales de ligando+, como se describió anteriormente en la materia (Zhang, T. et al., (2006) Cancer Res., 66(11) 5927-5933). La especificidad se muestra utilizando células tumorales de ligando- o AcM de bloqueo de receptores específicos.

Ejemplo 2: Producción de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T (TCR) que expresan quNKG2D

En este ejemplo, se realiza la expresión simultánea de un receptor quNKG2D y la inhibición de la expresión de TCR endógena. En este ejemplo, se utiliza un receptor quNKG2D murino, compuesto de NKG2D en combinación con un CD3-zeta unido en el extremo N. El receptor quNKG2D se genera y expresa en linfocitos T murinos. NKG2D es una proteína de tipo II, en la cual el extremo N está ubicado intracelularmente (Raulet (2003) Nat. Rev. Immunol. 3: 781-790), mientras que la cadena CD3-zeta es una proteína de tipo I con el extremo C en el citoplasma (Weissman, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9709-9713). Para generar una proteína de fusión NKG2D-CD3-zeta quimérica, se coloca un codón de iniciación ATG delante de la secuencia de codificación para la región citoplásmica de la cadena CD3-zeta (sin un codón de parada TAA) seguido de un gen NKG2D de tipo silvestre. Tras la expresión, la orientación de la porción CD3-zeta se invierte dentro de las células. Los dominios extracelulares y transmembrana proceden de NKG2D. También se construye un segundo gen quimérico que codifica el gen Dap10 seguido de un fragmento que codifica el dominio citoplasmático CD3-zeta. La Figura 1 presenta las estructuras de los receptores quiméricos y de tipo silvestre.

Un ARNhc está unido operativamente en un vector lentiviral con el receptor quNKG2D. Para lograr la expresión de ambos genes, el ARNhc es dirigido por un promotor U6 y el receptor quNKG2D por un promotor PGK. Las PBMC humanas primarias se aíslan de donantes sanos y se activan con dosis bajas de anti-CD3 soluble y rhuIL-2 25U/ml durante 48 horas. Aunque no es necesario activar los linfocitos T para la transducción lentiviral, la transducción funcionará de manera más eficaz y permitirá que las células continúen expandiéndose en la IL-2. Las células activadas se lavan y se transducen utilizando una centrifugación de 1 h a 30 °C, seguido de un período de reposo durante 7 h. Las células se lavan y se cultivan en 25 U/ml de IL-2 durante 3 a 7 días para permitir la expansión de las células efectoras de una manera similar a la de la utilización de las células *in vivo*. La expresión de TCR $\alpha\beta$, CD3 y NKG2D se evalúa mediante citometría de flujo y PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR). El número de linfocitos T CD4+ y CD8+ se determina mediante citometría de flujo. El número total de células y el porcentaje de linfocitos T deficientes y que expresan el complejo TCR se determinan mediante citometría de flujo. Estos se comparan con las PBMC que se transducen con los genes ARNhc o quNKG2D solos (como controles). Las células transducidas de solo vector también se incluyen como controles.

Se anticipa que aquellas células con poca o ninguna expresión de TCR en la superficie celular expresarán mayores cantidades de NKG2D en la superficie celular debido a la coexpresión del receptor quNKG2D.

Como alternativa, la transducción puede ocurrir con dos virus al mismo tiempo, uno con la construcción de ARNhc y otro con el receptor quNKG2D. Se utiliza una mayor cantidad del virus quNKG2D para garantizar una alta expresión de quNKG2D en aquellos linfocitos T que carecen de expresión de TCR. Los linfocitos T TCR+ que pueden permanecer se eliminan para obtener linfocitos T TCR-, quNKG2D+.

Después de la transducción y expansión viral, los linfocitos TCR+ y TCR- se separan mediante AcM con perlas magnéticas sobre columnas Miltenyi. La verificación de la expresión de quNKG2D se realiza mediante QRT-PCR utilizando cebadores específicos para el receptor quNKG2D.

Para determinar si los linfocitos T perdieron la función de TCR y retuvieron la función de quNKG2D, los linfocitos T

transducidos o de control se cultivan con PBMC alogénicas tratadas con mitomicina C o PBMC singénicas. Los linfocitos T están precargados con CFSE, que es un colorante permeable a las células que se divide por igual entre las células hijas después de la división. La extensión de la división celular se puede determinar fácilmente mediante citometría de flujo.

Para determinar si la construcción de ARNhc puede inhibir la función de TCR y permitir la función del receptor quNKG2D, los linfocitos T transducidos se cultivan con PBMC alogénicas tratadas con mitomicina C, PBMC singénicas o células tumorales: P815-MICA (un tumor murino que expresa MICA humana, un ligando para NKG2D), P815, A2008 (una célula tumoral de ovario humano, ligando+ NKG2D) y U266 (una línea celular de mieloma humano, ligando+ NKG2D). Después de 48 horas, se recogieron los sobrenadantes libres de células y la cantidad de IL-2 y IFN- γ producida se cuantificará mediante ELISA. Los linfocitos T solo se utilizan como control negativo.

Ejemplo 3: Administración in vivo de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T (TCR) que expresan quNKG2D

En este ejemplo, los linfocitos T deficientes en TCR, que expresan un receptor quNKG2D murino como se produce en el Ejemplo 2, se administran a ratones para evaluar el potencial terapéutico *in vivo* de dichos linfocitos T en ciertos cánceres. Los linfocitos T portadores de NKG2D quiméricos (10^6) se inyectan conjuntamente con células tumorales RMA/Rae-1 β (10^5) por vía subcutánea a ratones C57BL/6. Los ratones quiméricos que portan NKG2D y tratados con linfocitos T deficientes en TCR que están libres de tumores o tienen un crecimiento inhibido por tumores de tumores RMA/Rae-1 β , después de 30 días reflejan la actividad terapéutica contra el cáncer en estos ratones.

En un segundo y más estricto modelo, los linfocitos T transducidos (10^7) se transfieren de manera adoptiva i.v. en ratones B6 un día antes de la inoculación del tumor RMA/Rae-1 β s.c. en el flanco derecho. La supresión del crecimiento de los tumores RMA/Rae-1 β (s.c.) en comparación con los linfocitos T modificados con vector de control refleja la actividad terapéutica contra el cáncer en estos ratones. En cuanto a la toxicidad del tratamiento con linfocitos T modificados con NKG2D quiméricos, se anticipa que los animales no mostrarán ninguna evidencia manifiesta de daño inflamatorio (es decir, cabello rizado, jorobado o diarrea, etc.) cuando se traten con linfocitos T que portan NKG2D quiméricos, lo que sería un reflejo de la falta de toxicidad manifiesta.

En un modelo más riguroso de tumores ováricos establecidos (ID8), los linfocitos T quNKG2D transducidos (5×10^6 linfocitos T, i.p.) se inyectan en ratones portadores de tumores durante 5 semanas. Los ratones se inyectan adicionalmente con linfocitos T a las 7 y 9 semanas después del desafío tumoral. En estas condiciones, los ratones tratados con linfocitos T quNKG2D permanecerán libres de tumores durante más de 250 días, mientras que los ratones tratados en un programa similar con linfocitos T de control morirán por el crecimiento del tumor dentro de los 100 días. En cuanto a la toxicidad del tratamiento con linfocitos T modificados con NKG2D quiméricos, se anticipa que los animales no mostrarán ninguna evidencia manifiesta de daño inflamatorio (es decir, cabello rizado, jorobado o diarrea, etc.) cuando se traten con linfocitos T que portan NKG2D quiméricos, lo que sería un reflejo de la falta de toxicidad manifiesta.

En un modelo de mieloma múltiple, los ratones que portan células tumorales 5T33MM se tratan el día 12 después de la infusión de células tumorales con linfocitos T quNKG2D (5×10^6 células, i.v.). Este tratamiento dará como resultado un aumento en la vida útil de todos los ratones y aproximadamente la mitad de estos ratones serán sobrevivientes a largo plazo y sin tumores. Los ratones tratados con linfocitos T de control sucumbirán a sus tumores dentro de los 30 días. No se observará evidencia manifiesta de toxicidad debido al tratamiento con los linfocitos T quNKG2D.

Debido a que el sistema inmunitario puede seleccionar variantes de tumores, las inmunoterapias más eficaces contra el cáncer probablemente serán aquellas que inducen inmunidad contra múltiples antígenos tumorales. En un tercer experimento, se prueba si el tratamiento con linfocitos T que portan NKG2D quiméricos inducirá la inmunidad del hospedador contra células tumorales de tipo silvestre. Los ratones que se tratan con linfocitos T que portan NKG2D quimérico y células tumorales 5T33MM, y están libres de tumor después de 80 días, se estimulan con células tumorales 5T33MM. Los ratones supervivientes libres de tumor son resistentes a un desafío posterior de células 5T33MM (3×10^5), en comparación con los ratones de control sin tratamiento previo que sucumben al tumor en un promedio de 27 días. Sin embargo, los ratones supervivientes libres de tumores no son resistentes a un desafío posterior de las células tumorales RMA-Rae1 (3×10^5) y sucumben al tumor en un lapso de tiempo similar al de los ratones sin tratamiento previo (20 días). Esto indica que la transferencia adoptiva de linfocitos T que portan NKG2D quiméricos permitirá a los hospedadores generar memoria de linfocitos T específica de tumor.

En esta invención, se proporcionan cuatro clases de moléculas inhibitoras de TCR (TIM) que afectan la función de los linfocitos T. La Tabla 2 es un resumen del efecto de 19 TIM diferentes en la función efectora de los linfocitos T, ya sea en respuesta a la estimulación de anti-CD3 soluble (OKT3 (200 ng/ml)) (CD3), o el cultivo con PBMC alogénicas (Allo). Las designaciones a la izquierda se refieren a la clase de TIM. Los valores numéricos indican el porcentaje de reducción en la inhibición de TCR en relación con el control de linfocitos T transducidos con el vector pFB. NI: no inhibición. NH: no hecho.

Tabla 2. Resumen del efecto de las moléculas inhibitoras de TCR (TIM) sobre la función de los linfocitos T.

Clase de TIM		CD3	Allo
ARNhc	TIM1*	22,6	NH
	TIM2*	NH	NH
	TIM3*	14,9	NH
	TIM4**	NI	NH
Proteínas truncadas	TIM5***	NI	NI
	TIM6**	NI	56
	TIM7**	44	90
	TIM8**	58	100
Proteínas de fusión KIR	TIM9**	32,7	NH
	TIM10**	28	NH
	TLM11**	32	NH
	TIM12**	-12	40
	TIM13**	NH	-26
Mutaciones	TIM14**	NI	NH
	TIM15**	-6	35
	TIM16**	23,2	27
	TIM17**	8,2	-9
	TIM18*	-28	21
	TIM19**	33,9	8

Ejemplo comparativo 4:

- 5 *Producción de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T (TCR) utilizando ARNhc que se dirigen a los ácidos nucleicos que codifican CD3-epsilon o CD3-zeta*

En este ejemplo, la expresión de TCR endógena se inhibió utilizando secuencias de ARNhc que se dirigen a los ácidos nucleicos que codifican CD3-epsilon o CD3-zeta.

- 10 Se compraron secuencias de ARNhc clonadas en el vector retroviral pSM2c (Open Biosystems), con expresión controlada por el promotor U6. Estas construcciones de ARNhc se utilizaron para bloquear la expresión de las proteínas CD3-epsilon y/o CD3-zeta, de manera que el linfocito T ya no produjo uno de los componentes clave del complejo TCR. Por consiguiente, el complejo TCR se desestabilizó y se evitó la expresión en la superficie celular de un TCR funcional, lo que dio como resultado una función reducida de los linfocitos T a través del complejo TCR. La secuencia de ARNhc contra CD3-epsilon o CD3-zeta se describe en la Tabla 1, que corresponde a las SEQ ID NO: 9-26 y 68-71, respectivamente.

- 20 Para determinar si los ARNhc modificaron la función de TCR, la producción de IFN-gamma se midió en respuesta a (i) estimulación con anti-CD3 soluble (CD3) o (ii) en respuesta al cultivo con PBMC alogénicas (Allo). En particular, los linfocitos T tratados con TIM1 o TIM3 tuvieron una reducción del 22,6 % o 14,9 % en la inhibición de TCR, respectivamente, después de la estimulación con 200 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3. Véase la tabla 2 *supra*.

- 25 **Ejemplo 4:** *Producción de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T (TCR) utilizando un inhibidor negativo dominante de CD3-zeta*

- 30 En este ejemplo, la sobreexpresión de una proteína inhibidora negativa dominante, es decir, un TIM, interrumpió la expresión y función de TCR. La expresión de TCR endógena se inhibió utilizando una proteína inhibidora negativa dominante que comprende CD3-zeta alterada para incluir una señal inhibidora de KIR2DL1, y los linfocitos T resultantes no se activaron en respuesta a la estimulación de TCR.

- 35 Las construcciones minigénicas que incorporaron todo, o parte de, un polinucleótido modificado que codifica CD3-zeta se generaron mediante PCR utilizando plantillas de ADN de CD3-zeta y KIR2DL1, correspondientes a la SEQ ID NO: 64 y la SEQ ID NO: 66, respectivamente, compradas en Open Biosystems (Huntsville, AL). Todas las PCR se realizaron utilizando la Fusión de polimerasa de ADN de alta fidelidad (New England Biolabs, Ipswich, MA) y los cebadores se sintetizaron mediante tecnologías integradas de ADN (Coralville, IA). Utilizando los protocolos establecidos, cada construcción se clonó en el vector retroviral pFB-neo (Stratagene), con expresión controlada por la LTR en 5'. Las construcciones resultantes se seleccionaron y confirmaron su precisión mediante secuenciación y se analizaron mediante DNA Dynamo (Blue Tractor Software Ltd). Las secuencias de ADN y sus secuencias de proteínas predichas corresponden a SEQ ID NOS: 68-101.

- 45 Las TIM se expresaron en linfocitos T primarios utilizando un sistema de expresión retroviral. Se utilizaron dos líneas celulares de empaquetamiento diferentes para producir virus con un título bajo o alto. El virus de bajo título se produjo mediante células GP2-293T que se transfectaron transitoriamente con el plásmido de empaquetamiento y un

plásmido de envoltura. Después de 72 horas, se recogió el sobrenadante vírico y se midieron los títulos mediante la infección de células NIH-3T3 después de la selección con G418. Los títulos de los virus producidos por este sistema estaban entre 5×10^5 y 1×10^7 UFC/ml. Para producir virus de alto título, el sistema GP2-293T produjo virus para transducir células de empaquetamiento PT67. Las células PT67 infectadas con partículas virales se seleccionaron bajo tratamiento con G418 durante 5 días. Las células PT67 que expresan TIM se expandieron y se utilizaron para la producción de virus. 72 horas después de que las células alcanzaron la confluencia, se recogió el sobrenadante vírico y se midieron los títulos en NIH-3T3. Los títulos de los virus obtenidos por este sistema estaban en el intervalo de 7×10^7 y 2×10^8 UFC/ml.

Para transducir linfocitos T humanos, se aislaron PBMC humanas primarias de donantes sanos y se activaron con 40 ng/ml de anti-CD3 soluble y 50 U/ml de rhuIL-2 durante 72 horas. Los linfocitos T activados se lavaron y se transdujeron con retrovirus producidos por virus de título bajo o alto utilizando una infección por centrifugación de 1 hora a 32 °C, seguida de un período de descanso de 6 horas. Las células se lavaron y se cultivaron en 50 U/ml de IL-2 durante 48 horas, y luego se sometieron a selección durante 3 días. Después de la selección, las células vivas se aislaron utilizando Lymphoprep (Mediatech), y las células efectoras se expandieron en 50 U/ml de IL-2 durante 48 horas cuando las células se utilizaron para ensayos funcionales. La expresión de células endógenas de CD3-épsilon y CD3-zeta en células transducidas con ARNhc, y la disminución en la expresión de los genes por ARNhc, se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). En resumen, el ARN se extrajo de los linfocitos T transducidos y se transcribieron de manera inversa 0,5-1 ug del ARN total utilizando el kit de transcripción QuantiTect Rev. (Qiagen). El ADNc resultante se utilizó con SYBR verde (Applied Biosystems) para el análisis de qRT-PCR, y los datos se normalizaron a los niveles de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los cambios en la expresión de la superficie celular se analizaron utilizando anticuerpos específicos para CD3, CD8, CD4 y CD5, y no se observaron diferencias en la expresión de estas moléculas de la superficie celular en linfocitos T que expresan TIM en comparación con el vector de control.

Para determinar si la reducción en la expresión de TCR con cada construcción de ARNhc o minigen (que eliminó o interrumpió el TCR en la superficie celular) fue suficiente para prevenir la activación del linfocito T a la estimulación de TCR, los linfocitos T se analizaron para: (1) supervivencia celular *in vitro*; y (2) la producción de citocinas en respuesta a PBMC alogénicas y/o AcM anti-CD3.

Para probar la supervivencia celular, los linfocitos T transducidos se propagaron en medio RPMI completo con rhuIL-2 (50 U/ml). Las células se colocaron en placas a densidades similares al comienzo del cultivo y se extrajo una muestra para el recuento y la viabilidad de las células diariamente durante 7 o más días. No se observó ninguna diferencia en el crecimiento de los linfocitos T que expresan TIM en comparación con los linfocitos T que expresan el vector de control correspondiente. Para determinar si los linfocitos T expresaron suficiente TCR para inducir una respuesta contra células alogénicas, los linfocitos T transducidos o de control se cultivaron con PBMC alogénicas o autólogas en una proporción de 4:1. Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes libres de células y la cantidad de IFN- γ producida se cuantificó mediante ELISA. Los linfocitos T solos, incluidas las PBMC y las células transducidas, se utilizaron como controles negativos. Entre las moléculas inhibitoras de TCR analizadas, se identificaron dos minigenes (TIM7 y TIM8) que fueron capaces de reducir significativamente la función de TCR en los linfocitos T. Véase, Figure 2. El ensayo alogénico se realizó utilizando 19 donantes diferentes que expresan TIM7 o TIM8, donde cada donante se cultivó con 3 PBMC alogénicas diferentes. Se observó una reducción promedio en la producción de IFN- γ del 49 % en los linfocitos T que expresan TIM7, y se observó una reducción promedio del 60 % en los linfocitos T que expresan TIM8.

Para determinar si cada TIM inhibió la función de los linfocitos T mediante la estimulación con anticuerpos directos del complejo TCR, los linfocitos T transducidos con TIM se trataron con un intervalo de diferentes concentraciones de AcM anti-CD3 (1,6 a 5000 ng/ml). Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes libres de células y la cantidad de IFN- γ producida se cuantificó mediante ELISA. Los linfocitos T solos se utilizan como control negativo. Cuando las células se estimularon con 200 ng/ml de AcM anti-CD3 durante 24 horas, se observó una reducción máxima en la producción de IFN- γ del 44 % y 58 % en linfocitos T que expresan TIM7 y TIM8, respectivamente. En su conjunto, esto indica que una reducción en la expresión de TCR, por ejemplo, utilizando TIM para eliminar o interrumpir el TCR, es suficiente para alterar la función de los linfocitos T.

Ejemplo 5: Producción de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T (TCR) que expresan quNKG2D

En este ejemplo, se realizó una sobreexpresión simultánea de una proteína inhibitora de TCR dominante negativa, es decir, una TIM, y la expresión de un receptor quimérico dirigido a tumores. En particular, la expresión de TCR endógena se inhibió utilizando una TIM y se expresó el receptor quimérico quNKG2D, es decir, NKG2D unido al dominio citoplasmático de CD3-zeta. NKG2D se asocia con Dap10 para proporcionar señales de activación primaria y secundaria a los linfocitos T. Véase, Zhang, T. et al. 2006. Cancer Res. 66(11): 5927-5933. Los ligandos para NKG2D se expresan en la mayoría de las células tumorales humanas, pero no en la mayoría de las células normales.

Con el fin de probar la expresión tanto de una TIM como de un receptor quimérico dirigido al tumor, se aislaron PBMC humanas primarias de donantes sanos y se activaron con 40 ng/ml de anti-CD3 soluble y 50 U/ml de rhuIL-2

durante 72 horas. Los linfocitos T activados se lavaron y se transdujeron con retrovirus de alto título utilizando una inoculación por centrifugación de 1 hora a 32 °C, seguida de un período de descanso de 7 horas. Se utilizaron cantidades iguales de virus TIM y quNKG2D para la transducción. Las células se lavaron y se cultivaron en 50 U/ml de IL-2 durante 48 horas, y luego se sometieron a selección de G418 durante 3 días. Después de la selección, las células vivas se aislaron utilizando Lymphoprep (Mediatech), y las células efectoras se expandieron en 50 U/ml de IL-2 durante 48 horas cuando las células se utilizaron para ensayos funcionales. Los cambios en la expresión de la superficie celular se analizaron utilizando anticuerpos específicos para CD3, CD4, NKG2D y CD5. No se observaron diferencias en la expresión de estas moléculas de la superficie celular en linfocitos T que expresan TIM en comparación con el vector de control, a excepción de una mayor expresión del receptor NKG2D en células transducidas con el virus chNKG2D, como se esperaba.

Para determinar si los linfocitos TIM+ quNKG2D+ tendrían una respuesta reducida a las células alogénicas, pero una mayor respuesta a las células tumorales, se cultivaron los linfocitos T conjuntamente con PBMC alogénicas, PBMC singénicas o células tumorales: RPMI8226 (una línea celular de mieloma humano, ligando+ NKG2D), PANC-1 (una línea celular pancreática humana, NKG2D+), o NIH-3T3 (una línea celular de fibroblastos de ratón normal, ligando- NKG2D), como control negativo. Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes libres de células y la cantidad de IFN-γ producida se cuantificó mediante ELISA. Los linfocitos T solos y el cultivo con PBMC singénicas se utilizan como controles negativos.

En el ensayo alogénico, se observó una reducción del 45 % en la producción de IFN-γ en los linfocitos T que expresan TIM7, y se observó una reducción del 44 % en la producción de IFN-γ en los linfocitos T que expresaban TIM8 que tenían coexpresión de quNKG2D en comparación con células que expresan el vector de control. Cuando se cultivaron con células tumorales, se observó un aumento significativo en la cantidad de producción de IFN-γ en respuesta a las células tumorales en linfocitos TIM+ quNKG2D+, en comparación con las células que expresan TIM solamente, cuando las células tumorales expresaban ligandos NKG2D (RPMI8226 y PANC-1), pero no cuando se cultivan con células tumorales deficientes en ligando (NIH-3T3). Véase la Figura 3 que muestra un experimento representativo utilizando RPMI8226. El mismo experimento también demostró que una mayor producción de IFN-γ dependía de NKG2D, debido a que la incubación con un AcM de bloqueo para NKG2D no produjo un aumento en la producción de IFN-γ.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE

<120> Composiciones de linfocitos T deficientes en el receptor de linfocitos T

<130> 76840,000106

<140> tba

<141> 30/04/2013

<150> 13/459.664

<151> 30/04/2012

<150> 13/502.978

<151> 19/04/2012

<150> PCT/US10/54846

<151> 29/10/2010

<150> 61/255.980

<151> 29/10/2009

<160> 101

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ARNhc de TCR-beta

<400> 1

agtgcgagga gattcggcag ctat 25

5 <210> 2
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de ARNhc de TCR-beta

15 <400> 2
gcgaggagat tcggcagctt atttc 25

20 <210> 3
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> secuencia de ARNhc de TCR-beta

30 <400> 3
ccaccatcct ctatgagatc ttgct 25

35 <210> 4
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> secuencia de ARNhc de TCR-beta

45 <400> 4
tcctctatga gatcttgcta gggaa 25

50 <210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> secuencia de ARNhc de TCR-alfa

60 <400> 5
tctatggctt caactggcta gggtg 25

65 <210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de ARNhc de TCR-alfa

<400> 6
caggtagagg cctgtccac ctaat 25

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de ARNhc de TCR-alfa

<400> 7

gcagcagaca ctgcttctta ctct 25

5 <210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de ARNhc de TCR-alfa

<400> 8
gacactgctt ctactcttg tgcta 5

15 <210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

<400> 9
cctctgcctc ttatcagttg gcgtt 25

25 <210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

<400> 10
gagcaaagtg gttattatgt ctgct 25

35 <210> 11
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

45 <400> 11
aagcaaacca gaagatgcca acttt 25

50 <210> 12
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

55 <400> 12
gacctgtatt ctggcctgaa tcaga 25

60 <210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

<400> 13

ggctctgcc ttatcagt t 21
 <210> 14
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon
 10 <400> 14
 gcctctgcct ttatcagtt g 21
 <210> 15
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon
 <400> 15
 gcctcttatc agttggcgtt t 21
 25 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon
 <400> 16
 35 aggatcacct gtactgaag g 21
 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon
 <400> 17
 45 ggatcacctg tactgaagg a 21
 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon
 55 <400> 18
 gaattggagc aaattggta t 21
 <210> 19
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon
 65 <400> 19

ggagcaaagt ggttattatg t 21

5 <210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

<400> 20
gcaaaccaga agatgcgaac t 21

15 <210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

<400> 21
acctgtattc tggcctgaat c 21

25 <210> 22
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

<400> 22
gcctgaatca gagaagcatc t 21

35 <210> 23
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

<400> 23
ctgaaatact atggcaacac aatgataaa 29

45 <210> 24
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

<400> 24
aaacataggc agtgaatgagg atcacctgt 29

55 <210> 25
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

65 <400> 25

attgtcatag tggacatctg catcactgg 29

5 <210> 26
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-epsilon

<400> 26
ctgtattctg gcctgaatca gagacgcat 29

15 <210> 27
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-delta

<400> 27
gataacctata gaggaacttg a 21

25 <210> 28
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-delta

<400> 28
gacagagtgt ttgtgaattg c 21

35 <210> 29
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-delta

<400> 29
gaacctgtct ctcagacatt a 21

45 <210> 30
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-delta

55 <400> 30
ggaccacga ggaatatata g 21

60 <210> 31
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-delta

<400> 31

5 ggtgtaatgg gacagatata t 21
 <210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-delta
 10 <400> 32
 gcaagttcat tatcgaatgt g 21
 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> secuencia de ARNhc de CD3-delta
 <400> 33
 ggctggcatc attgtcactg a 21
 25 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-delta
 <400> 34
 35 gctggcatca ttgtcactga t 21
 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-delta
 <400> 35
 45 gcatcattgt cactgatgtc a 21
 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-delta
 55 <400> 36
 gctttgggag tcttctgctt t 21
 <210> 37
 <211> 29
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> secuencia de ARNhc de CD3-delta
 <400> 37

tggaacatag cacgtttctc tctggcctg 29

5 <210> 38
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-delta

<400> 38
ctgctctcag acattacaag actggacct 29

15 <210> 39
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-delta

<400> 39
accgtggctg gcatcattgt cactgatgt 29

25 <210> 40
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-delta

<400> 40
tgatgctcag tacagccacc ttggaggaa 29

35 <210> 41
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

<400> 41
ggctatcatt ctcttcaag g 21

45 <210> 42
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

55 <400> 42
gcccagtcaa tcaaaggaaa c 21

60 <210> 43
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

<400> 43

ggttaagggtg tatgactatc a 21

5 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

 <400> 44
 ggttcggtac ttctgacttg t 21

15 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

 <400> 45
 gaatgtgtca gaactgcatt g 21

25 <210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

 <400> 46
 gcagccacca tatctggctt t 21

35 <210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

45 <400> 47
 ggctttctct ttgctgaaat c 21

50 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

55 <400> 48
 gctttctctt tgctgaaatc g 21

60 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

 <400> 49

gccaccttca aggaaaccag t 21

5 <210> 50
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

<400> 50
gaaaccagtt gaggaggaat t 21

15 <210> 51
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

<400> 51
ggctttctct ttgctgaaat cgtcagcat 29

25 <210> 52
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

<400> 52
aggatggagt tcgccagtcg agagcttca 29

35 <210> 53
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

<400> 53
cctcaaggat cgagaagatg accagtaca 29

45 <210> 54
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> secuencia de ARNhc de CD3-gamma

55 <400> 54
tacagccacc ttcaaggaaa ccagttgag 29

60 <210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM)

<220>

<221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Asp o Glu

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser Ile o Leu

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser Ile o Leu

35

<400> 55

Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa
1				5					10						15	

Xaa

40

<210> 56
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM)

50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Asp o Glu

55

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

60

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser Ile o Leu

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa puede ser Ile o Leu

20

<400> 56

Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa
1				5					10						15	

Xaa Xaa

<210> 57
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM)

30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Asp o Glu

35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser Ile o Leu

50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

55

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

60

ES 2 711 629 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa puede ser Ile o Leu

5

<400> 57

Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa

10

<210> 58
 <211> 1575
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 58

tgaggacata	tctaaat	ctagttttat	agaaggcttt	tatccacaag	aatcaagatc	60
ttccctctct	gagcaggaat	cctttgtgca	ttgaagactt	tagattcctc	tctgcggtag	120
acgtgcactt	ataagtattt	gatgggggtg	attcgtggtc	ggaggtctcg	acacagctgg	180
gagatgagtg	aatttcataa	ttataacttg	gatctgaaga	agagtgattt	ttcaacacga	240
tggcaaaagc	aaagatgtcc	agtagtcaaa	agcaaatgta	gagaaaatgc	atctccattt	300
tttttctgct	gcttcatcgc	tgtagccatg	ggaatccgtt	tcattattat	ggtagcaata	360
tggagtgctg	tattcctaaa	ctcattattc	aaccaagaag	ttcaaattcc	cttgaccgaa	420
agttactgtg	gcccatgtcc	taaaaactgg	atatgttaca	aaaataactg	ctaccaattt	480
tttgatgaga	gtaaaaactg	gtatgagagc	caggcttctt	gtatgtctca	aaatgccagc	540
cttctgaaag	tatacagcaa	agaggaccag	gatttactta	aactggtgaa	gtcatatcat	600
tggatgggac	tagtacacat	tccaacaaat	ggatcttggc	agtgggaaga	tggctccatt	660
ctctcaccca	acctactaac	aataattgaa	atgcagaagg	gagactgtgc	actctatgcc	720
tcgagcttta	aaggctatat	agaaaactgt	tcaactccaa	atacatacat	ctgcatgcaa	780
aggactgtgt	aaagatgata	aaccatctca	ataaaagcca	ggaacagaga	agagattaca	840
ccagcggtaa	cactgccaac	cgagactaaa	ggaaacaaac	aaaaacagga	caaatgacc	900
aaagactgtc	agatttctta	gactccacag	gaccaaacca	tagaacaatt	tactgcaaaa	960
catgcatgat	tctccaagac	aaaagaagag	agatcctaaa	ggcaattcag	atatccccaa	1020
ggctgcctct	cccaccacaa	gccagagtg	gatgggctgg	gggaggggtg	ctgttttaat	1080
ttctaaaggt	aggaccaaca	cccaggggat	cagtgaagga	agagaaggcc	agcagatcag	1140
tgagagtgca	acccacacct	ccacaggaaa	ttgcctcatg	ggcagggcca	cagcagagag	1200

ES 2 711 629 T3

acacagcatg ggcagtgcct tccctgcctg tggggggtcat gctgccactt ttaatgggtc	1260
ctccacccaa cgggggtcagg gaggtggtgc tgccctagtg ggccatgatt atcttaaagg	1320
cattattctc cagccttaag atcttaggac gtttcctttg ctatgatttg tacttgcttg	1380
agtcccatga ctgtttctct tccctctctt cttccttttg gaatagtaat atccatccta	1440
tgtttgtccc actattgtat tttggaagca cataacttgt ttggtttcac aggttcacag	1500
ttaagaagga attttgctc tgaataaata gaatcttgag tctcatgcaa aaaaaaaaaa	1560
aaaaaaaaa aaaaa	1575

<210> 59
 <211> 6098
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 59

gcagttatca tagagcacag tccctcacat cacacagctg cagagatgag taaacaaaga	60
ggaaccttct cagaagtgag tctggcccag gacccaaagc ggcagcaaag gaaacctaaa	120
ggcaataaaa gctccatttc aggaaccgaa caggaaatat tccaagtaga attaaatctt	180
caaaatcctt ccctgaatca tcaagggatt gataaaatat atgactgcca aggtaaaaca	240
ttaaatatat ctccaatatt attgttctag gatgtgcagt tgaatgcaga agggtagaga	300
aagattaggg aatattttgc acttgtgaga atcggagttc ataattggga tctaaaattc	360
taatatgaaa tcagaagact aattttattc gggcattgtt caactgtaat ctgcggtcca	420
ctcatggaac attatattta ctgaaaatga aatggtatat tctgagagaa agattactag	480
agtagatgta gatttagagg ccagagttta tcattatgtt tccctgtgca tgtgggttct	540
ctagtatgta attctctagt atgtaatcct aatcaactct ctatctcccc tctctcagt	600
cctctatttc tctccctgca ggtttactgc cacctccaga gaagctcact gccgaggtcc	660
taggaatcat ttgcattgtc ctgatggcca ctgtgttaaa aacaatagtt cttattcctt	720
gtaagcatat tcttgaaaga ttagaaggga acgttttact ttaatgcttg gaagtgcctc	780
aaaatatttc atactgttga agaatagaac tcttatttta ctgtttcttt caaagatcta	840
ttacttcatt tatttttata gaaaaagtta attttattaa agattgtccc cattttaaat	900
aacacacaaa gtttcaaagt aagaaactaa actcattatg gtttatctaa atattacttt	960
ttataaaaat cattttaatt tttctgttac agtcctggaa cagaacaatt cttcccaaaa	1020
tacaagaacc cagaaaagta catttttatt ttcaaagttc tgatattagt acaatttgga	1080
accaaagta atatggttat tctgaatttt tcacaacata aataacaaaa tcattgtaga	1140
gaacatgtgt ttattttttg tgtgtaatct atatatatgt atatacatc acacacaaag	1200
atattttctg atttcataat tcaaaggcat gctatagaag aaaagtattt agaaaaacaa	1260

ES 2 711 629 T3

attaattttt	gaaagtgggt	acatcaaata	ctacaagaga	tggtgaagtt	tgtgctaaag	1320
tctttaaaaa	tgtttatttc	aaaggtctat	tactttatat	atttttatag	aaaaagttaa	1380
ttttattaaa	gattctcccc	attttaaata	acacacaaaag	tttcaaagta	agaaactaaa	1440
ctcgttatgg	ttcatctaga	tatcagtttt	tataaaaatc	attttaattt	ttctattaca	1500
gtcctggagc	agaacaattc	ttccccgaat	acaagaacgc	agaaaggtag	atttttattt	1560
tcaatgttct	gatattagta	caattttatat	tttgtgtctg	ttttaaggca	tgtaaaagaa	1620
tagtggcatt	tttgagaaa	ataagccata	aattcagcca	taaatatttg	taaagaaaga	1680
ttatgaggca	gcatttcctt	ttctccagt	agtagaaaata	ctcacttaaa	atcattctac	1740
cctctttctc	ccaattaaca	gaggtttcct	actgctgtga	gatgatacca	aataaataat	1800
tttactattc	taaaaaagca	gttgtgtatc	agcgatgttc	aacacatgtg	tagagtgtat	1860
ttttgtttgt	tcatttgctt	tatatgggaa	cacaattagg	gaggagaggc	taacccttgt	1920
ctgtgcatgt	gtgtatgact	gactcagtta	ttaaaaatat	acatttataa	gcctgtaagg	1980
atgcgtaa	atgttaagca	catatatgtt	tatactgttg	aaatatgtga	actaattttc	2040
atttttaaaa	attcatattg	gtctaaatag	taattcatat	ctttattagc	acgtcattgt	2100
ggccattgtc	ctgaggagt	gattacatat	tccaacagtt	gttattacat	tggttaaggaa	2160
agaagaactt	gggaagagag	tttgctggcc	tgtacttcga	agaactccag	tctgctttct	2220
atagataatg	aagaagaaat	ggtaagatgt	aaatgtttca	aacattttat	gaaaagcttc	2280
cttcagtga	taatacat	gtagaaaaca	tccatatgtg	tgtacatata	tttatctcat	2340
atattttcaa	gtgtatgtaa	tattcaattg	attgacttaa	taatgttttt	aaagttatat	2400
actgcta	tacatttatt	ttcagttttt	gtttttcaag	gaaaaccatg	cttctataag	2460
tgctttgaat	ccacaataaa	ttttgctatc	taattttatc	gggcatgata	tcatctggtc	2520
atgcagattg	atcacaaagt	gaatgaatgc	atgtgatata	agtcagatca	tgaaataaaa	2580
gtttccagct	ctagcagttc	caccctgtg	tatgccctca	tcacttatcc	tgactcctct	2640
ccaaaacgca	gtcttgactt	ttaatattat	aaataatgat	tgctgtttct	tgaatttatt	2700
tatataaagg	gaatcaaaca	gtgtgaattt	catgtctttt	tcaatcctat	ctgatatttg	2760
tgcaattcct	ccatattatt	gcagttatca	gtagtatgtt	actgttcact	gctgtactat	2820
gtacaaagaa	cagtaagaat	ccattgagtc	cttgtctctg	gatggggaag	tgggtctcat	2880
gccctcaggg	acaaagagga	ccctaggtgg	tttacgggtgc	actgttagtc	atgggggtccc	2940
tttgctgatc	ctcctcatcc	acagccatcc	tggtgtctct	tggtatgaga	aggaagcact	3000
ttctctagct	ccatattggg	agcaggtctc	ctggtagatc	atccttgcca	gtggcaccag	3060
ccttgccctgg	tattgtggag	gggactctcc	ttcgataccc	tcctcctatt	gccaggttgg	3120

ES 2 711 629 T3

gtgtagggaa acagcaggcc taggtcacct tcttctgtcg tgtggaggac ttaacatgct	3180
cacttggaaca cttggttgat ccctgatgct aggggtcccag acaatttcat ctttctcttt	3240
ccacctttca gagttctcca ttgcttttgt ctttcattaa tcccagagtt tatagttgtt	3300
tttagtaggg agtagcagag agagacgagt ctacaccacc tggccaggac ccctgttatt	3360
ccgcaaaaac cgaatcggat aaaaattgag ggcttatcta gttaaagaat ggtgtggtac	3420
ccagaaaacc caatctgtag cttccatgtc atctatttct gaatgacaac ccctcaattc	3480
ccttctaaat ctccaactct gagaaatata gcacaaaaat agattgattt agtcacagta	3540
tctggagaaa tgaatgcaca gtatcaggaa acttattaaa acccttcctg tgtttattct	3600
gttaattgga gtaactatta cattgcaaga attaaaatgt ctttattaac atgagaataa	3660
gaatgaaagt actaagtata aacgttgaag agttcattta aataaaaaat tcaaacattt	3720
atgaaagttt ttggcactgc aaatagtggg tttcaacttt aatatattgt ttttgaatg	3780
ttttcataat tattatttaa gtgaaaatta tttcttttct tttagaaatt tctggccagc	3840
attttacctt cctcatggat tgggtgtgtt cgtaacagca gtcacatcc atgggtgaca	3900
ataaatgggt tggctttcaa acataagtaa gttcttttgt atggcgctat ataaaaata	3960
tatataaagg ataaattcag aagaataata tgaataaatt tatgtggaat cattgacatg	4020
aagaaagatg tggaaagtta gtgaaatgtt gatataaata ttttacaata gaccatagta	4080
gtccatatat ttcaaccgct cattgggtctg ctagtaacct tcttggttat cagatggacc	4140
aggggtgtcc catctttggc ttctgtgggc cacgttagaa gacgaatagt cttggcccac	4200
acatagaata cactaacact aacgatagct gacgagctaa aaaaaaaaaa aaatcacaga	4260
atgttttaag aaagtttacg tatttgtgtt gggccgcatt caaagctgtc ctgggtcacg	4320
tgcggcccat gggcagcgag ttggacaacc tcgagctgga ctatcaggga actgcagtgc	4380
ttgtttttat taaaaagcca cgcttacttt tttacttaag aatatcctca aagcacaata	4440
atagtgtgtt tggcatattg ctataatttt tttattacta gttattgttg tcaatctctt	4500
attgtgccta atttataaat taaactttat cacagttatg aatgtgtaga gaaaacataa	4560
tctctctata ggttctgcac tatctgccat ttcaggcatc cactggggtc ttgaaacata	4620
tccctcgtgg atgaagaggg actactctgt tgagtgttca gaataatgac tcttactaat	4680
attatgaaaa atttaattac ccttttccat gaaattcttt tcttacagta catggaaaat	4740
gctttcgtct catgaatcat ttgcttaaaa tgtaacagaa tatggatttt tctccattac	4800
aggataaaag actcagataa tgctgaactt aactgtgcag tgctacaagt aaatcgactt	4860
aaatcagccc agtgtggatc ttcaatgata tatcattgta agcataagct ttagaagtaa	4920
agcatttgcg tttacagtgc atcagataca ttttatattt cttaaaatag aaatattatg	4980
attgcataaa tctgaaaatg aattatgtta tttgctctaa tacaaaaatt ctaaataaat	5040

ES 2 711 629 T3

tattgaaata ggatgcacac aattactaaa gtacagacat cctagcattt gtgtcgggct 5100
cattttgctc aacatgggtat ttgtgggtttt cagcctttct aaaagttgca tgttatgtga 5160
gtcagcttat aggaagtacc aagaacagtc aaacccatgg agacagaaaag tagaatagt 5220
gttgccaatg tctcagggag gttgaaatag gagatgacca ctaattgata gaacgtttct 5280
ttgtgtcgtg atgaaaactt tctaaatttc agtaatgggtg atgggtgtta ctttgcgat 5340
atactaaaca tcattgattt ttaatcattt taagtgcagc aaatgtatgc tttgtacatg 5400
acacttcaat aaagctatcc agaaaaaaaa aagcctctga tgggattgtt tatgactgca 5460
tttatctcta aagtaatttt aaagattagc ttctttataa tattgacttt tctaatacgt 5520
ataaagtgtt tccttcaatg tactgtgtta tctttaattt ctctctcttg tattttgtat 5580
tttgggggat tgaagtcata cagaaatgta ggtattttac atttatgctt ttgtaaatgg 5640
catcctgatt ctaaaattcc ctttagtaat ttttggtgtt ataaatagaa atacaactga 5700
tgtctgcatt ttgattttat atctacttat tccactgatt ttatatattt aaatctatta 5760
tgtcaactat tgattttatt ctgggtgttc tatataacga gcaattttat ctgcaaatga 5820
tcacactttt atttttttta atccatgtgc tataacttag ttttattttc atttattttc 5880
actggctaag gttttataacc catagttgaa tagaaggcac aatcaaagtt ctttgtggat 5940
catatgcac attttctggt tttggcaaaa aatacttcaa catgttatac atatttaaaa 6000
agcttggtgt tttttgcac ctatctttct catatcgaag cagttttata atcctatttt 6060
ctaatagatt ttatcaattg taacaatttt tattaatt 6098

<210> 60
<211> 3000
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<300>
<308> AF072845
<309> 22/06/1998
<313> (1)..(3000)

<400> 60

aattcccagc cctggagctg gcattccagt gggaggccac tctcagtttc acttgggtgac 60
ctttcacagc actgaccatg ttggccctat ttctcccctg cttgcttgct tttctatttt 120
atattattat tacattttta ttgttagaga gaggggtctca ttctgtcgcc caggctggag 180
tgcagtggca aagtgggtgag atctcggtc actgcaacct ccaactgcct cagtctccca 240
agtagctggg attacaggag cctgacacca tgcccgggta atttttgtat tttttagag 300
acgggggttc accatattgg cttgaactcc tgatctcagg tgatcccccc accttggcct 360
cccaaagtgc tgggattaca ggcagagcc actgcgggtg cctctcccct gctttcaaga 420

ES 2 711 629 T3

tgccatgctc	tcaggggtcc	cctccctctt	tctccatttc	cctggcaaag	ttcctcctct	480
ccccccattc	agtgtgtgtt	gtgatagggg	cagaatcctg	tctgcactca	cttccttggt	540
gatctcacc	agtcttgtgg	ctttaagtac	catccataag	ccatcaaccc	ccaaatttac	600
atctccagac	cagccttata	ccctgaactc	ctaaatgcag	tgaggttatt	cagcatctcc	660
acaggggagt	tgtcaggcat	ttccaaccct	gtatgcccaa	acctcgtcac	tttccccgca	720
aaccacattc	cctacctttc	atctctgcca	gcagacactc	ccatcttctc	agcgtttcat	780
gccagaaggc	ttggctgtct	aggatccctc	tcaaacacac	ccacattcat	ttaatcagca	840
aattttcttg	gccctacctc	caaaatattt	ccagatctcc	ctagcctgca	cacccttgcc	900
acctgtcatt	cccacttgga	ccaggccagc	agcctccctg	gtctctctga	ccctccccct	960
gagttcgctc	accaaaggca	gtaacggaga	cacccccctc	acacacacag	gaagcagatg	1020
gccttgacac	cagcagggtg	acatccgcta	ttgctacttc	tctgctcccc	cacagtccct	1080
ctggacttct	ctggaccaca	gtcctctgcc	agaccctctc	cagaccccag	tccaccatga	1140
tccatctggg	tcacatcctc	ttcctgcttt	tgctcccagg	tgaagccagt	ggttacaggg	1200
gatggtaggc	agagcgtttg	tgagatgggt	gcttggggtga	cgtctgcagg	gacgggtgat	1260
gaaagtgggg	ttcttctccc	tgaccccctt	cccttctggg	agatccattc	tgcttcaggg	1320
cctgggtcct	tgggggcgga	agggggtgag	acagggagtt	ctggaggggc	tgctgttag	1380
cgtccccttc	tcatggctgg	gtctctgctg	ccacttccaa	tttcttgtca	ctctccatgt	1440
ctctgggagt	ccccttccca	tgtggctcctg	ttccatctct	ccagcctgga	gattacttct	1500
caggacacta	cctttccttc	tctacaccct	attttttggt	ttgtttattt	tgagatgggg	1560
tcttgctctg	ttgtccaggc	tggagtgcag	tggcacaatc	acggctcacg	gcagccttga	1620
cttctggg	tcaggtgatc	ctcccagctc	agcctcccga	gtaactggga	ttacagggtg	1680
gaaccaacac	ttccagctaa	tttttgattt	tcttgtagag	acgaggtctc	actatgttgc	1740
ccaggctggt	ctcgaactcc	tgggctcaag	cgatcttcct	gcctcggcct	cccaaagtgc	1800
tgggatgaca	ggcgtgagcc	acggtgccag	gctgagcatt	ctgttttgtg	gaccttctct	1860
ccaccctcat	ccaccttctt	tctctttcca	cagtggctgc	agctcagacg	actccaggag	1920
agagatcatc	actccctgcc	ttttaccctg	gcacttcagg	tatcacttcc	acccagaag	1980
cttggccaga	ggctcccaga	acaccccagt	ggttctccag	gtcaccatcc	cacctcccgt	2040
ccccaaatca	gaggatccgt	gtccttctcc	gagtcccaga	atcagcgacc	cccagcctgt	2100
gttcaggagc	accccggtgtg	cccgccgcac	agccccgagg	gtcctgggac	acccagcct	2160
ctctgcatct	gtctcccggt	tcattcccca	agcgcaactc	caaggaacct	gggacccgcc	2220
ccctcgcagg	ggacttcctc	tctgcctgtg	gccaaagcac	agccccagga	cgcagagctt	2280
gagttgtctc	cctgttccgg	ccccactct	ccaggctctt	gttccggatg	tgggtccctc	2340

ES 2 711 629 T3

	tctctgccgc	tcctggcagg	cctcgtggct	gctgatgcgg	tggcatcgct	gctcatcgctg	2400
	ggggcggtgt	tcctgtgcgc	acgcccacgc	cgcagccccg	cccaaggtga	gggcggagat	2460
	gggcggggcc	tgggaaggtgt	atagtgtccc	tagggagggg	gtcccaggga	ggggggccctt	2520
	ggggaagccc	tggaggaggt	gctggggaaa	ccctggggga	ggtgcctggg	ggaacccctg	2580
	aggaaacccc	tgaagcaggg	ggtccccagg	gaagtggaga	tatgggtggt	caagcttcat	2640
	gctttctctc	ccctatcccc	agaagatggc	aaagtctaca	tcaacatgcc	aggcaggggc	2700
	tgaccctcct	gcagcttgga	cctttgactt	ctgaccctct	catcctggat	ggtgtgtggt	2760
	ggcacaggaa	ccccgcccc	aacttttgga	ttgtaataaa	acaattgaaa	cacctgtagt	2820
	cgtattcttt	ctcaaagaac	cccagagttc	ccaaagcctc	cctcccatga	actgtttctg	2880
	gatccaaggc	cccctcagaa	cccccacatg	tccccatccc	atcagcccaa	ggatctggca	2940
	taatgttttt	gtgcttcatg	tttatttttag	gagagtattg	gggagcggtc	tggtctctca	3000
5	<210> 61 <211> 604 <212> ADN <213> Homo sapiens						
10	<300> <308> AF019562 <309> 14/08/1997 <313> (1)..(604)						
	<400> 61						
	ccacgcgtcc	gcgctgcgcc	acatcccacc	ggcccttaca	ctgtggtgtc	cagcagcatc	60
	cggcttcatg	gggggacttg	aaccctgcag	caggctcctg	ctcctgcctc	tcctgctggc	120
	tgtaagtgg	ctccgtcctg	tccaggccca	ggcccagagc	gattgcagtt	gctctacggt	180
	gagcccgggc	gtgctggcag	ggatcgtgat	gggagacctg	gtgctgacag	tgctcattgc	240
	cctggccgtg	tacttcctgg	gccggctgg	ccctcggggg	cgaggggctg	cggaggcagc	300
	gacccgaaa	cagcgtatca	ctgagaccga	gtcgccttat	caggagctcc	agggtcagag	360
	gtcggatgtc	tacagcgacc	tcaacacaca	gaggccgtat	tacaaatgag	cccgaatcat	420
	gacagtcagc	aacatgatac	ctggatccag	ccattcctga	agcccaccct	gcacctcatt	480
	ccaactccta	ccgcgataca	gacccacaga	gtgccatccc	tgagagacca	gaccgctccc	540
	caatactctc	ctaaaataaa	catgaagcac	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	600
15	aaaa						604
20	<210> 62 <211> 1677 <212> ADN <213> Homo sapiens						
	<300> <308> NM_198053						

ES 2 711 629 T3

<309> 01/08/2010
<313> (1)..(1677)

<400> 62

5
gtcctccact tcctggggag gtagctgcag aataaaacca gcagagactc cttttctcct 60
aaccgtcccg gccaccgctg cctcagcctc tgcctcccag cctctttctg agggaaagga 120
caagatgaag tggaaggcgc ttttcaccgc ggccatcctg caggcacagt tgccgattac 180
agaggcacag agctttggcc tgctggatcc caaactctgc tacctgctgg atggaatcct 240
cttcatctat ggtgtcattc tcaactgcctt gttcctgaga gtgaagttca gcaggagcgc 300
agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg 360
aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tggggggaaa 420
gccgcagaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat 480
ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga 540
tggcctttac caggggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc ttcacatgca 600
ggccctgccc cctcgctaac agccagggga tttcaccact caaaggccag acctgcagac 660
gcccagatta tgagacacag gatgaagcat ttacaacccg gttcactctt ctcagccact 720
gaagtattcc cctttatgta caggatgctt tggttatatt tagctccaaa ccttcacaca 780
cagactgttg tccctgcact ctttaaggga gtgtactccc agggcttacg gccctggcct 840
tgggcccctct gggttgccgg tgggtgcaggt agacctgtct cctggcggtt cctcgttctc 900
cctgggaggc gggcgccactg cctctcacag ctgagttggt gagtctgttt tgtaaagtcc 960
ccagagaaag cgcagatgct agcacatgcc ctaatgtctg tatcactctg tgtctgagtg 1020
gcttcaactcc tgctgtaaat ttggcttctg ttgtcacctt cacctcctt caaggtaact 1080
gtactgggccc atgttgtgcc tccctggtga gagggccggg cagaggggca gatggaaagg 1140
agcctaggcc aggtgcaacc agggagctgc aggggcatgg gaaggtgggc gggcagggga 1200
gggtcagcca gggcctgcga gggcagcggg agcctccctg cctcaggcct ctgtgccgca 1260
ccattgaact gtaccatgtg ctacaggggc cagaagatga acagactgac cttgatgagc 1320
tgtgcacaaa gtggcataaa aaacatgtgg ttacacagtg tgaataaagt gctgcggagc 1380
aagaggaggc cggttgattca cttcacgctt tcagcgaatg acaaaatcat ctttgtgaag 1440
gcctcgcagg aagacccaac acatgggacc tataactgcc cagcggacag tggcaggaca 1500
ggaaaaaccc gtcaatgtac taggatactg ctgcgtcatt acagggcaca ggccatggat 1560
ggaaaaacgt ctctgctctg ctttttttct actgttttaa tttatactgg catgctaaag 1620
ccttcctatt ttgcataata aatgcttcag tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1677

<210> 63

<211> 591
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5 <300>
<308> M33195
<309> 27/04/1993
<313> (1)..(591)

10 <400> 63

cagaacggcc gatctccagc ccaagatgat tccagcagtg gtcttgctct tactcctttt	60
ggttgaacaa gcagcggccc tgggagagcc tcagctctgc tatatcctgg atgccatcct	120
gtttctgtat ggaattgtcc tcaccctcct ctactgtcga ctgaagatcc aagtgcgaaa	180
ggcagctata accagctatg agaaatcaga tgggtgtttac acgggcctga gcaccaggaa	240
ccaggagact tacgagactc tgaagcatga gaaaccacca cagtagcttt agaatagatg	300
cggtcataatt cttctttggc ttctgggttct tccagccctc atggttggca tcacatatgc	360
ctgcatgcca ttaacaccag ctggccctac ccctataatg atcctgtgtc ctaaattaat	420
atacaccagt ggttcctcct ccctgttaaa gactaatgct cagatgctgt ttacggatat	480
ttatattcta gtctcactct cttgtcccac ctttcttctc ttccccattc ccaactccag	540
ctaaaatatg ggaagggaga accccaata aaactgccat ggactggact c	591

15 <210> 64
<211> 1687
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 64

tgcttttctca aaggccccac agtcctccac ttcctgggga ggtagctgca gaataaaacc	60
agcagagact ccttttctcc taaccgtccc ggccaccgct gcctcagcct ctgcctccca	120
gcctctttct gagggaaagg acaagatgaa gtggaaggcg cttttcaccg cggccatcct	180
gcaggcacag ttgccgatta cagaggcaca gagctttggc ctgctggatc ccaaactctg	240
ctacctgctg gatggaatcc tcttcatcta tgggtgtcatt ctcaactgcct tgttcctgag	300
agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag cagggccaga accagctcta	360
taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg	420
ggaccctgag atggggggaa agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga	480
actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgaagatt gggatgaaag gcgagcgccg	540
gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggctctcagt acagccacca aggacaccta	600
cgacgccctt cacatgcagg ccctgcccc tcgctaacag ccaggggatt tcaccactca	660
aaggccagac ctgcagacgc ccagattatg agacacagga tgaagcattt acaaccgggt	720
tcactcttct cagccactga agtattcccc tttatgtaca ggatgctttg gttatattta	780

gctccaaacc ttcacacaca gactgttgtc cctgcactct ttaagggagt gtactcccag 840
 ggcttaacggc cctggccttg ggccctctgg tttgccggtg gtgcaggtag acctgtctcc 900
 tggcggttcc tcgttctccc tgggaggcgg gcgcactgcc tctcacagct gagttgttga 960
 gtctgttttg taaagtcccc agagaaagcg cagatgctag cacatgccct aatgtctgta 1020
 tcactctgtg tctgagtggc ttcactcctg ctgtaaattt ggcttctgtt gtcaccttca 1080
 cctcctttca aggtaactgt actgggccat gttgtgcctc cctggtgaga gggccgggca 1140
 gaggggcaga tggaaaggag cctaggccag gtgcaaccag ggagctgcag gggcatggga 1200
 aggtgggcgg gcaggggagg gtcagccagg gcctgcgagg gcagcgggag cctccctgcc 1260
 tcaggcctct gtgccgcacc attgaactgt accatgtgct acaggggcca gaagatgaac 1320
 agactgacct tgatgagctg tgcacaaaagt ggcataaaaa acatgtggtt acacagtgtg 1380
 aataaagtgc tgcggagcaa gaggaggccg ttgattcact tcacgctttc agcgaatgac 1440
 aaaatcatct ttgtgaaggc ctcgcaggaa gaccaaacac atgggaccta taactgccca 1500
 gcggacagtg gcaggacagg aaaaacccgt caatgtacta ggatactgct gcgtcattac 1560
 agggcacagg ccatggatgg aaaacgctct ctgctctgct ttttttctac tgttttaatt 1620
 tatactggca tgctaaagcc ttcctatttt gcataataaa tgcttcagtg aaaatgcaaa 1680
 aaaaaaa 1687

<210> 65
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

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

ES 2 711 629 T3

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
145 150 155 160

Pro Pro Arg

<210> 66

<211> 255

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

catcgctggt gctccaacaa aaaaaatgct gcggtaatgg accaagagtc tgcaggaaac 60

agaacagcga atagcaagga ctctgatgaa caagaccctc aggaggtgac atacacacag 120

ttgaatcact gcgttttcac acagagaaaa atcactcacc cttctcagag gcccaagaca 180

cccccaacag atatcatcat gtacacggaa cttccaaatg ctgagtccag atccaaagtt 240

gtctcctgcc catga 255

<210> 67

<211> 84

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

ES 2 711 629 T3

His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu
1 5 10 15

Ser Ala Gly Asn Arg Thr Ala Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp
20 25 30

Pro Gln Glu Val Thr Tyr Thr Gln Leu Asn His Cys Val Phe Thr Gln
35 40 45

Arg Lys Ile Thr Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp
50 55 60

Ile Ile Val Tyr Thr Glu Leu Pro Asn Ala Glu Ser Arg Ser Lys Val
65 70 75 80

Val Ser Cys Pro

<210> 68

<211> 97

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de ARNhc de CD3-zeta

<400> 68

tgctgttgac agtgagcgac ctcttgccag gatattttatt tagtgaagcc acagatgtaa 60

ataaatatcc tggcaagagg gtacctactg cctcgga 97

<210> 69

<211> 97

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> secuencia de ARNhc de CD3-zeta

<400> 69

tgctgttgac agtgagcgac cctcttgcca ggatattttat tagtgaagcc acagatgtaa 60

taaatatcct ggcaagaggg ctgcctactg cctcgga 97

<210> 70

<211> 97

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ARNhc de CD3-zeta

<400> 70

35

ES 2 711 629 T3

	tgctgttgac agtgagcgac ctacgtatcc tggatctgaa tagtgaagcc acagatgtat	60
	tcagatccag gatactgagg gtgcctactg cctcgga	97
5	<210> 71 <211> 97 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> secuencia de ARNhc de CD3-zeta <400> 71	
	tgctgttgac agtgagcgcg gatggaatcc tcttcatcta tagtgaagcc acagatgtat	60
	agatgaagag gattccatcc atgcctactg cctcgga	97
15	<210> 72 <211> 528 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 72	
	atgaaaaacg tgttcccacc cgaggtcgct gtgtttgagc catcagaagc agagatctcc	60
	cacacccaaa aggccacact ggtgtgcctg gccacaggct tctaccccga ccacgtggag	120
	ctgagctggt ggggtgaatgg gaaggaggtg cacagtgggg tcagcacaga cccgcagccc	180
	ctcaaggagc agcccgccct caatgactcc agatactgcc tgagcagccg cctgagggtc	240
	tcgggcacct tctggcagaa cccccgcaac cacttccgct gtcaagtcca gttctacggg	300
	ctctcggaga atgacgagtg gaccacaggat agggccaaac ctgtcaccca gatcgtcagc	360
	gccgaggcct ggggtagagc agactgtggc ttcacctccg agtcttacca gcaaggggtc	420
	ctgtctgcca ccatactcta tgagatcttg ctagggaagg ccaccttgta tgccgtgctg	480
	gtcagtgcc tctgtctgat ggccatgggtc aagagaaagg atttctaa	528
25	<210> 73 <211> 175 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 73	

ES 2 711 629 T3

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

<210> 74
 <211> 168
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 74

atgaagtgga aggcgctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag	60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc	120
atctatgggtc tcattctcac tgccttggtc ctgagagtga agttcagc	168

<210> 75
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 75

ES 2 711 629 T3

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

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

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

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser
50 55

<210> 76
<211> 189
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

atgaagtgga aggcgctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag 60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc 120
atctatggtg tcattctcac tgccttgttc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 180
gccccgcgcg 189

<210> 77
<211> 63
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 77

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

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

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

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
50 55 60

<210> 78
<211> 214
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

ES 2 711 629 T3

atgaagtgga aggcgcctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag 60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc 120
atctatggtg tcattctcac tgccttgttc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 180
gccccgcgt accagcaggg ccagaaccca gctc 214

<210> 79
<211> 71
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 79

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

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

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

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Pro Ala

65 70

<210> 80
<211> 423
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 80

atgaagtgga aggcgcctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag 60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc 120
atctatggtg tcattctcac tgccttgttc ctgagagtga agttcagcca tcgctggtgc 180
tccaacaaaa aaaatgctgc ggtaatggac caagagtctg caggaaacag aacagcgaat 240
agcgaggact ctgatgaaca agaccctcag gaggtgacat acacacagtt gaatcactgc 300
gttttcacac agagaaaaat cactcgaaat tctcagaggc ccaagacacc cccaacagat 360
atcatcatgt acacggaact tccaaatgct gagtccagat ccaaagttgt ctctgccca 420
tga 423

<210> 81
<211> 140
<212> PRT

ES 2 711 629 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 81

Met	Lys	Trp	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Gln	Ala	Gln	Leu	
1				5					10					15		
Pro	Ile	Thr	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Leu	Cys	
			20					25					30			
Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Leu	Thr	Ala	
	35						40					45				
Leu	Phe	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	His	Arg	Trp	Cys	Ser	Asn	Lys	Lys	
	50					55					60					
Asn	Ala	Ala	Val	Met	Asp	Gln	Glu	Ser	Ala	Gly	Asn	Arg	Thr	Ala	Asn	
65					70					75					80	
Ser	Glu	Asp	Ser	Asp	Glu	Gln	Asp	Pro	Gln	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Gln	
			85					90						95		
Leu	Asn	His	Cys	Val	Phe	Thr	Gln	Arg	Lys	Ile	Thr	Arg	Pro	Ser	Gln	
			100					105					110			
Arg	Pro	Lys	Thr	Pro	Pro	Thr	Asp	Ile	Ile	Val	Tyr	Thr	Glu	Leu	Pro	
		115					120					125				
				Asn	Ala	Glu	Ser	Arg	Ser	Lys	Val	Val	Ser	Cys	Pro	
				130						135				140		

5

<210> 82

<211> 444

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 82

atgaagtgga	aggcgctttt	caccgcggcc	atcctgcagg	cacagttgcc	gattacagag	60
gcacagagct	ttggcctgct	ggatcccaaa	ctctgctacc	tgctggatgg	aatcctcttc	120
atctatggtg	tcattctcac	tgcttgttc	ctgagagtga	agttcagcag	gagcgcagac	180
gccccgcgc	atcgctggtg	ctccaacaaa	aaaaatgctg	cggtaatgga	ccaagagtct	240
gcaggaaaca	gaacagcgaa	tagcgaggac	tctgatgaac	aagaccctca	ggaggtgaca	300
tacacacagt	tgaatcactg	cgttttcaca	cagagaaaaa	tcactcgccc	ttctcagagg	360
cccaagacac	ccccaacaga	tatcatcgtg	tacacggaac	ttccaaatgc	tgagtccaga	420
tccaaagttg	tctcctgccc	atga				444

15

<210> 83

ES 2 711 629 T3

<211> 147
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 83

```

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1          5          10          15

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

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

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala His
          50          55          60

Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Ser
65          70          75          80

Ala Gly Asn Arg Thr Ala Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro
          85          90          95

Gln Glu Val Thr Tyr Thr Gln Leu Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg
          100          105          110

Lys Ile Thr Arg Pro Ser Gln Arg Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Ile
          115          120          125

Ile Val Tyr Thr Glu Leu Pro Asn Ala Glu Ser Arg Ser Lys Val Val
          130          135          140

Ser Cys Pro
145

```

10

<210> 84
 <211> 471
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 84

ES 2 711 629 T3

```

atgaagtgga aggcgcgtttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag      60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc      120
atctatggtg tcattctcac tgccttgttc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac      180
gccccgcggt accagcaggg ccagaaccag ctccatcgct ggtgctccaa caaaaaaat      240
gctgcggtaa tggaccaaga gtctgcagga aacagaacag cgaatagcga ggactctgat      300
gaacaagacc ctcaggaggt gacatacaca cagttgaatc actgcgtttt cacacagaga      360
aaaatcactc gcccttctca gaggcccaag acacccccaa cagatatcat cgtgtacacg      420
gaacttccaa atgctgagtc cagatccaaa gttgtctcct gcccatgagc a              471

```

<210> 85
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 85

```

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1              5              10              15

```

```

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

```

```

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

```

```

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
    50              55              60

```

```

Gln Gln Gly Gln Asn Pro Ala His Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn
65              70              75              80

```

```

Ala Ala Val Met Asp Gln Glu Ser Ala Gly Asn Arg Thr Ala Asn Ser
                85              90              95

```

```

Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Thr Gln Leu
                100              105              110

```

```

Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg Pro Ser Gln Arg
    115              120              125

```

```

Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Ile Ile Val Tyr Thr Glu Leu Pro Asn
    130              135              140

```

```

Ala Glu Ser Arg Ser Lys Val Val Ser Cys Pro
145              150              155

```

<210> 86

ES 2 711 629 T3

<211> 618
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 86

atgaagtgga aggcgcctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag	60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc	120
atgtatggtg tcattctcac tgccttgttc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac	180
gccccgcgt tccagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	240
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	300
agccggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	360
gcccacgcgt ggtgctccaa caaaaaaat gctgcggtaa tggaccaaga gtctgcagga	420
aacagaacag cgaatagcga ggactctgat gaacaagacc ctcaggaggt gacatacaca	480
cagttgaatc actgcgtttt cacacagaga aaaatcactc gcccttctca gaggcccaag	540
acacccccaa cagatatcat cgtgtacacg gaacttccaa atgctgagtc cagatccaaa	600
gttgtctcct gcccatga	618

<210> 87
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 87

15

ES 2 711 629 T3

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

<210> 88
 <211> 708
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 88

ES 2 711 629 T3

atgaagtgga aggcgcctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag	60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc	120
atctatggtg tcattctcac tgccttggtc ctgagagtga agttcagcag gagcgagac	180
gaaaaagcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	240
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	300
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	360
gccttcagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt	420
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acccatcgct ggtgctcaa caaaaaaat	480
gctgcggtaa tggaccaaga gtctgcagga aacagaacag cgaatagcga ggactctgat	540
gaacaagacc ctcaggaggt gacatacaca cagttgaatc actgcgtttt cacacagaga	600
aaaatcactc gcccttctca gaggcccaag acacccccaa cagatatcat cgtgtacacg	660
gaacttccaa atgctgagtc cagatccaaa gttgtctcct gcccatga	708

<210> 89
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 89

5

ES 2 711 629 T3

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

<210> 90
 <211> 492
 <212> ADN

ES 2 711 629 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 90

```

atgaagtgga aggcgcgtttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag      60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggctgg aatcctcttc      120
atctatggtg tcattctcac tgccttggtc ctgagagtga agttcagcag gagcgagac      180
gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga      240
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg      300
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag      360
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt      420
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg      480
5  cccctcgt aa                                                                492

```

<210> 91

<211> 163

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 91

```

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1          5          10          15

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

Tyr Leu Leu Ala Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
          35          40          45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
          50          55          60

```

ES 2 711 629 T3

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
145 150 155 160

Pro Pro Arg

<210> 92
<211> 492
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 92

atgaagtgga aggcgctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagtggcc gattacagag 60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc 120
atctatggtg tcattctcac tgccttggtc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 180
gccccgcgt tccagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 240
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 300
agaaggaaga accctcagga aggctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 360
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 420
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg 480
ccccctcgt aa 492

<210> 93
<211> 163
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 93

ES 2 711 629 T3

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

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

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

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Phe Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
145 150 155 160

Pro Pro Arg

<210> 94

<211> 492

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 94

5

ES 2 711 629 T3

atgaagtgga aggcgctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag	60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc	120
atctatggtg tcattctcac tgccttggtc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac	180
gccccgcgt tccagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga	240
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg	300
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag	360
gccttcagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt	420
 taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg	480
ccccctcgct aa	492

<210> 95
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 95

5

ES 2 711 629 T3

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

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

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

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Phe Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys
115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
145 150 155 160

Pro Pro Arg

<210> 96

<211> 465

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 96

5

10

atgaagtgga aggcgcctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag

60

gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc 120
atctatggtg tcattctcac tgccttgttc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 180
gccccgcgt tccagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 240
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 300
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 360
gccttcagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 420
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac accttcgacg ccctt 465

<210> 97
<211> 155
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 97

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

<210> 98
<211> 363
<212> ADN

ES 2 711 629 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 98

```

atgaagtgga aggcgctttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag      60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc      120
atctatggtg tcattctcac tgccttggtc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac      180
gccccgcgt tccagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga      240
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg      300
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag      360
5 gcc                                                                363

```

<210> 99

<211> 121

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 99

```

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1          5          10          15

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

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

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Phe
          50          55          60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65          70          75          80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
          85          90          95

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
          100          105          110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
          115          120

```

<210> 100

<211> 453

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 100

ES 2 711 629 T3

```

atgaagtgga aggcgcgtttt caccgcggcc atcctgcagg cacagttgcc gattacagag      60
gcacagagct ttggcctgct ggatcccaaa ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc      120
atctatgggtg tcattctcac tgccttggtc ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac      180
gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga      240
gaggagtacc atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg      300
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag      360
gccttcagtg agattgggat gaaaggagcg cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt      420
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acc                                     453

```

<210> 101
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 101

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

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

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

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Phe Ser Glu Ile Gly Met Lys
115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
145 150

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir uno o más linfocitos T primarios humanos modificados, que comprende expresar en uno o más linfocitos T primarios humanos al menos una molécula inhibidora de TCR (TIM) codificada mediante una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 72, 74, 76, y 78.
2. El método de la reivindicación 1, donde el ácido nucleico codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 77 o 79.
3. El método de la reivindicación 1, donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona de la SEQ ID NO: 76 o 78.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el linfocito T está diseñado adicionalmente para expresar un receptor quimérico dirigido a tumores.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la TIM desestabiliza el complejo TCR mediante la reducción o el bloqueo de la expresión de los componentes del complejo TCR.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde los linfocitos T primarios humanos modificados no provocan una respuesta reducida de la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) en un receptor humano histoincompatible en comparación con la respuesta de GVHD provocada por uno o más linfocitos T primarios humanos que no expresan la al menos una molécula inhibidora de TCR (TIM).
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde los linfocitos T primarios humanos modificados no provocan una respuesta GVHD en un sujeto humano.
8. Un linfocito o linfocitos T primarios humanos modificados producidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Una composición farmacéutica que comprende un linfocito o linfocitos T primarios humanos modificados de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Un linfocito o linfocitos T primarios humanos modificados de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en terapia.
11. El linfocito o linfocitos T primarios humanos modificados de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento del cáncer.
12. Un vector para modificar linfocitos T primarios humanos que contiene un ácido nucleico que codifica el polipéptido CD3-zeta truncado de SEQ ID NO: 77 o 79.
13. El vector de la reivindicación 12, donde la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido CD3-zeta truncado es la SEQ ID NO: 76 o 78.
14. Un linfocito T humano que expresa el polipéptido CD3-zeta truncado de SEQ ID NO: 77 o 79.

Figura 1

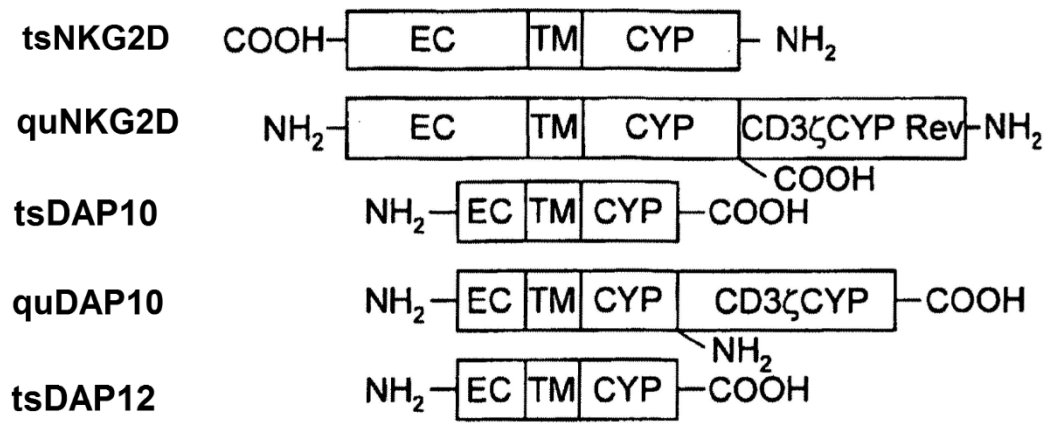


Figura 2

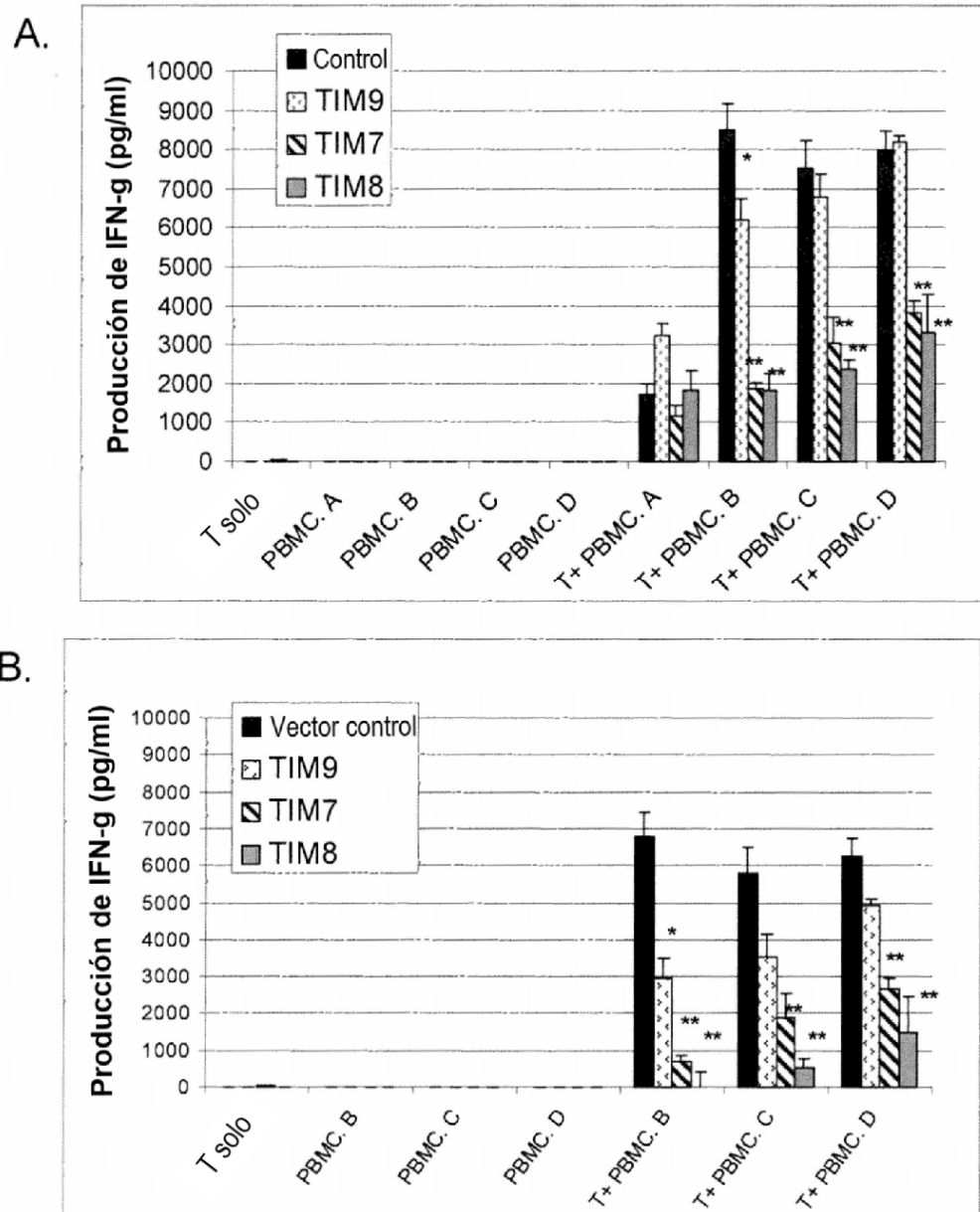


Figura 3

