

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 549**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 35/14 (2015.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2014 PCT/US2014/029943**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153270**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2014 E 14722469 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2970482**

54 Título: **Tratamiento del cáncer utilizando un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado**

30 Prioridad:

16.03.2013 US 201361802629 P
24.06.2013 US 201361838537 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2019

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH y
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (50.0%)

72 Inventor/es:

BROGDON, JENNIFER;
JUNE, CARL H.;
LOEW, ANDREAS;
MAUS, MARCELA y
SCHOLLER, JOHN

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 734 549 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

Tratamiento del cáncer utilizando un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 humanizado

5 **[0001]** Esta solicitud reivindica prioridad de la US No de serie: 61/802.629, presentada el 16 de marzo de 2013 y la US No de Serie: 61/838.537 presentada el 24 de junio de 2013.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 **[0002]** La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 14 de marzo de 2014, se denomina N2067-7002WO_SL.txt y tiene 228.415 bytes de tamaño.

CAMPO DE LA INVENCION

15 **[0003]** La presente invención se refiere en general al uso de células T modificadas genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) para tratar una enfermedad asociada con la expresión de la proteína del Cluster de Diferenciación 19 (CD19).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 **[0004]** Muchos de los pacientes con neoplasias de células B son incurables con la terapia estándar. Además, las opciones de tratamiento tradicionales a menudo tienen efectos secundarios graves. Se han hecho intentos en la inmunoterapia del cáncer, sin embargo, varios obstáculos hacen de este un objetivo muy difícil para lograr efectividad clínica. Aunque se han identificado cientos de los denominados antígenos tumorales, éstos se derivan generalmente de uno mismo y por lo tanto son poco inmunogénicos. Además, los tumores utilizan varios mecanismos para hacer que ellos mismos sean hostiles a la iniciación y propagación del ataque inmunitario.

25 **[0005]** Los acontecimientos recientes utilizando terapia de células T autólogas (CART) modificadas con receptor de antígeno quimérico (CAR), que se basa en la reorientación de las células T a una molécula de la superficie celular adecuada en las células cancerosas, tales como tumores malignos de células B, muestran resultados prometedores en el aprovechamiento del poder del sistema inmune para tratar tumores malignos de células B y otros tipos de cáncer (véase, por ejemplo, Sadelain et al, Cancer Discovery 3: 388-398 (2013)). Los resultados clínicos de el CART19 derivado de murino (es decir, "CTL019") se han mostrado prometedores en el establecimiento de remisiones completas en pacientes que sufren de CLL, así como en la ALL infantil (véase, por ejemplo, Kalos et al, Sci Transl Med. 3: 95ra73 (2011), Porter et al, NEJM 365: 725-733 (2011), Grupp et al, NEJM 368: 1509-1518 (2013)). Además de la capacidad del receptor de antígeno quimérico en las células T modificadas genéticamente para reconocer y destruir las células diana, una terapia exitosa con células T necesita tener la capacidad de proliferar y persistir en el tiempo, y para controlar aún más los escapes de células leucémicas. La calidad variable de las células T si es un resultado de la anergia, la supresión o agotamiento tendrá efectos sobre el rendimiento de las células T transformadas con CAR, pero para la que los médicos expertos tienen un control limitado sobre ello actualmente. Para ser eficaz, las células T de pacientes transformadas con CAR necesitan persistir y mantener la capacidad de proliferar en respuesta al antígeno del CAR. Se ha demostrado que las células T de pacientes con ALL pueden hacer esto con CART19 que comprende un scFv murino (véase, por ejemplo, Grupp et al, NEJM 368: 1509-1518 (2013)). WO2009/091826 se refiere a composiciones y procedimientos relacionados con un receptor de antígeno quimérico específico de CD19 humano. En Brentjens et al, Hematology (2012); 2012: 145-151, se describen terapias celulares para la leucemia que implican el uso de las células T modificadas con CAR dirigidas al antígeno CD19. WO2010/095031 se refiere a anticuerpos humanizados que se unen a CD19 y sus usos. En Zhao et al, J Immunol (2009); 183: 5563-5574 se describe un receptor de antígeno quimérico basado en Herceptin con dominios de señalización modificados.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

30 **[0006]** La invención se dirige a controlar una respuesta inmunitaria en pacientes proporcionando fragmentos de anticuerpos optimizados y humanizados (por ejemplo, scFv) que se unen a la proteína del Cluster de Diferenciación 19 (CD19) integrada en una construcción de receptor de antígeno quimérico (CAR) que no va a provocar una respuesta inmunitaria en los pacientes, es segura de usar a largo plazo y mantiene o tiene mejor eficacia clínica en comparación con la terapia CART conocida para el tratamiento de los cánceres derivados de células B. La invención además se refiere al uso de las células T modificadas genéticamente para expresar un fragmento de anticuerpo humanizado que se une a CD19 integrada en un CAR para el tratamiento de un cáncer hematológico asociado con la expresión de CD19 (OMIM Acc. No. 107265, Swiss Prot. Acc No. P15391).

35 **[0007]** En un aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en la que el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-CD19 humanizado, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un

dominio primario de señalización). En un ejemplo, el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en el presente documento, un dominio transmembrana descrito en el presente documento y un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio primario de señalización).

[0008] En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado codificado comprende una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1), la región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD 19 humanizado descrito en el presente documento y/o una o más (por ejemplo, las tres) la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD 19 humanizado descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD 19 humanizado que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende al menos HC CDR2. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado codificado comprende una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD 19 humanizado descrito en el presente documento, por ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado codificado tiene dos regiones de cadena pesada variables, comprendiendo cada una una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende al menos HC CDR2. En un ejemplo, la región variable de cadena ligera codificada comprende una, dos, tres o las cuatro regiones de estructura ("framework") de la secuencia de la línea germinal VK3_L25. En un ejemplo, la región variable de la cadena ligera codificada tiene una modificación (por ejemplo, una sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 58, por ejemplo, una sustitución en una o más de las posiciones 71 y 87). En un ejemplo, la región variable de la cadena pesada codificada comprende una, dos, tres o las cuatro regiones de estructura de la secuencia de la línea germinal VH4_4-59. En un ejemplo, la región variable de la cadena pesada codificada tiene una modificación (por ejemplo, una sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58, por ejemplo, una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73 y 78). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado codificado comprende una región variable de cadena ligera humanizada descrita en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3) y/o una región variable de cadena pesada humanizada descrita en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado codificado comprende una región de la cadena pesada variable humanizada descrita en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3), por ejemplo, al menos dos regiones variables de cadena pesada humanizadas descritas en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 codificado es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 codificado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con una identidad del 95-99% de las mismas. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, o una secuencia con una identidad del 95-99% con las mismas. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado codificado es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 3, está unida a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 3, a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador descrito en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado codificado incluye un enlazador (Gly₄-Ser)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, o 6, preferiblemente 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador-región variable de cadena ligera.

[0009] En un ejemplo, el dominio transmembrana codificado es un dominio transmembrana de una proteína

seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD27, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En un ejemplo, el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15. En un ejemplo, el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 56, o una secuencia con una 95-99% de identidad de la misma.

[0010] En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 codificado está conectado al dominio de transmembrana por una región bisagra, por ejemplo, una región bisagra descrita en el presente documento. En un ejemplo, la región bisagra codificada comprende la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47, o una secuencia con una identidad del 95-99% de las mismas. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica la región bisagra comprende una secuencia de SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 48, o una secuencia con una identidad del 95-99% de las mismas.

[0011] En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador. En un ejemplo, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional obtenido a partir de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137). En un ejemplo, el dominio coestimulador codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16. En un ejemplo, el dominio coestimulador codificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 60, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada comprende además una secuencia que codifica un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización funcional de CD27 y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, en el que las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una sola cadena polipeptídica. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 60, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma, y/o una secuencia de SEQ ID NO: 101 o la SEQ ID NO: 44, o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 52, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma, y/o una secuencia de SEQ ID NO: 101 o la SEQ ID NO: 44, o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas.

[0012] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una construcción de CAR que comprende una secuencia líder, por ejemplo, una secuencia líder descrita en el presente documento, por ejemplo, de SEQ ID NO: 13; un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende una LC CDR1, una LC CDR2, una LC CDR3, una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en la Tabla 3, o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas; una región bisagra descrita en el presente documento, por ejemplo, de SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45; un dominio transmembrana descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio transmembrana que comprende la SEQ ID NO: 15; y un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio coestimulador descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio coestimulador de 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51, y/o un dominio primario de señalización, por ejemplo, un dominio primario de señalización descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio estimulador de CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la construcción de CAR incluye una secuencia líder codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 54, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la construcción de CAR

incluye una secuencia de dominio de unión anti-CD 19 humanizado codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la construcción de CAR incluye una secuencia transmembrana codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 56, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la construcción de CAR incluye una secuencia de dominio de señalización intracelular codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 60, o una secuencia con un 95-99% de identidad de la misma y/o una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 101 o la SEQ ID NO: 44, o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas.

[0013] En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada comprende (por ejemplo, consiste en) un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de CAR de la SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, 10, 15, 20 o 30 modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 60, 50 o 40 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42.

[0014] En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada comprende (por ejemplo, consiste en) una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, o SEQ ID NO: 96 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, o SEQ ID NO: 96.

[0015] En un aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un dominio de unión anti-CD 19 humanizado, en el que el dominio de unión anti-CD 19 comprende una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 1 (LC CDR1), la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 2 (LC CDR2), y la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en el presente documento, y una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende al menos HC CDR2. En un ejemplo, la región variable de cadena ligera comprende una, dos, tres o las cuatro regiones de estructura de la secuencia de la línea germinal VK3_L25. En un ejemplo, la región variable de cadena ligera tiene una modificación (por ejemplo, una sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de cadena ligera murina de SEQ ID NO: 58, por ejemplo, una sustitución en una o más de las posiciones 71 y 87). En un ejemplo, la región variable de la cadena pesada comprende una, dos, tres o las cuatro regiones de estructura de la secuencia de la línea germinal VH4_4-59. En un ejemplo, la región variable de la cadena pesada tiene una modificación (por ejemplo, una sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de cadena pesada murina de la SEQ ID NO: 58, por ejemplo, una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73 y 78). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado codificado comprende una región variable de cadena ligera descrita en el presente documento (por ejemplo, en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12) y/o una región variable de cadena pesada descrita en el presente documento (por ejemplo, en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado codificado es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO:

64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas.

[0016] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de polipéptido aislada codificada por la secuencia de ácido nucleico. En un ejemplo, la molécula de polipéptido aislada comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42. En un ejemplo, el polipéptido aislado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 31. En un ejemplo, el polipéptido aislado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 32. En un ejemplo, la molécula de polipéptido aislada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 35. En un ejemplo, la molécula de polipéptido aislada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 36. En un ejemplo, la molécula de polipéptido aislada comprende una secuencia de SEQ ID NO: 37.

[0017] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) aislada que comprende un dominio de unión anti-CD 19 humanizado (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente a CD19), un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio primario de señalización). En un ejemplo, el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente a CD19 tal como se describe en el presente documento), un dominio transmembrana descrito en el presente documento y un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio primario de señalización descrito en el presente documento).

[0018] En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 1 (LC CDR1), la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 2 (LC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en el presente documento, y una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende al menos HC CDR2. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en el presente documento, por ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado tiene dos regiones variables de cadena pesada que comprende cada una una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende al menos HC CDR2. En un ejemplo, la región variable de cadena ligera comprende una, dos, tres o las cuatro regiones de estructura de la secuencia de la línea germinal VK3_L25. En un ejemplo, la región variable de cadena ligera tiene una modificación (por ejemplo, una sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de cadena ligera murina de SEQ ID NO: 58, por ejemplo, una sustitución en una o más de las posiciones 71 y 87). En un ejemplo, la región variable de cadena pesada comprende una, dos, tres o las cuatro regiones de estructura de la secuencia de la línea germinal VH4_4-59. En un ejemplo, la región variable de cadena pesada tiene una modificación (por ejemplo, una sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de cadena pesada murina de la SEQ ID.

[0019] NO: 58, por ejemplo, una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73 y 78). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una región variable de cadena ligera descrita en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3) y/o una región variable de cadena pesada descrita en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID

NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 3, está unida a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 3, a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador descrito en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado incluye un enlazador (Gly₄-Ser)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, o 6, preferiblemente 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador-región variable de cadena ligera.

[0020] En un ejemplo, la molécula de CAR aislada comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En un ejemplo, el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15. En un ejemplo, el dominio transmembrana comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

[0021] En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado se conecta al dominio de transmembrana mediante una región bisagra, por ejemplo, una región bisagra descrita en el presente documento. En un ejemplo, la región bisagra codificada comprende SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45, o una secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas.

[0022] En un ejemplo, la molécula de CAR aislada comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio coestimulador descrito en el presente documento. En un ejemplo, el dominio coestimulador comprende un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 4-1BB (CD137). En un ejemplo, el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16. En un ejemplo, el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 51. En un ejemplo, el dominio coestimulador comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51.

[0023] En un ejemplo, la molécula de CAR aislada comprende además una secuencia que codifica un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 43. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de CD27 y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 51 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 51 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 43. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y la secuencia de la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, en el que las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una sola cadena polipeptídica.

[0024] En un ejemplo, la molécula de CAR aislada comprende además una secuencia líder, por ejemplo, una secuencia líder descrita en el presente documento. En un ejemplo, la secuencia líder comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

[0025] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de CAR aislada que comprende una secuencia líder, por ejemplo, una secuencia líder descrita en el presente documento, por ejemplo, una secuencia líder de la SEQ ID NO: 13, o que tiene un 95-99% de identidad de la misma; un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende una LC CDR1, una LC CDR2, una LC CDR3, una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en la Tabla 3, o una

secuencia con un 95-99% de identidad de las mismas; una región bisagra, por ejemplo, una región bisagra descrita en el presente documento, por ejemplo, una región bisagra de la SEQ ID NO: 14 o que tiene un 95-99% de identidad de la misma; un dominio transmembrana, por ejemplo, un dominio transmembrana descrita en el presente documento, por ejemplo, un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15 o una secuencia que tiene un 95-99% de identidad de la misma; un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio coestimulador y/o un dominio primario de señalización). En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio coestimulador descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio coestimulador de 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51, o que tiene un 95-99 % de identidad de las mismas, y/o un dominio primario de señalización, por ejemplo, un dominio primario de señalización descrita en el presente documento, por ejemplo, un dominio de estimulación de CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, o que tiene un 95-99% de identidad de las mismas.

[0026] En un ejemplo, la molécula de CAR aislada comprende (por ejemplo, consiste en) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO : 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, 10, 15, 20 o 30 modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 60, 50 o 40 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO : 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 , SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42.

[0027] En un aspecto, la presente descripción se refiere a un dominio de unión anti-CD 19 humanizado que comprende una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 1 (LC CDR1), la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 2 (LC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 descrito en el presente documento, y una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD19 humanizado descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado tiene al menos HC CDR2. En un ejemplo, la región variable de cadena ligera comprende una, dos, tres o las cuatro regiones de estructura de la secuencia de la línea germinal VK3_L25. En un ejemplo, la región variable de cadena ligera tiene una modificación (por ejemplo, una sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentra en la posición correspondiente en la región variable de la cadena ligera murina de SEQ ID NO: 58, por ejemplo, una sustitución en una o más de las posiciones 71 y 87). En un ejemplo, la región variable de la cadena pesada comprende una, dos, tres o las cuatro regiones de estructura de la secuencia de la línea germinal VH4_4-59. En un ejemplo, la región variable de la cadena pesada tiene una modificación (por ejemplo, una sustitución, por ejemplo, una sustitución de uno o más aminoácidos que se encuentran en la posición correspondiente en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 58, por ejemplo, una sustitución en una o más de las posiciones 71, 73 y 78). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una región variable de cadena ligera descrita en el presente documento (por ejemplo, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12) y/o una región variable de cadena pesada descrita en el presente documento (por ejemplo, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 , SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:

5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

[0028] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR. En un ejemplo, el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector de lentivirus, un vector adenoviral o un vector de retrovirus.

[0029] En un ejemplo, el vector es un vector de lentivirus. En un ejemplo, el vector comprende además un promotor. En un ejemplo, el promotor es un promotor EF-1. En un ejemplo, el promotor EF-1 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 100.

[0030] En un ejemplo, el vector es un vector transcrito in vitro, por ejemplo, un vector que transcribe el ARN de una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además una cola de poli (A), por ejemplo, una cola de poli A descrita en el presente documento, por ejemplo, que comprende aproximadamente 150 bases de adenosina (SEQ ID NO: 104). En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además un 3'UTR, por ejemplo, 3' UTR descrita en el presente documento, por ejemplo, que comprende al menos una repetición de una 3'UTR derivada de beta-globulina humana. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además un promotor, por ejemplo, un promotor T2A.

[0031] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una célula que comprende el vector. En un ejemplo, la célula es una célula T humana. En un ejemplo, la célula es una célula descrita en el presente documento, por ejemplo, una célula T humana, por ejemplo, una célula T humana descrita en el presente documento. En un ejemplo, la célula T humana es una célula T CD8+.

[0032] En otro ejemplo, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede expresar además otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. En un ejemplo, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, por ejemplo, una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora, tal como PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 y TIGIT, o un fragmento de cualquiera de éstas (por ejemplo, al menos una porción del dominio extracelular de cualquiera de éstas), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, CD27 o CD28, por ejemplo, como se describe en el presente documento) y/o un dominio primario de señalización (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento). En un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, al menos una porción del dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización de CD3 zeta descrito en el presente documento).

[0033] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de fabricación de una célula que comprende transducir una célula T con un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CAR, por ejemplo, un CAR descrito en el presente documento.

[0034] La presente descripción también proporciona un procedimiento de generación de una población de células modificadas con ARN, por ejemplo, células descritas en el presente documento, por ejemplo, células T, que expresan transitoriamente ARN exógeno. El procedimiento comprende introducir un ARN transcrito in vitro o ARN sintético en una célula, en el que el ARN comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR descrita en el presente documento.

[0035] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de una célula que comprende una molécula de CAR, por ejemplo, una célula que expresa una molécula de CAR descrita en el presente documento. En un ejemplo, la célula es una célula T autóloga. En un ejemplo, la célula es una célula T alogénica. En un ejemplo, el mamífero es un ser humano.

[0036] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de un mamífero que tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD 19, que comprende administrar al mamífero una cantidad efectiva de la célula que comprende una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento.

[0037] En un ejemplo, la enfermedad asociada con la expresión de CD19 se selecciona de una enfermedad proliferativa, tal como un cáncer o tumor maligno o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia, o es una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la

expresión de CD19. En un ejemplo, la enfermedad es un cáncer hematológico. En un ejemplo, el cáncer hematológico es la leucemia. En un ejemplo, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en uno o más de leucemias agudas incluyendo ,pero no limitado a, la leucemia linfoide aguda de células B ("BALL"), leucemia linfoide aguda de células T ("TALL"), leucemia linfoide aguda (ALL); una o más leucemias crónicas incluyendo, pero no limitado a, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos adicionales o condiciones hematológicas, incluyendo, pero no limitado a, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o células grandes, afecciones linfoproliferativas malignos, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasma de células dendríticas plasmacitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom, y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y a enfermedad asociada con la expresión de CD 19 incluyen, pero no limitado a, cánceres atípicos y/o no clásicos, malignidades, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan CD 19; y cualquier combinación de las mismas.

[0038] En un ejemplo, la infusión de linfocitos, por ejemplo infusión de linfocitos alogénicos, se utiliza en el tratamiento del cáncer, en el que la infusión de linfocitos comprende al menos una célula que expresa CAR contra CD19. En un ejemplo, la infusión de linfocitos autólogos se utiliza en el tratamiento del cáncer, en el que la infusión de linfocitos autólogos comprende al menos una célula que expresa CD19.

[0039] En un ejemplo, la célula que expresa CAR contra CD19, por ejemplo, células T, se administra a un sujeto que ha recibido un trasplante de células madre anteriormente, por ejemplo, un trasplante autólogo de células madre.

[0040] En un ejemplo, la célula que expresa CAR contra CD19, por ejemplo, células T, se administra a un sujeto que ha recibido una dosis previa de melfalán.

[0041] En un ejemplo, las células que expresan una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, se administran en combinación con un agente que aumenta la eficacia de una célula que expresa una molécula de CAR, por ejemplo, un agente descrito en el presente documento.

[0042] En un ejemplo, las células que expresan una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, se administran en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula de CAR, por ejemplo, un agente descrito en el presente documento.

[0043] En un ejemplo, las células que expresan una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, se administran en combinación con un agente que trata la enfermedad asociada con CD19, por ejemplo, un agente descrito en el presente documento.

[0044] En un ejemplo, las células que expresan una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, se administran a una dosis y/o programa de dosificación descrito en el presente documento.

[0045] En un ejemplo, la molécula de CAR se introduce en las células T, por ejemplo, utilizando la transcripción in vitro, y el sujeto (por ejemplo, humano) recibe una administración inicial de células que comprenden una molécula de CAR, y una o más administraciones posteriores de células que comprenden una molécula de CAR, en el que las una o más administraciones posteriores se administran menos de 15 días, por ejemplo, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 días después de la administración anterior. En un ejemplo, más de una administración de células que comprenden una molécula de CAR se administra al sujeto (por ejemplo, humano) por semana, por ejemplo, 2, 3, o 4 administraciones de células que comprenden una molécula de CAR se administran por semana. En un ejemplo, el sujeto (por ejemplo, sujeto humano) recibe más de una administración de células que comprenden una molécula de CAR por semana (por ejemplo, 2, 3 o 4 administraciones por semana) (también denominado aquí como un ciclo), seguido de una semana de ninguna administración de células que comprenden una molécula de CAR, y a continuación una o más administraciones adicionales de células que comprenden una molécula de CAR (por ejemplo, más de una administración de las células que comprenden una molécula de CAR por semana) se administran al sujeto. En otro ejemplo, el sujeto (por ejemplo, sujeto humano) recibe más de un ciclo de células que comprenden una molécula de CAR, y el tiempo entre cada ciclo es menor de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, o 3 días. En un ejemplo, las células que comprenden una molécula de CAR se administran cada dos días durante 3 administraciones por semana. En un ejemplo, las células que comprenden una molécula de CAR se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

[0046] En un ejemplo, las células que expresan una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, se administran como una primera línea de tratamiento para la enfermedad, por ejemplo, el cáncer, por ejemplo, el cáncer descrito en el presente documento. En otro ejemplo, las células que expresan una molécula de CAR, por ejemplo, una molécula de CAR descrita en el presente documento, se administran como una

segunda, tercera, cuarta línea de tratamiento para la enfermedad, por ejemplo, el cáncer, por ejemplo, el cáncer descrito en el presente documento.

[0047] En un ejemplo, se administra una población de células descritas en el presente documento.

5 **[0048]** En otro aspecto, la presente descripción se refiere a la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un CAR de la descripción, la molécula de polipéptido aislado de un CAR de la descripción, el vector que comprende un CAR de la descripción, y la célula que comprende un CAR de la descripción para su uso como un medicamento.

10 **[0049]** En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un CAR de la descripción, la molécula de polipéptido aislada de un CAR de la descripción, el vector que comprende un CAR de la descripción, y la célula que comprende un CAR de la descripción para su uso en el tratamiento de una enfermedad que expresa CD19.

15 **[0050]** En un aspecto, la presente descripción incluye una población de células autólogas que son transfectadas o transducidas con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de CAR contra CD19, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el vector es un vector retroviral. En un ejemplo, el vector es un vector lentiviral de auto-inactivante, tal como se describe en otra parte en el presente documento. En un ejemplo, se libera el vector (por ejemplo, mediante transfección o electroporación) a una
20 célula, por ejemplo, una célula T, en el que el vector comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de CAR contra CD19, tal como se describe en el presente documento, que se transcribe como una molécula de ARNm, y la molécula de CAR contra CD19 se traduce de la molécula de ARN y se expresa en la superficie de la célula.

25 **[0051]** En otro aspecto, la presente descripción proporciona una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células CART. En algunos casos, la población de células que expresan CAR comprende una mezcla de células que expresan diferentes CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, la población de células CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión anti-CD19 descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión a anti-CD19 diferente, por ejemplo, un
30 dominio de unión anti-CD19 descrito en el presente documento que difiere del dominio de unión anti-CD19 en el CAR expresado por la primera célula. Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión a anti-CD19, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión a antígeno para una diana distinta de CD19 (por ejemplo, CD123). En un ejemplo, la población de células que
35 expresan CAR incluye, por ejemplo, una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio primario de señalización intracelular y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundaria.

40 **[0052]** En otro aspecto, la presente descripción proporciona una población de células en la que al menos una célula en la población expresa un CAR que tiene un dominio anti-CD19 descrito en el presente documento y una segunda célula que expresa otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. En un ejemplo, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, por ejemplo, una
45 molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento. En un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora, tal como PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 y TIGIT, o un fragmento de cualquiera de éstas (por ejemplo, al menos una parte de un dominio extracelular de cualquiera de éstas), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, CD27 o CD28, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento) y/o un dominio primario de
50 señalización (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento). En un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, al menos una porción del dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización CD3 zeta descrito en el presente documento).

55 **[0053]** En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de CAR contra CD19, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, se expresa como una molécula de ARNm. En un ejemplo, las células que expresan CAR contra CD19 modificadas genéticamente, por ejemplo, las células T, pueden generarse mediante la transfección o electroporación de una molécula de ARN que codifica los CAR deseados (por ejemplo, sin una secuencia de vector) en la célula. En un ejemplo, una molécula de CAR contra CD19 se traduce de la molécula de ARN, una vez que se incorpora y expresa en la superficie de la célula recombinante.

65 **[0054]** Ciertos ejemplos de la presente descripción proporcionan realizaciones de la presente invención. Más particularmente, la presente invención proporciona lo siguiente:

1. Un dominio de unión anti-CD19 humanizado, en el que dicho dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una secuencia de aminoácidos de un scFv seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en la que el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-CD19 humanizado, tal como se define en 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulante.
3. La molécula de ácido nucleico aislada de 2, que comprende:
- (i) una secuencia de ácido nucleico de un dominio de unión anti-CD19 humanizado de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO : 72, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas;
 - (ii) un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de CAR de la SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con las mismas; y/o
 - (iii) una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, o SEQ ID NO: 96, o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95% de identidad con la misma.
4. La molécula de ácido nucleico aislada de 2 o 3, en la que:
- (i) el CAR codificado incluye un dominio transmembrana que comprende un dominio de transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154;
 - (ii) el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15;
 - (iii) el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
 - (iv) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 56, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma; y/o
 - (v) el dominio de unión anti-CD19 codificado está conectado al dominio transmembrana por una región bisagra, opcionalmente en la que:
 - (a) la región bisagra codificada comprende SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 102, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas; o
 - (b) la secuencia de ácido nucleico que codifica la región bisagra comprende una secuencia de SEQ ID NO: 55, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.
5. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de 2 a 4, que comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio coestimulador que es un dominio de señalización funcional obtenido a partir de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), y 4-1BB (CD137), opcionalmente en la que:
- (i) el dominio coestimulador codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16;
 - (ii) el dominio coestimulador codificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o
 - (iii) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 60, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.
6. La molécula de ácido nucleico aislada de una cualquiera de 2 a 5, en la que:
- (i) el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta;
 - (ii) el dominio de señalización intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43;
 - (iii) el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43;
 - (iv) el dominio de señalización intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 y la secuencia de la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, en el que las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una cadena polipeptídica única;
 - (v) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 60, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma, y/o una secuencia de SEQ ID NO: 101

o la SEQ ID NO: 44 , o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas; y/o

(vi) dicha molécula de ácido nucleico aislada codifica además una secuencia líder, opcionalmente en la que la secuencia líder comprende la SEQ ID NO: 13, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

- 5 7. Una molécula de polipéptido aislada codificada por la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de 2-6.
8. Una molécula receptor de antígeno quimérico (CAR) aislada que comprende un dominio de unión anti-CD19 humanizado de 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular.

10 9. La molécula de CAR aislado de 8, en la que:

(i) dicho CAR es un CAR tal como se define en una cualquiera de 2-7; o

(ii) dicho CAR comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 , SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas.

10. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR de cualquiera de 1-9, opcionalmente en el que:

(i) el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector de lentivirus, vector adenoviral, o un vector de retrovirus;

(ii) el vector comprende además un promotor, por ejemplo, un promotor EF-1 o un promotor EF-1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 100;

(iii) el vector es un vector transcrito in vitro;

(iv) la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además una cola de poli (A); y/o

(v) la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además un 3'UTR.

11. Una célula que comprende el vector de 10, opcionalmente en el que la célula es una célula T humana, por ejemplo una célula T CD8+.

12. Un procedimiento de:

(i) preparar una célula que comprende transducir una célula T con un vector de 10; o

(ii) generar una población de células modificadas con ARN que comprende introducir un ARN transcrito in vitro o ARN sintético en una célula, en el que el ARN comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR de cualquiera de 1-11.

13. Una célula que expresa una molécula de CAR, en la que dicha molécula de CAR es una molécula de CAR tal como se define en cualquiera de 1-12, para usar en:

(a) un procedimiento para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento administrar al mamífero una cantidad efectiva de la célula que expresa la molécula de CAR, opcionalmente en el que:

(i) la célula es una célula T autóloga;

(ii) la célula es una célula T alogénica; y/o

(iii) la célula se administra a un ser humano; o

(b) un procedimiento de tratamiento de un mamífero que tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD19, comprendiendo dicho procedimiento administrar al mamífero una cantidad eficaz de la célula.

14. La célula, por el uso de 13 (b), en la que:

(i) la enfermedad asociada con la expresión de CD19 se selecciona de una enfermedad proliferativa, tal como un cáncer o tumor maligno o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia, o es una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de CD19;

(ii) la enfermedad es un cáncer hematológico seleccionado del grupo que consiste en uno o más leucemias agudas incluyendo ,pero no limitado a, la leucemia linfoide aguda de células B ("BALL"), leucemia linfoide aguda de células T ("TALL"), leucemia linfoide aguda (ALL); una o más leucemias crónicas incluyendo, pero no limitado a, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos adicionales o condiciones hematológicas, incluyendo, pero no limitado a, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasma de células dendríticas plasmacitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom, y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y a enfermedad asociada con la expresión de CD 19 incluyen, pero no limitado a, cánceres atípicos y/o no clásicos, malignidades, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan CD 19; y cualquier combinación de las mismas;

(iii) las células que expresan una molécula de CAR se administran en combinación con un agente que aumenta la eficacia de una célula que expresa una molécula de CAR;

(iv) las células que expresan una molécula de CAR se administran en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula de CAR; y/o
 (v) las células que expresan una molécula de CAR se administran en combinación con un agente que trata la enfermedad asociada con la expresión CD19.

15. El dominio de unión anti-CD 19 de 1, la molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de 2-6, la molécula de polipéptido aislada de 7, la molécula de CAR aislada de 8 o 9, el vector de 10, o la célula de 11, para usar en el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de CD19, o para usar en el tratamiento del cáncer, por ejemplo un cáncer hematológico.

16. El dominio de unión anti-CD19 de 1, la molécula de ácido nucleico aislada de cualquiera de 2-6, la molécula de polipéptido aislada de 7, la molécula de CAR aislada de 8 o 9, el vector de 10, o la célula de 11, para usar como un medicamento.

17. Una célula de 11, que expresa además una molécula inhibidora que comprende un primer polipéptido que comprende al menos una porción de una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que comprende una señal positiva de un dominio de señalización intracelular, opcionalmente en el que la molécula inhibidora comprende un primer polipéptido que comprende al menos una porción de PD1 y un segundo polipéptido que comprende un dominio coestimulador y un dominio primario de señalización.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0055] Las figuras 1A, 1B y 1C son representaciones gráficas de la citotoxicidad como se ensayó en células T ND317 (donante normal) transducidas con CAR anti-CD19 de ratón o los CAR anti-CD19 humanizados de la invención y cultivadas con células K562 de control que no expresan CD19 (K562cc) tal como se muestra en la figura. 1A, las células K562 transformadas con CD19 (K562.CD19), tal como se muestra en la figura 1B o células malignas B aisladas de un paciente con CLL (aislado de células B Pt 14), tal como se muestra en la figura. 1C.

Las figuras 2A y 2B son gráficos que muestran la respuesta proliferativa de células que expresan anti-CD19CAR humanizado y de ratón a las células CD19+, en los que un mayor número de células T CAR+ viables se correlaciona con poblaciones que muestran la proliferación máxima de células T CD4+ y CD8+ a las células de CLL primarias.

La figura 3 es una representación gráfica de los espectros de masas HPLC desplegados para scFv de la invención, donde la fila superior representa scFv sin tratar y la fila inferior representa el scFv desglucosilada similar.

La figura 4 es una representación gráfica de la estabilidad de la conformación tal como se mide por fluorimetría de barrido diferencial. La Tf de scFv de ratón fue 57°C (línea gruesa). Todas las variantes de scFv humanizadas muestran mayor Tf alrededor de 70°C en comparación con el scFv de ratón parental. Los residuos introducidos por humanización han mejorado la Tf en más de 10°C.

La figura 5 es una representación gráfica de la proliferación de células T transducidas con CD19 CAR, en donde las células CART19 están dirigidas hacia (a) una línea celular de leucemia mielógena crónica ("CML") que es negativa para la expresión de CD19, y por lo tanto se utiliza como un control negativo; (b) células K562 recombinantes positivas para la expresión de CD19, y por lo tanto utilizadas como un control positivo; o (c) a células B Pt14 aisladas de un paciente con CLL y que expresan CD19 en la superficie celular.

Las figuras 6A y 6B son diagramas esquemáticos de CAR representativos.

La figura 7 representa la progresión de la enfermedad ALL primaria HALLX5447 en ratones NSG después del tratamiento con células T CAR transducidas a CD19. El crecimiento de células ALL humanas primarias en ratones NSG después del tratamiento con células T CAR específicas para CD19 demostró el control de la progresión de la enfermedad. El porcentaje promedio de células ALL humanas CD19+ era un indicador de la carga de la enfermedad en la sangre periférica en ratones NSG hasta el día 65 después del implante del tumor. Círculos negros: los ratones tratados con 100 ul de PBS a través de la vena de la cola; cuadrados rojos: los ratones tratados con células T transducidas simuladas; triángulos azules: los ratones tratados con células T transducidas con CD19 CAR murinas; y los triángulos invertidos púrpura: los ratones tratados con células T transducidas con CD19 CAR humanizadas. Significancia calculada por ANOVA; * indica P <0,01.

La figura 8 representa la expresión de CD19 en las células tumorales de un paciente. Las células tumorales CD138+ CD45^{dim} se tiñeron para CD19 (eje x) y CD38 (eje y).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0056] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente

documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la invención.

5 **[0057]** El término "un" y "una" se refiere a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

10 **[0058]** El término "aproximadamente" cuando se refiere a un valor medible, tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca variaciones de $\pm 20\%$ o en algunos casos $\pm 10\%$, o en algunos casos $\pm 5\%$, o en algunos casos $\pm 1\%$, o en algunos casos $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los procedimientos descritos.

15 **[0059]** El término "Receptor de antígeno quimérico" o, alternativamente, un "CAR" se refiere a una construcción de polipéptido recombinante que comprende al menos un dominio de unión a antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplásmico (también denominado aquí como "un dominio de señalización intracelular") que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora, tal como se define a continuación. En un aspecto, la molécula de estimulación es la cadena zeta asociada con el complejo de receptor de células T. En un aspecto, el dominio de señalización citoplásmico comprende además uno o más dominios de señalización funcionales derivados de al menos una molécula coestimuladora, tal como se define a continuación. En un aspecto, la molécula coestimuladora se elige de 4-1BB (es decir, CD137), CD27 y/o CD28. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de señalización funcional derivado de una molécula coestimuladora y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento del antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcionales derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto, el CAR comprende una proteína de fusión quimérica que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende al menos dos dominios de señalización funcionales derivados de una o más moléculas coestimuladoras y un dominio de señalización funcional derivado de una molécula estimuladora. En un aspecto el CAR comprende una secuencia líder opcional en el extremo amino terminal (N-ter) de la proteína de fusión de CAR. En un aspecto, el CAR comprende, además, una secuencia líder en el extremo N-terminal del dominio de reconocimiento de antígeno extracelular, en el que la secuencia líder se escinde opcionalmente del dominio de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, como scFv) durante el procesamiento celular y la localización del CAR en la membrana celular.

40 **[0060]** El término "dominio de señalización" se refiere a la porción funcional de una proteína que actúa mediante la transmisión de información dentro de la célula para regular la actividad celular a través de rutas de señalización definidas mediante la generación de segundos mensajeros o funcionando como efectores mediante la respuesta a tales mensajeros.

45 **[0061]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "CD19" se refiere a la proteína del Cluster de Diferenciación 19, que es un determinante antigénico detectable en las células precursoras de leucemia. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanas y murinas se pueden encontrar en una base de datos pública, tales como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de CD19 humana se puede encontrar como UniProt/Swiss-Prot N° de acceso P15391 y la secuencia de nucleótidos que codifica la CD19 humana se puede encontrar en el N° de Acceso NM_001178098. CD19 se expresa en la mayoría de los cánceres de linaje B, incluyendo, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia de linfocitos crónica y linfoma no Hodgkin. A continuación, se proporcionan otras células que expresan CD19 en la definición de "enfermedad asociada con la expresión de CD19." También es un marcador precoz de progenitores de células B. Véase, por ejemplo, Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-65 (1997). En un aspecto, la porción de unión a antígeno de CART reconoce y se une a un antígeno en el dominio extracelular de la proteína CD19. En un aspecto, la proteína CD19 se expresa en una célula de cáncer.

60 **[0062]** El término "anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína o secuencia de polipéptido derivado de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas policlonales o monoclonales, cadenas múltiples o de una sola cadena, o intactas, y pueden derivar de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden ser tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina.

65 **[0063]** El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a al menos una porción de un anticuerpo intacto, o variantes recombinantes del mismo, y se refiere al dominio de unión a antígeno, por ejemplo, una región variable determinante antigénica de un anticuerpo intacto, que es suficiente para conferir el reconocimiento y la unión específica del fragmento de anticuerpo a una diana, tal como un antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero

no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, fragmentos de anticuerpos scFv, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único, tales como sdAb (ya sea VL o VH), dominios VHH de camélidos y anticuerpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en el que las regiones variables de cadena ligera y pesada están unidas de manera contigua a través de un enlazador polipeptídico flexible corto y es capaz de ser expresado como un polipéptido de cadena única, y en el que el scFv conserva la especificidad del anticuerpo intacto del que deriva. A menos que se especifique, tal como se utiliza en el presente documento, un scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, por ejemplo, con respecto a los extremos N-terminales y C-terminales del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL.

[0064] La porción de la composición de CAR de la invención que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo pueden existir en una variedad de formas en las que el dominio de unión a antígeno se expresa como parte de una cadena polipeptídica contigua incluyendo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), un anticuerpo de cadena única (scFv) y un anticuerpo humanizado (Harlow et al, 1999, en: Using Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al, 1989, en: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al, 1988, Proc Natl Acad Sci USA. 85: 5879-5883; Bird et al, 1988, Science 242: 423-426). En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de una composición de CAR de la invención comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el CAR comprende un fragmento de anticuerpo que comprende un scFv.

[0065] El término "cadena pesada de anticuerpo," se refiere a la mayor de los dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones de origen natural, y que normalmente determina la clase a la que pertenece el anticuerpo.

[0066] El término "cadena ligera de anticuerpo," se refiere a la más pequeña de los dos tipos de cadenas de polipéptidos presentes en las moléculas de anticuerpos en sus conformaciones naturales. Las cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ) se refieren a los dos principales isotipos de cadena ligera de anticuerpo.

[0067] El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un sistema de expresión bacteriófago o de levadura. El término también debe interpretarse en el sentido de un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido utilizando la tecnología recombinante de secuencias de ADN o de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

[0068] El término "antígeno" o "Ag" se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunológicamente competentes específicos, o ambas. El experto en la técnica entenderá que cualquier macromolécula, incluyendo prácticamente todas las proteínas o péptidos, pueden servir como antígeno. Además, los antígenos pueden derivar de ADN recombinante o genómico. Un experto en la técnica entenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifica una proteína que provoca, por lo tanto, una respuesta inmunitaria codifica un "antígeno", tal como se utiliza este término en el presente documento. Además, un experto en la técnica entenderá que un antígeno no tiene que ser codificado exclusivamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es fácilmente evidente que la presente descripción incluye, pero no se limita a, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en varias combinaciones para codificar polipéptidos que provocan la respuesta inmunitaria deseada. Además, un experto en la materia entenderá que un antígeno no tiene que ser codificado en absoluto por un "gen". Es fácilmente evidente que un antígeno se puede generar por síntesis o puede derivar de una muestra biológica, o podría ser macromolécula, además de un polipéptido. Una muestra biológica de este tipo puede incluir, pero no está limitado a, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido con otros componentes biológicos.

[0069] El término "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar por diversos medios, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, una disminución en la proliferación de células tumorales, una disminución en la supervivencia de células tumorales, o una mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención en la prevención de la aparición del tumor en el primer lugar.

[0070] El término "autólogo" se refiere a cualquier material derivado del mismo individuo al que más tarde se le reintroduce.

[0071] El término "alogénico" se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se introduce el material. Dos o más individuos se dice que son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogénico de individuos de la misma especie puede ser suficientemente diferente genéticamente para interactuar antigénicamente.

[0072] El término "xenogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal de una especie diferente.

[0073] El término "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y del sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de diversos tipos de cáncer descritos se describen en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

[0074] La frase "enfermedad asociada con la expresión de CD19" incluye, pero no está limitado a, una enfermedad asociada con la expresión de CD19 o afección asociada con las células que expresan CD19, incluyendo, por ejemplo, enfermedades proliferativas, tales como un cáncer o tumor maligno o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con células que expresan CD19. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico. En un aspecto, el cáncer hematológico es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 incluye cánceres y tumores malignos, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, uno o más aguda leucemias, incluyendo pero no limitado a, por ejemplo, leucemia linfóide aguda de células B ("BALL"), leucemia linfóide aguda de células T ("TALL"), leucemia linfóide aguda (ALL); una o más leucemias crónicas incluyendo, pero no limitado a, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos adicionales o condiciones hematológicas, incluyendo, pero no limitado a, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasma de células dendríticas plasmacitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom, y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y similares. Otras enfermedades asociadas con la expresión de CD19 incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cánceres atípicos y/o no clásicos, tumores malignos, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD19. Las indicaciones no relacionadas con cáncer asociadas con la expresión de CD19 incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, enfermedad autoinmune, (por ejemplo, lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplante.

[0075] El término "secuencia de modificaciones conservadoras" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan de manera significativa o alteran las características de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden ser introducidas en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en el sector, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de un CAR de la invención pueden estar sustituidos por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el CAR alterado puede ensayarse usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

[0076] El término "estimulación", se refiere a una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando afín mediando de este modo un evento de transducción de señales, tal como, pero no limitado a, la transducción de señales a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, tales como regulación por disminución de TGF- β y/o la reorganización de las estructuras del citoesqueleto, y similares.

[0077] El término "molécula estimuladora," se refiere a una molécula expresada por una célula T que proporciona la secuencia o secuencias primarias de señalización citoplasmática que regulan la activación primaria del complejo TCR de una manera estimuladora para al menos algún aspecto de la vía de señalización de células T. En un aspecto, la señal primaria se inicia mediante, por ejemplo, la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, y que conduce a la mediación de una respuesta de células T, incluyendo, pero no limitado a, la proliferación, activación, diferenciación, y similares. Una secuencia primaria de señalización

citoplasmática (también referida como un "dominio primario de señalización") que actúa de una manera estimuladora puede contener un motivo de señalización que se conoce como motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor o ITAM. Ejemplos de un ITAM que contiene la secuencia primaria de señalización citoplásmica que es de uso particular en la invención incluye, pero no se limita a, los derivados de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (también conocido como "ICOS") y CD66d. En un CAR específico de la invención, el dominio de señalización intracelular en una cualquiera o más de CAR de la invención comprende una secuencia de señalización intracelular, por ejemplo, una secuencia primaria de señalización de CD3-zeta. En un CAR específico de la invención, la secuencia primaria de señalización de CD3-zeta es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 17 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono y similares. En un CAR específico de la invención, la secuencia primaria de señalización de CD3-zeta es la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 43, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono y similares.

[0078] El término "célula presentadora de antígenos" o "APC" se refiere a una célula del sistema inmunitario, tal como una célula accesoria (por ejemplo, una célula B, una célula dendrítica, y similares) que muestra un antígeno exógeno complejado con complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Las células T pueden reconocer estos complejos usando sus receptores de células T (TCR). Las APC procesan antígenos y los presentan a células T.

[0079] Un "dominio de señalización intracelular," tal como se utiliza el término en el presente documento, se refiere a una porción intracelular de una molécula. El dominio de señalización intracelular genera una señal que promueve una función efectora inmune de la célula que contiene CAR, por ejemplo, una célula CART. Los ejemplos de la función efectora inmune, por ejemplo, en una célula CART, incluyen la actividad citolítica y la actividad auxiliar, incluyendo la secreción de citoquinas.

[0080] En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio primario de señalización intracelular. Los dominios primarios de señalización intracelular de ejemplo incluyen aquellos derivados de las moléculas responsables de la estimulación primaria o estimulación dependiente de antígeno. En una realización, el dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio intracelular coestimulador. Los dominios de señalización intracelular coestimuladores de ejemplo incluyen los derivados de moléculas responsables de señales coestimuladoras o estimulación independiente de antígeno. Por ejemplo, en el caso de una CART, un dominio primario de señalización intracelular puede comprender una secuencia citoplásmica de un receptor de células T, y un dominio de señalización intracelular coestimulador puede comprender la secuencia citoplasmática de una molécula coreceptora o coestimuladora.

[0081] Un dominio primario de señalización intracelular puede comprender un motivo de señalización que se conoce como un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor o ITAM. Ejemplos de ITAM que contienen secuencias primarias de señalización citoplasmática incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, y CD66d DAP10 y DAP12.

[0082] El término "zeta" o alternativamente "cadena zeta", "CD3-zeta" o "TCR-zeta" se define como la proteína proporcionada como GenBan Acc. No. BAG36664.1, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono y similares, y un "dominio estimulador zeta" o, alternativamente, un "dominio estimulado CD3-zeta" o un "dominio estimulador TCR-zeta" se define como los residuos de aminoácidos del dominio citoplásmico de la cadena zeta que son suficientes para transmitir funcionalmente una señal inicial necesaria para la activación de células T. En un aspecto, el dominio citoplásmico de zeta comprende los residuos 52 a 164 de GenBank Acc. No. BAG36664.1 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono y similares, que son ortólogos funcionales de los mismos. En un aspecto, el "dominio estimulador zeta" o "dominio estimulador CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 17. En un aspecto, el "dominio estimulador zeta" o "dominio estimulador CD3-zeta" es la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 43.

[0083] El término "molécula coestimuladora" se refiere a la pareja de unión afín en una célula T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo una respuesta coestimuladora por la célula T, tal como, pero no limitado a, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de receptores de antígenos o sus ligandos que se requieren para una respuesta inmunitaria eficaz. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, una molécula MHC clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll, así como OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 4-1BB (CD137).

[0084] Un dominio de señalización intracelular coestimulador puede ser la porción intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora puede representarse en las siguientes familias de proteínas: las proteínas del receptor de TNF, las proteínas de tipo inmunoglobulina, receptores de citoquinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM) y receptores de células NK de activación. Ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 41BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares.

[0085] El dominio de señalización intracelular puede comprender la parte intracelular completa o el dominio de señalización intracelular nativa completa, de la molécula de la que se deriva, o un fragmento funcional del mismo.

5 **[0086]** El término "4-1BB" se refiere a un miembro de la superfamilia de TNFR con una secuencia de aminoácidos proporcionada como GenBank Acc. No. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono y similares; y un "dominio coestimulador de 4-1BB" se define como los residuos de aminoácidos 214-255 de GenBank Acc No. AAA62478.2, o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono y similares. En un aspecto, el "dominio coestimulador de 4-1BB" es la secuencia
10 proporcionada como SEQ ID NO: 16 o los residuos equivalentes de una especie no humana, por ejemplo, ratón, roedor, mono y similares.

[0087] El término "que codifica" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (por ejemplo, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por lo tanto, un gen, ADNc, o ARN, codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, la secuencia de nucleótidos de la cual es idéntica a la secuencia de ARNm y que por lo general se proporciona en los listados de secuencias, y la cadena no codificante, usada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden denominarse como codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.
15
20

[0088] A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también pueden incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede en alguna versión contener un intrón o intrones.
25

[0089] El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, tal como se describen en el presente documento, eficaz para conseguir un resultado biológico particular.
30

[0090] El término "endógeno" se refiere a cualquier material de o producen en un organismo, célula, tejido o sistema.

35 **[0091]** El término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido desde o producidos fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

[0092] El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigidas por un promotor.
40

[0093] El término "vector de transferencia" se refiere a una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede ser utilizado para liberar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Numerosos vectores son conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilicos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector de transferencia" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. El término también debe interpretarse que incluye, además, compuestos no plásmidos y compuestos no virales que facilitan la transferencia del ácido nucleico en células, tales como, por ejemplo, un compuesto de polilisina, liposomas, y similares. Los ejemplos de vectores de transferencia virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, y similares.
45
50

[0094] El término "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en un sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, incluyendo cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.
55

[0095] El término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus al ser capaces de infectar células que no se dividen; pueden liberar una cantidad significativa de información genética en el ADN de la célula huésped, por lo que son uno de los procedimientos más eficaces de un vector de liberación de gen. VIH, SIV, FIV y son todos ejemplos de lentivirus.
60

[0096] El término "vector lentiviral" se refiere a un vector derivado de al menos una porción de un genoma de lentivirus, incluyendo especialmente un vector lentiviral de auto-inactivación, según se proporciona en Milone et al., Mol. Ther. 17 (8): 1453-1464 (2009). Otros ejemplos de vectores de lentivirus que pueden ser utilizados en la clínica
65

incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, la tecnología de suministro de genes LENTIVECTOR® de Oxford BioMedica, el sistema vector LENTIMAX™ de Lentigen y similares. Los tipos no clínicos de vectores lentivirales también están disponibles y serían conocidos para un experto en la técnica.

- 5 **[0097]** El término "homólogo" o "identidad" se refiere a la identidad de secuencia de la subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición de subunidad en las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos
- 10 secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50% homólogas; si el 90% de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10), se emparejan o son homólogas, las dos secuencias son 90% homólogas.
- 15 **[0098]** Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo de los mismos son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o fragmento de anticuerpo) en las que residuos de una
- 20 región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, un anticuerpo/fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias
- 25 CDR o de la estructura importadas. Estas modificaciones pueden refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En general, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado del mismo comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o una significativa porción de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El
- 30 anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al, Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al, Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.
- 35 **[0099]** "Completamente humano" se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde toda la molécula es de origen humano o consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo o inmunoglobulina.
- [0100]** El término "aislado" significa alterado o extraído del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislados pueden existir en forma sustancialmente purificada, o pueden existir en un medio no nativo, tal como, por ejemplo, una célula huésped.
- 40 **[0101]** En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que aparecen comúnmente. "A" se refiere a la adenosina, "C" se refiere a la citosina, "G" se refiere a la guanosina, "T" se refiere a la timidina, y "U" se refiere a uridina.
- [0102]** El término "unido operativamente" o "control transcripcional" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da lugar a la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de ADN unidas
- 50 operativamente pueden estar contiguas entre sí y, por ejemplo, cuando es necesario para unir dos regiones codificantes de proteína, están en el mismo marco de lectura.
- [0103]** El término administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (sc), intravenosa (iv), intramuscular (im), o intraesternal, intratumoral, o técnicas de infusión.
- 60 **[0104]** El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservadora del mismo (por ejemplo, sustituciones
- 65

de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNPs, y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) los codones seleccionados están sustituidos por residuos de base mixta y/o residuos desoxinosina (Batzer et al, Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al, J. Biol Chem 260: 2605-2608 (1985); y Rossolini et al, Mol Cell Sondas 8: 91-98 (1994)).

[0105] Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente, y se refieren a un compuesto formado de residuos de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no existe limitación en el número máximo de aminoácidos que puede comprender la secuencia de un péptido o proteína. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que también habitualmente se denominan en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica como proteínas, de las cuales hay muchos tipos. "Polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Un polipéptido incluye un péptido natural, un péptido recombinante o una combinación de los mismos.

[0106] El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerido para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótido.

[0107] El término "secuencia promotora/reguladora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico operativamente unido a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que son necesarios para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, ser una que expresa el producto génico de una manera específica de tejido.

[0108] El término promotor "constitutivo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca la producción del producto génico en una célula bajo la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la célula.

[0109] El término promotor "inducible" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca la producción del producto génico en una célula sustancialmente solo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

[0110] El término promotor "específico de tejido" se refiere a una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o es especificado por un gen, provoca la producción del producto génico en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido que corresponde al promotor.

[0111] El término "polipéptido enlazador flexible" o "enlazador", tal como se usa en el contexto de un scFv se refiere a un enlazador peptídico que consiste en los aminoácidos, tales como residuos de glicina y/o serina, usados solo o en combinación, para enlazar regiones variables de cadena pesada y ligera. En un ejemplo, el polipéptido enlazador flexible es un enlazador Gly/Ser y comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser)_n, donde n es un entero positivo igual o mayor que 1. Por ejemplo, n = 1, n = 2, n = 3, n = 4, n = 5 y n = 6, n = 7, n = 8, n = 9 y n = 10 (SEQ ID NO: 105). En un ejemplo, los polipéptidos enlazadores flexibles incluyen, pero no se limitan a, (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 106) o (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 107). En otro ejemplo, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly₂Ser), (GlySer) o (Gly₃Ser) (SEQ ID NO: 108). También se incluyen dentro del alcance de la descripción los enlazadores descritos en WO2012/138475.

[0112] Tal como se usa en el presente documento, una caperuza 5' (también denominada una caperuza de ARN, una caperuza de ARN 7-metilguanosa o una caperuza de ARN m⁷G) es un nucleótido guanina modificado que se ha agregado a la "parte delantera" o extremo 5' de un ARN mensajero eucariota poco después del inicio de la transcripción. La caperuza 5' consiste en un grupo terminal que está unido al primer nucleótido transcrito. Su presencia es fundamental para el reconocimiento por el ribosoma y la protección frente a RNasas. La adición de la caperuza está acoplada a la transcripción y se produce de forma cotranscripcional, de manera que cada una influye en la otra. Poco después del inicio de la transcripción, el extremo 5' del ARNm que se sintetiza está unido por un complejo de síntesis de caperuza asociado a la ARN polimerasa. Este complejo enzimático cataliza las reacciones químicas que se requieren para el bloqueo de ARNm. La síntesis procede como una reacción bioquímica de varias etapas. El resto de bloqueo puede ser modificado para modular la funcionalidad del ARNm, tal como su estabilidad o eficacia de traducción.

[0113] Tal como se utiliza en el presente documento, "ARN transcrito in vitro" se refiere a ARN, preferiblemente ARNm, que se ha sintetizado in vitro. Generalmente, el ARN transcrito in vitro se genera a partir de un vector de transcripción in vitro. El vector de transcripción in vitro comprende una plantilla que se utiliza para generar el ARN transcrito in vitro.

[0114] Tal como se utiliza en el presente documento, un "poli (A)" es una serie de adenosinas unidas mediante poliadenilación al ARNm. En la realización preferida de una construcción para la expresión transitoria, un poliA es de entre 50 y 5000 (SEQ ID NO: 109), preferiblemente mayor que 64, más preferiblemente, mayor que 100, más preferiblemente, mayor que 300 o 400. Las secuencias de poli (A) pueden modificarse química o enzimáticamente para modular la funcionalidad de ARNm, tal como la localización, la estabilidad o la eficiencia de la traducción.

[0115] Tal como se utiliza en el presente documento, "poliadenilación" se refiere a la unión covalente de un resto poliadenililo, o su variante modificada, a una molécula de ARN mensajero. En los organismos eucariotas, la mayoría de moléculas de ARN mensajero (ARNm) se poliadenilan en el extremo 3'. La cola 3' poli (A) es una larga secuencia de nucleótidos de adenina (a menudo varios cientos) añadidos al pre-ARNm a través de la acción de una enzima, la poliadenilato polimerasa. En eucariotas superiores, se añade la cola de poli (A) en las transcripciones que contienen una secuencia específica, la señal de poliadenilación. La cola de poli (A) y la proteína unida a la misma ayudan en la protección de ARNm frente a la degradación por exonucleasas. La poliadenilación también es importante para la terminación de la transcripción, exportación del ARNm desde el núcleo y la traducción. La poliadenilación tiene lugar en el núcleo inmediatamente después de la transcripción de ADN en ARN, pero, además, también puede ocurrir más tarde en el citoplasma. Después de que la transcripción se haya terminado, la cadena de ARNm se escinde mediante la acción de un complejo de endonucleasa asociado con la ARN polimerasa. El sitio de escisión se caracteriza generalmente por la presencia de la secuencia de bases AAUAAA cerca del sitio de escisión. Después de que el ARNm se haya escindido, se añaden residuos de adenosina al extremo 3' libre en el sitio de escisión.

[0116] Tal como se utiliza en el presente documento, "transitoria" se refiere a la expresión de un transgén no integrado durante un período de horas, días o semanas, en el que el período de tiempo de la expresión es menor que el período de tiempo para la expresión del gen si se integra en el genoma o está contenido dentro de un replicón de plásmido estable en la célula huésped.

[0117] El término "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que desempeñan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra parte de una célula. La frase "receptor de superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitir la señal a través de la membrana de una célula.

[0118] El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que puede obtenerse una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos, humanos).

[0119] El término, una célula "sustancialmente purificada" se refiere a una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada se refiere también a una célula que ha sido separada de otros tipos de células con las que está normalmente asociada en su estado de origen natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificada se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a las células que se ha separado de las células con las que están asociadas de forma natural en su estado natural. En algunos aspectos, las células se cultivan in vitro. En otros aspectos, las células no se cultivan in vitro.

[0120] El término "terapéutico", tal como se usa en el presente documento significa un tratamiento. Un efecto terapéutico se obtiene por reducción, supresión, remisión o erradicación de un estado patológico.

[0121] El término "profilaxis", tal como se usa en el presente documento significa la prevención o tratamiento de protección para un estado patológico o enfermedad.

[0122] En el contexto de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo" se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos. En ciertos aspectos, los antígenos de trastorno hiperproliferativo de la presente invención derivan de cánceres que incluyen, pero no se limitan a, melanoma primario o metastásico, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas, tales como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y similares.

[0123] El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" se refiere a un proceso por el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o se introduce en la célula huésped. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula en cuestión primaria y su progenie.

[0124] El término "se une específicamente" se refiere a un anticuerpo, o un ligando, que reconoce y se une con una proteína compañera de unión análoga (por ejemplo, una molécula estimuladora y/o coestimuladora presente en una célula T) presente en una muestra, pero cuyo anticuerpo o ligando no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en la muestra.

[0125] Intervalos: a lo largo de esta descripción, se pueden presentar diversos aspectos de la invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. En consecuencia, la descripción de un intervalo debe considerarse que ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6, se debe considerar que tiene los subintervalos específicamente descritos, tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Como otro ejemplo, un intervalo tal como 95-99% de identidad, incluye algo con 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad, e incluye los subintervalos, tales como 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% y 98-99 % de identidad. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

[0126] En el presente documento se proporcionan composiciones de materia y procedimientos de uso para el tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer, utilizando receptores de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19 humanizados.

[0127] En un aspecto, la presente descripción proporciona una serie de receptores de antígenos quiméricos (CAR) que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado para mejorar la unión a una proteína CD19. En un aspecto, la presente descripción proporciona una célula (por ejemplo, células T) modificada para expresar un CAR, en donde la célula T CAR T ("CART") muestra una propiedad antitumoral. En un aspecto, una célula se transforma con el CAR y el CAR se expresa en la superficie celular. En algunos casos, la célula (por ejemplo, células T) se transduce con un vector viral que codifica un CAR. En algunos casos, el vector viral es un vector retroviral. En algunos casos, el vector viral es un vector lentiviral. En algunos de tales casos, la célula puede expresar de forma estable el CAR. En otro ejemplo, la célula (por ejemplo, células T) se transfecta con un ácido nucleico, por ejemplo, ARNm, ADNc, ADN, que codifica un CAR. En algunos de tales casos, la célula puede expresar transitoriamente el CAR.

[0128] En un aspecto, la porción de unión a anti-proteína CD19 del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv. En un aspecto, tales fragmentos de anticuerpos son funcionales en que retienen la afinidad de unión equivalente, por ejemplo, se unen al mismo antígeno con una eficacia comparable al del anticuerpo IgG del que deriva. En un aspecto, tales fragmentos de anticuerpos son funcionales en cuanto a que proporcionan una respuesta biológica que puede incluir, pero no se limita a, la activación de una respuesta inmunitaria, la inhibición de la originación de transducción de señales de su antígeno diana, la inhibición de la actividad quinasa, y similares, tal como se comprenderá por un experto en la materia. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno anti-CD 19 del CAR es un fragmento de anticuerpo scFv que es humanizado en comparación con la secuencia murina del scFv a partir de la cual deriva. En un aspecto, la secuencia de scFv murino parental es la construcción de CAR19 proporcionada en la publicación PCT WO2012/079000 y proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 58.

[0129] En algunos aspectos, los anticuerpos de la descripción se incorporan en un receptor de antígeno quimérico (CAR). En un aspecto, el CAR comprende la secuencia del polipéptido proporcionada como SEQ ID No: 12 en la publicación PCT WO2012/079000, y proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 58, en donde el dominio scFv está sustituido por una o más secuencias seleccionadas de SEQ ID NOS: 1-12. En un aspecto, los dominios scFv de SEQ ID NOS: 1-12 son variantes humanizadas del dominio scFv de SEQ ID NO: 59, que es un fragmento scFv de origen murino que se une específicamente a CD19 humano. La humanización de este scFv de ratón puede ser deseable para el entorno clínico, donde los residuos específicos de ratón pueden inducir una respuesta de antígeno anti-ratón humano (HAMA) en pacientes que reciben tratamiento con CART19, por ejemplo, el tratamiento con células T transducidas con la construcción de CAR19.

[0130] En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv humanizado, parte de un CAR de la invención está codificado por un transgén cuya secuencia se ha optimizado en codones para la expresión en una célula de mamífero. En un aspecto, la totalidad de la construcción de CAR de la invención está codificada por un transgén cuya secuencia completa ha sido optimizada en codones para la expresión en una célula de mamífero. La optimización de codones se refiere al descubrimiento de que la frecuencia de aparición de codones sinónimos (es decir, los codones que codifican para el mismo aminoácido) en el ADN de codificación está sesgada en diferentes especies. Dicha degeneración de codones permite que un polipéptido idéntico sea codificado por una gran variedad de secuencias de nucleótidos. En la técnica se conocen una variedad de procedimientos de optimización de codones, e incluyen, por ejemplo, procedimientos descritos en, al menos, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,786,464 y 6,114,148.

[0131] En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 2. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 3. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 4. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 5. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 6. En un aspecto, el CAR19

humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 7. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 8. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 9. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 10. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 11. En un aspecto, el CAR19 humanizado comprende la porción de scFv proporcionada en la SEQ ID NO: 12.

[0132] En un aspecto, los CAR de la descripción combinan un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo específico con una molécula de señalización intracelular. Por ejemplo, en algunos aspectos, la molécula de señalización intracelular incluye, pero no se limita a, los módulos de señalización de la cadena CD3-zeta, 4-1BB y CD28 y combinaciones de los mismos. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno se une a CD19. En un aspecto, la CD19 CAR comprende un CAR seleccionado a partir de la secuencia proporcionada en una o más de SEQ ID NOS: 31 - 42. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 31. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 32. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 33. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 34. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 35. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 36. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 37. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 38. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 39. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 40. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 41. En un aspecto, la CD19 CAR comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 42.

[0133] Además, la presente descripción proporciona composiciones de CD19 CAR y su uso en medicamentos o procedimientos para tratar, entre otras enfermedades, cáncer o cualquier enfermedad maligna o enfermedades autoinmunes que implican células o tejidos que expresan CD19.

[0134] En un aspecto, el CAR de la invención se puede utilizar para erradicar las células normales que expresan CD19, por lo tanto son aplicables para su uso como una terapia de acondicionamiento celular antes del trasplante de células. En un aspecto, la célula normal que expresa CD19 es una célula madre normal que expresa CD19 y el trasplante de células es un trasplante de células madre.

[0135] En un aspecto, la presente descripción proporciona una célula (por ejemplo, células T) modificadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR), donde la célula T CAR ("CART") muestra una propiedad antitumoral. Un antígeno preferido es CD19. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de CAR comprende un fragmento de anticuerpo anti-CD 19 parcialmente humanizado. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno de CAR comprende un fragmento de anticuerpo anti-CD 19 parcialmente humanizado que comprende un scFv. En consecuencia, la presente descripción proporciona un CD19-CAR que comprende un dominio de unión anti-CD 19 humanizado y se modifica en una célula T y procedimientos para su uso para terapia adoptiva. En los casos de la presente descripción que son formas de realización de la invención, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una secuencia de aminoácidos de un scFv seleccionada de SEQ ID NO: 1-12.

[0136] En un aspecto, CD19-CAR comprende al menos un dominio intracelular seleccionado del grupo de un dominio de señalización CD137 (4-1BB), un dominio de señalización CD28, un dominio de señalización CD3zeta, y cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, CD19-CAR comprende al menos un dominio de señalización intracelular de una o más moléculas coestimuladoras que no es CD137 (4-1BB) o CD28.

Receptor de Antígeno Quimérico (CAR)

[0137] La presente descripción abarca una construcción de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican un CAR, en el que el CAR comprende un fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente a CD19, por ejemplo, CD19 humana, donde la secuencia del fragmento de anticuerpo es contigua y en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. El dominio de señalización intracelular puede comprender un dominio de señalización coestimuladora y/o un dominio primario de señalización, por ejemplo, una cadena zeta. El dominio de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende al menos una porción del dominio intracelular de una molécula coestimuladora.

[0138] En aspectos específicos, una construcción de CAR de la invención comprende un dominio scFv seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-12, en el que el scFv puede estar precedido por una secuencia líder opcional, tal como la proporcionada en la SEQ ID NO: 13, y seguido por una secuencia de bisagra opcional, tal como la proporcionada en la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49, una región transmembrana, tal como la proporcionada en la SEQ ID NO: 15, un dominio de señalización intracelular que incluye SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51 y una secuencia de CD3 zeta que incluye SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, en la que los dominios son contiguos con y en el mismo marco de lectura para formar una proteína de fusión única. También se incluye en la presente descripción una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de

5 cada uno de los fragmentos de scFv seleccionados del grupo que consiste en SEQ SE NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEC ES NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. También se incluye en la presente descripción una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cada uno de los fragmentos scFv seleccionados del grupo que consiste en SEQ IS NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEC IS NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, y cada uno de los dominios de SEQ ID NOS: 13-17, además de la proteína de fusión CD19CAR codificada de la presente descripción. En un aspecto, una construcción de CD19CAR de ejemplo comprende una secuencia líder opcional, un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembrana, y un dominio estimulador intracelular. En un aspecto, una construcción de CD19CAR de ejemplo comprende una secuencia líder opcional, un dominio de unión a antígeno extracelular, una bisagra, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador intracelular y un dominio estimulador intracelular. Las construcciones de CD19 CAR específicas que contienen dominios scFv humanizados de la invención se proporcionan como SEQ ID NOS: 31-42.

15 **[0139]** Las secuencias de CAR de longitud completa también se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NOS: 31-42, tal como se muestran en la Tabla 3.

20 **[0140]** Una secuencia líder de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 13. Una secuencia de bisagra/espaciador de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49. Una secuencia de dominio transmembrana de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 15. Una secuencia del dominio de señalización intracelular de ejemplo de la proteína 4-1BB se proporciona como SEQ ID NO: 16. Una secuencia de del dominio de señalización intracelular de CD27 de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 51. Una secuencia de dominio CD3zeta de ejemplo se proporciona como SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43.

25 **[0141]** En un aspecto, la presente descripción abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión anti-CD 19, por ejemplo, descrito en el presente documento, que es contiguo con y en el mismo marco de lectura que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD 19 se selecciona de una o más de SEQ ID NOS: 1-12. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 está codificada por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la secuencia proporcionada en una o más de SEQ ID NOS: 61-72. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 61. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 62. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 63. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD 19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 64. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD 19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 65. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 66. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 67. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 68. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD 19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 69. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD 19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 70. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 71. En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 está codificado por los residuos de nucleótidos 64 a 813 de la SEQ ID NO: 72.

30 **[0142]** En un aspecto, la presente descripción abarca una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende un transgén que codifica un CAR, en la que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de unión anti-CD19 seleccionado de uno o más de las SEQ ID NOS: 61-72, en el que la secuencia es contigua y en el mismo marco de lectura que la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular de ejemplo que se puede utilizar en el CAR incluye, pero no se limita a, uno o más dominios intracelulares de señalización de, por ejemplo, CD3-zeta, CD28, 4-1BB, y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB, y similares. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR de la invención se selecciona de uno o más de SEQ ID NOS: 85-96. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 85. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 86. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 87. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 88. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 89. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 90. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 91. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 92. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 93. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 94. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 95. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 96. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 97. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción de CAR es la SEQ ID NO: 98. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de una construcción

de CAR es la SEQ ID NO: 99.

[0143] Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener usando procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante el cribado de bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen a partir de un vector conocido por incluir el mismo, o mediante el aislamiento directamente de células y tejidos que contienen el mismo, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el ácido nucleico de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

[0144] La presente invención incluye construcciones de vectores retrovirales y lentivirales que expresan un CAR que pueden transducirse directamente en una célula.

[0145] La presente invención también incluye una construcción de ARN que se pueden transfectar directamente en una célula. Un procedimiento para generar ARNm para el uso en la transfección implica la transcripción in vitro (IVT) de una plantilla con cebadores diseñados especialmente, seguido de adición de poliA, para producir una construcción que contiene secuencia no traducida 3' y 5' ('UTR'), una caperuza 5' y/o sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), el ácido nucleico a expresar y una cola de poliA, típicamente de 50-2000 bases de longitud (SEQ ID NO: 118). El ARN así producido puede transfectar eficientemente diferentes tipos de células. En una realización, la plantilla incluye secuencias para el CAR. En una realización, un vector de ARN de CAR se transduce en una célula T mediante electroporación.

Dominio de unión a antígeno

[0146] En un aspecto, el CAR de la presente descripción comprende un elemento de unión específica a diana referido de otro modo como un dominio de unión a antígeno. La elección del resto depende del tipo y el número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede ser escogido para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en las células diana asociadas con un estado patológico particular. De este modo, ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión a antígeno en un CAR de la presente descripción incluyen los asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunes y células cancerosas.

[0147] En un aspecto, la respuesta de células T mediada por CAR puede ser dirigida a un antígeno de interés por medio de la modificación de un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno deseado en el CAR.

[0148] En un aspecto, la porción del CAR que comprende el dominio de unión a antígeno comprende un dominio de unión a antígeno que reconoce CD19. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno reconoce CD19 humano. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno del CAR tiene la misma o una especificidad de unión similar que el fragmento scFv FMC63 descrito en Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-65 (1997).

[0149] El dominio de unión a antígeno puede ser cualquier dominio que se une al antígeno incluyendo, pero no limitado a, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento funcional de los mismos, incluyendo, pero no limitado a, un anticuerpo de dominio único, tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de nanoanticuerpo derivado de camélido, y un andamio alternativo conocido en la técnica para funcionar como dominio de unión a antígeno, tal como un dominio de fibronectina recombinante, y similares. En algunos casos, es beneficioso para el dominio de unión a antígeno que se derive de la misma especie en la que en última instancia se utilizará el CAR. Por ejemplo, para uso en seres humanos, puede ser beneficioso que el dominio de unión a antígeno del CAR comprenda residuos humanos o humanizados para el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0150] Por lo tanto, en un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LC CDR1), la región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD 19 humanizado descrito en el presente documento y/o una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD 19 humanizado descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD 19 humanizado que comprende una o más, por ejemplo, las tres, LC CDR y una o más, por ejemplo, las tres, HC CDR. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 humanizado comprende una o más (por ejemplo, las tres) de la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HC CDR1), la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HC CDR2) y la región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD 19 humanizado descrito en el presente documento, por ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado tiene dos regiones de cadena pesada variables, comprendiendo cada una una HC CDR1, una HC CDR2 y una HC CDR3 descritas en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19

humanizado comprende una región variable de cadena ligera humanizada descrita en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3) y/o una región variable de cadena pesada humanizada descrita en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una región variable de la cadena pesada variable humanizada descrita en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3), por ejemplo, al menos dos regiones variables de cadena pesada humanizadas descritas en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 3). En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 es un scFv que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 (por ejemplo, un scFv) comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones), pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada proporcionada en la Tabla 3, o una secuencia con una identidad del 95-99% con una secuencia de aminoácidos de la Tabla 3. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con una identidad del 95-99% de las mismas. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, o una secuencia con una identidad del 95-99% con las mismas. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 3, está unida a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, por ejemplo, en la Tabla 3, a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador descrito en el presente documento. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD 19 humanizado incluye un enlazador (Gly₄-Ser)_n, en el que n es 1, 2, 3, 4, 5, o 6, preferiblemente 3 o 4 (SEQ ID NO: 53). La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador-región variable de cadena ligera.

[0151] En un aspecto, la parte de dominio de unión a antígeno comprende una o más secuencias seleccionadas de las SEQ ID NOS: 1-12. En un aspecto, el CAR humanizado se selecciona de una o más secuencias seleccionadas de las SEQ ID NOS: 31-42. En algunos aspectos, un anticuerpo no humano se humaniza, donde las secuencias o regiones específicas del anticuerpo de modificación para aumentar la similitud con un anticuerpo producido de manera natural en un ser humano o fragmento del mismo. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno está humanizado.

[0152] Un anticuerpo humanizado se puede producir usando una variedad de técnicas conocidas en el sector de la técnica, incluyendo, pero no limitado a, injerto de CDR (véase, por ejemplo, la Patente Europea No. EP 239400; Publicación Internacional N° WO 91/09967; y las patentes de Estados Unidos Nos. 5.225.539, 5.530.101, y 5.585.089), recubrimiento o "resurfacing" (véase, por ejemplo, las Patentes Europeas Nos. EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28 (4/5): 489-498; Studnicka et al, 1994, *Protein Engineering*, 7 (6): 805-814; y Roguska et al, 1994, *PNAS*, 91: 969-973), barajado de cadenas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.565.332), y técnicas descritas en, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos No. US2005/0042664, la publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US2005/0048617, la patente de los Estados Unidos. No. 6.407.213, la patente de los Estados Unidos. No. 5.766.886, la Publicación Internacional No. WO 9317105, Tan et al, *J. Immunol.*, 169: 1119-1125 (2002), Caldas et al, *Protein Eng*, 13 (5): 353-60 (2000), Morea et al, *Methods*, 20 (3): 267-79 (2000), Baca et al, *J. Biol. Chem.*, 272 (16): 10678-84 (1997), Roguska et al, *Protein Eng*, 9 (10): 895-904 (1996), Couto et al, *Cancer Res*, 55 (23 Supl): 5973s-5977s (1995), Couto et al, *Cancer Res*, 55 (8): 1717-1722 (1995), Sandhu JS, *gene*, 150 (2): 409-10 (1994), y Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235 (3): 959-73 (1994). A menudo, los residuos de la estructura en las regiones de estructura se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, por ejemplo mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de la CDR y los residuos estructurales para identificar residuos estructurales importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos estructurales inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen et al, Patente de Estados Unidos No. 5.585.089; y Riechmann et al, 1988, *Nature*, 332: 323, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad).

[0153] Un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo tiene uno o más residuos de aminoácidos restantes en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "de importación". Tal como se establece en el presente documento, los anticuerpos humanizados o fragmentos de anticuerpos comprenden una o más CDR de las moléculas de inmunoglobulina no humana y regiones de estructura en las que los residuos de aminoácidos que comprenden la estructura derivan completamente o en su mayoría de la línea germinal

humana. Son bien conocidas en el estado de la técnica múltiples técnicas para la humanización de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y esencialmente se pueden realizar siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al, Science, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDR o secuencias de CDR de roedor por secuencias correspondientes de un anticuerpo humano, es decir, un injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT No. WO 91/09967; y las patentes de Estados Unidos N° 4.816.567; 6.331.415; 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 6.548.640). En tales anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpos, sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Los anticuerpos humanizados son a menudo anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos de estructura (FR) están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La humanización de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos también se puede lograr mediante recubrimiento o "resurfacing" (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28 (4/5): 489-498; Studnicka et al, Protein Engineering, 7 (6): 805-814 (1994); y Roguska et al, PNAS, 91: 969-973 (1994)) o mezcla aleatoria de cadenas (patente de Estados Unidos No. 5.565.332).

[0154] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para ser usados en la fabricación de los anticuerpos humanizados es para reducir la antigenicidad. Según el procedimiento denominado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta entonces como la estructura humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al, J. Immunol, 151: 2296 (1993); Chothia et al, J. mol Biol, 196: 901 (1987)). Otro procedimiento utiliza una estructura particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (véase, por ejemplo, Nicholson et al Mol Immun 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter et al, Proc Natl Acad Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta et al, J. Immunol, 151: 2623 (1993)). En algunos casos, la región de estructura, por ejemplo, las cuatro regiones de estructura, de la región variable de cadena pesada derivan de una secuencia de línea germinal VH4_4-59. En un ejemplo, la región de estructura puede comprender una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, del aminoácido en la secuencia murina correspondiente (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 58). En un ejemplo, la región de estructura, por ejemplo, las cuatro regiones de estructura de la región variable de cadena ligera derivan de una secuencia de línea germinal VK3_1.25. En un ejemplo, la región de estructura puede comprender una, dos, tres, cuatro o cinco modificaciones, por ejemplo, sustituciones, por ejemplo, del aminoácido en la secuencia murina correspondiente (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 58).

[0155] En algunos aspectos, la porción de una composición de CAR de la presente descripción que comprende un fragmento de anticuerpo se humaniza con retención de alta afinidad para el antígeno diana y otras propiedades biológicas favorables. Según un aspecto de la presente descripción, los anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpos se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y expresan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas expresiones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, por ejemplo, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al antígeno diana. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras y de importación de manera que se consigue el anticuerpo o fragmento de anticuerpo deseado característico, tal como una mayor afinidad por el antígeno diana. En general, los residuos CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

[0156] Un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo puede retener una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original, por ejemplo, en la presente invención, la capacidad de unirse a CD19 humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo puede tener una afinidad y/o especificidad mejoradas de unión a CD19 humano.

[0157] En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 se caracteriza por las características o propiedades funcionales particulares de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, en un aspecto, la porción de una composición de CAR de la presente descripción que comprende un dominio de unión a antígeno se une específicamente a CD19 humano. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno tiene la misma o una especificidad de unión similar a CD19 humano como el scFv FMC63 descrito en Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-65 (1997). En un aspecto, la presente descripción se refiere a un dominio de unión a antígeno que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en el que el dominio de unión a anticuerpo se une específicamente a una proteína CD19 o fragmento de la misma, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena ligera variable y/o una cadena pesada variable que incluye una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1-12. En un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un scFv seleccionado de las SEQ ID NOs: 1-12. En ciertos aspectos, el scFv es contiguo con y en el mismo marco de lectura que una secuencia líder. En un aspecto, la secuencia líder es la secuencia del polipéptido proporcionada como SEQ ID No: 13.

[0158] En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es un fragmento, por ejemplo, un fragmento variable de cadena única (scFv). En un aspecto, el dominio de unión anti-CD19 es un Fv, un Fab, un (Fab')₂ o un anticuerpo híbrido bifuncional (por ejemplo, biespecífico) por ejemplo, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente descripción se unen a una proteína CD19 con afinidad de tipo salvaje o mejorada.

[0159] En algunos casos, los scFv se pueden preparar según el procedimiento conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Bird et al, (1988) Science 242: 423-426 y Huston et al, (1988) Proc Natl Acad Sci USA. 85: 5879-5883). Las moléculas de scFv se pueden producir mediante la unión de las regiones VH y VL utilizando enlazadores polipeptídicos flexibles. Las moléculas de scFv comprenden un enlazador (por ejemplo, un enlazador de Ser-Gly) con una longitud y/o composición de aminoácidos optimizada. La longitud del enlazador puede afectar en gran medida a cómo las regiones variables de un scFv se pliegan e interactúan. De hecho, si se emplea un enlazador polipeptídico corto (por ejemplo, entre 5-10 aminoácidos) se evita el plegado intracatenario. También se requiere el plegado intercatenario para unir las dos regiones variables para formar un sitio de unión a epítopo funcional. Para ejemplos de orientación de enlazador y tamaño, véase, por ejemplo, Hollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. USA. 90: 6444-6448, solicitudes de patente de Estados Unidos No. 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, y las publicaciones PCT Nos. WO2006/020258 y WO2007/024715.

[0160] Un scFv puede comprender un enlazador de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos de aminoácidos entre sus regiones VL y VH. La secuencia de enlazador puede comprender cualquier aminoácido de origen natural. En algunas realizaciones, la secuencia de enlazador comprende los aminoácidos glicina y serina. En otra realización, la secuencia de enlazador comprende conjuntos de repeticiones de glicina y serina, tal como (Gly₄Ser)_n, donde n es un entero positivo igual a o mayor que 1 (SEQ ID NO: 18). En una realización, el enlazador puede ser (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 106) o (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 107). La variación en la longitud del enlazador puede mantener o mejorar la actividad, dando lugar a una eficacia superior en los estudios de actividad.

Estabilidad y mutaciones

[0161] La estabilidad de un dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, las moléculas de scFv (por ejemplo, scFv soluble) puede evaluarse en referencia a las propiedades biofísicas (por ejemplo, estabilidad térmica) de una molécula scFv de control convencional o un anticuerpo de longitud completa. En un ejemplo, el scFv humanizado tiene una estabilidad térmica que es mayor que aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,75, aproximadamente 1, aproximadamente 1,25, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,75, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5, aproximadamente 10 grados, aproximadamente 11 grados, aproximadamente 12 grados, aproximadamente 13 grados, aproximadamente 14 grados o aproximadamente 15 grados Celsius que una molécula de unión de control (por ejemplo, una molécula de scFv convencional) en los ensayos descritos.

[0162] La estabilidad térmica mejorada del dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv, se confiere posteriormente a toda la construcción CART19, lo que conduce a mejores propiedades terapéuticas de la construcción CART19. La estabilidad térmica del dominio de unión anti-CD 19, por ejemplo, scFv, se puede mejorar en al menos aproximadamente 2°C o 3°C en comparación con un anticuerpo convencional. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv, tiene una estabilidad térmica mejorada de 1°C en comparación con un anticuerpo convencional. En otro ejemplo, el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv, tiene una estabilidad térmica mejorada de 2°C en comparación con un anticuerpo convencional. En otro ejemplo, el scFv tiene una estabilidad térmica mejorada de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15°C en comparación con un anticuerpo convencional. Se pueden hacer comparaciones, por ejemplo, entre las moléculas de scFv descritas en el presente documento y las moléculas de scFv o fragmentos Fab de un anticuerpo del que derivaban las VH y VL de scFv. La estabilidad térmica se puede medir usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un ejemplo, se puede medir la Tf. Los procedimientos para medir Tf y otros procedimientos de determinación de la estabilidad de proteínas se describen con más detalle a continuación.

[0163] Las mutaciones en scFv (que surgen a través de la humanización o mutagénesis directa del scFv soluble) alteran la estabilidad del scFv y mejoran la estabilidad general del scFv y la construcción CART19. La estabilidad del scFv humanizado se compara con el scFv murino usando mediciones, tales como la Tf, la temperatura de desnaturalización y la temperatura de agregación.

[0164] La capacidad de unión de los scFv mutantes se puede determinar usando ensayos descritos en los Ejemplos.

[0165] En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv, comprende al menos una mutación resultante del proceso de humanización, tal que el scFv mutado confiere una mejor estabilidad a la construcción CART19. En otro ejemplo, el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv, comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutaciones derivadas del proceso de humanización, tal que el scFv mutado confiere una estabilidad

mejorada a la construcción CART19.

Procedimientos de evaluación de la estabilidad de las proteínas

5 **[0166]** La estabilidad de un dominio de unión a antígeno puede ser evaluada usando, por ejemplo, los procedimientos descritos a continuación. Tales procedimientos permiten la determinación de múltiples transiciones de desplegamiento térmico donde el dominio menos estable o bien se despliega primero o limita el umbral de estabilidad total de una unidad de multidominio que se despliega de manera cooperativa (por ejemplo, una proteína multidominio que muestra una única transición de despliegue). El dominio menos estable puede ser identificado en un número de maneras adicionales. La mutagénesis puede llevarse a cabo para investigar qué dominio limita la estabilidad general. Adicionalmente, la resistencia a la proteasa de una proteína multidominio se puede realizar bajo condiciones en las que se sabe que el dominio menos estable se despliega intrínsecamente a través de DSC u otros procedimientos espectroscópicos (Fontana, et al, (1997) *Fold Des.*, 2: R17-26; Dimasi et al (2009) *J. Mol Biol* 393: 672-692). Una vez identificado el dominio menos estable, la secuencia que codifica este dominio (o una parte del mismo) se puede emplear como una secuencia de prueba en los procedimientos.

a) Estabilidad térmica

20 **[0167]** La estabilidad térmica de las composiciones se puede analizar utilizando un número de técnicas biofísicas o bioquímicas, no limitantes, conocidas en la técnica. En ciertos casos, la estabilidad térmica se evaluó mediante espectroscopia analítica.

25 **[0168]** Un procedimiento de espectroscopia analítica de ejemplo es la calorimetría diferencial de barrido (DSC). La DSC emplea un calorímetro que es sensible a las absorbancias de calor que acompañan al despliegue de la mayoría de las proteínas o dominios de proteínas (véase, por ejemplo, Sánchez-Ruiz, et al, *Biochemistry*, 27: 1648-52, 1988). Para determinar la estabilidad térmica de una proteína, una muestra de la proteína se inserta en el calorímetro y se eleva la temperatura hasta que despliega el Fab o scFv. La temperatura a la que se despliega la proteína es indicativa de la estabilidad general de la proteína.

30 **[0169]** Otro procedimiento de espectroscopia de análisis de ejemplo es la espectroscopia de dicroísmo circular (CD). La espectrometría CD mide la actividad óptica de una composición en función del aumento de la temperatura. La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) mide las diferencias en la absorción de la luz polarizada a la izquierda frente a la luz polarizada a la derecha que surgen debido a la asimetría estructural. Una estructura desordenada o desplegada resulta en un espectro de CD muy diferente de la de una estructura ordenada o plegada. El espectro de CD refleja la sensibilidad de las proteínas a los efectos desnaturalizantes de aumento de la temperatura y por lo tanto es indicativo de la estabilidad térmica de una proteína (véase van Mierlo y Steemsma, *J. Biotechnol*, 79 (3): 281-98, 2000).

40 **[0170]** Otro procedimiento de espectroscopia analítica de ejemplo para medir la estabilidad térmica es la espectroscopia de emisión de fluorescencia (véase van Mierlo y Steemsma, supra). Aún otro procedimiento de espectroscopia analítica de ejemplo para medir la estabilidad térmica es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) (véase, por ejemplo van Mierlo y Steemsma, supra).

45 **[0171]** La estabilidad térmica de una composición se puede medir bioquímicamente. Un procedimiento bioquímico de ejemplo para evaluar la estabilidad térmica es un ensayo de desafío térmico. En un "ensayo de desafío térmico", una composición se somete a un interalo de temperaturas elevadas durante un período de tiempo establecido. Por ejemplo, en un ejemplo, a moléculas de scFv de prueba o moléculas que comprenden moléculas de scFv se someten a una serie de temperaturas crecientes, por ejemplo, durante 1-1,5 horas. La actividad de la proteína se ensaya a continuación mediante un ensayo bioquímico pertinente. Por ejemplo, si la proteína es una proteína de unión (por ejemplo, un scFv o polipéptido que contiene scFv) la actividad de unión de la proteína de unión puede determinarse mediante un ELISA funcional o cuantitativo.

50 **[0172]** Dicho ensayo se puede realizar en un formato de alto rendimiento y los descritos en los Ejemplos que utilizan *E. coli* y cribado de alto rendimiento. Se puede crear una biblioteca de dominios de unión anti-CD 19, por ejemplo, las variantes de scFv puede usando los procedimientos conocidos en la técnica. El dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, la expresión de scFv puede ser inducida y el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv se puede someter a desafío térmico. Las muestras de ensayo desafiadas pueden ensayarse para la unión y los dominios de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv que son estables pueden ser ampliados y caracterizados.

60 **[0173]** La estabilidad térmica se evaluó mediante la medición de la temperatura de fusión (Tf) de una composición utilizando cualquiera de las técnicas anteriores (por ejemplo, técnicas de espectroscopia analítica). La temperatura de fusión es la temperatura en el punto medio de una curva de transición térmica en la que 50% de las moléculas de una composición están en un estado plegado (véase, por ejemplo, Dimasi et al (2009) *J. Mol Biol* 393: 672-692). En un ejemplo, los valores de Tf para un dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv son aproximadamente 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C,

77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C. En un ejemplo, los valores de Tf para una IgG son de aproximadamente 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C. En un ejemplo, los valores de Tf para un anticuerpo multivalente son de aproximadamente 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C.

[0174] La estabilidad térmica también se evalúa mediante la medición el calor específico o capacidad de calor (Cp) de una composición usando una técnica analítica calorimétrica (por ejemplo, DSC). El calor específico de una composición es la energía (por ejemplo, en kcal/mol) que se requiere para aumentar en 1°C la temperatura de 1 mol de agua. Como una Cp grande es una característica de una composición de proteína desnaturalizada o inactivo, el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) de una composición se mide determinando el calor específico de una composición antes y después de su transición térmica. La estabilidad térmica también se puede evaluar mediante la medición o determinación de otros parámetros de estabilidad termodinámica, incluyendo la energía libre de Gibbs de despliegue (ΔG), la entalpía de despliegue (ΔH), o entropía de despliegue (ΔS). Se utilizan uno o más de los ensayos bioquímicos anteriores (por ejemplo un ensayo de desafío térmica) para determinar la temperatura (es decir, el valor de Tc) a la que 50% de la composición conserva su actividad (por ejemplo, actividad de unión).

[0175] Además, las mutaciones en el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv, alteran la estabilidad térmica del dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv, en comparación con el dominio de unión anti-CD19 dominio no mutado, por ejemplo, scFv. Cuando el dominio de unión anti-CD19 humanizado, por ejemplo, scFv, se incorpora en una construcción CART19, el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv humanizado confiere estabilidad térmica a la construcción global CART anti-CD19. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv comprende una única mutación que confiere estabilidad térmica al dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv. En otro ejemplo, el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv comprende múltiples mutaciones que confieren estabilidad térmica al dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv. En un ejemplo, las múltiples mutaciones en el dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv tienen un efecto aditivo en la estabilidad térmica del dominio de unión anti-CD19, por ejemplo, scFv.

b) % de agregación

[0176] La estabilidad de una composición se puede determinar mediante la medición de su propensión a agregarse. La agregación puede medirse mediante un número de técnicas bioquímicas o biofísicas no limitativas. Por ejemplo, la agregación de una composición puede evaluarse usando cromatografía, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La SEC separa las moléculas en base a su tamaño. Una columna se llena con partículas semi-sólidas de un gel polimérico que admite iones y pequeñas moléculas en su interior, pero no las grandes. Cuando una composición de proteína se aplica a la parte superior de la columna, las proteínas plegadas compactas (es decir, proteínas no agregadas) se distribuyen a través de un mayor volumen de disolvente que está disponible para los agregados de proteína grandes. En consecuencia, los agregados grandes se mueven más rápidamente a través de la columna, y de esta manera, la mezcla se puede separar o fraccionar en sus componentes. Cada fracción puede ser cuantificada por separado (por ejemplo, por dispersión de la luz) a medida que se eluye del gel. Por consiguiente, el % de agregación de una composición se puede determinar mediante la comparación de la concentración de una fracción con la concentración total de proteína aplicada al gel. Las composiciones estables se eluyen de la columna esencialmente como una sola fracción y aparecen esencialmente como un solo pico en el perfil de elución o cromatograma.

c) Afinidad de unión

[0177] La estabilidad de una composición puede evaluarse mediante la determinación de su afinidad de unión a una diana. En la técnica se conoce una amplia variedad de procedimientos para determinar la afinidad de unión. Un procedimiento de ejemplo para determinar la afinidad de unión emplea resonancia de plasmón superficial. La resonancia de plasmón superficial es un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson, U., (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277.

[0178] En un aspecto, el dominio de unión a antígeno del CAR comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga a una secuencia de aminoácidos de dominio de unión a antígeno descrita en el presente documento, y el dominio de unión a antígeno retiene las propiedades funcionales deseadas de los fragmentos de anticuerpos anti-CD19 descrito en el presente documento. En un aspecto específico, la composición de CAR de la presente

descripción comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el fragmento de anticuerpo comprende un scFv.

- 5 **[0179]** En varios aspectos, el dominio de unión al antígeno del CAR se modifica mediante la modificación de uno o más aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (por ejemplo, VH y/o VL), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o en una o más regiones de estructura. En un aspecto específico, la composición de CAR de la presente descripción comprende un fragmento de anticuerpo. En un aspecto adicional, el fragmento de anticuerpo comprende un scFv.
- 10 **[0180]** Se entenderá por un experto en la técnica que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente descripción puede además ser modificado de tal manera que varían en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, de tipo salvaje), pero no en la actividad deseada. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones adicionales de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales" a la proteína, por ejemplo, un residuo de aminoácido no esencial en una molécula puede ser sustituido por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. En otro ejemplo, una cadena de aminoácidos puede ser sustituida con una cadena estructuralmente similar que difiere en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadena lateral, por ejemplo, una sustitución conservadora, en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar.
- 15 **[0181]** Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).
- 20 **[0182]** El porcentaje de identidad en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias que son la misma. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, 60% de identidad, opcionalmente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia), cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada tal como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 50 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente sobre una región que tiene de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.
- 30 **[0183]** Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que las secuencias de prueba se comparan. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Se puede utilizar los parámetros del programa por defecto o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces la identidad de secuencia en porcentaje para las secuencias de ensayo con relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa. Los procedimientos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo local de homología de Smith y Waterman, (1970) Adv. Appl. Mates. 2: 482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, (1988) Proc. Nacional. Acad. Sci. USA. 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase por ejemplo, Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology).
- 40 **[0184]** Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos de BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402; y Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente. El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica.
- 45 **[0185]** El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz de Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2,
- 50 **[0184]** Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos de BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402; y Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente. El software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica.
- 55 **[0185]** El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz de Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2,
- 60 **[0185]** El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz de Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2,
- 65 **[0185]** El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), usando una matriz de Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2,

3, 4, 5, o 6.

[0186] En un aspecto, la presente descripción contempla modificaciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de partida o fragmento (por ejemplo, scFv) que generan moléculas funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, el VH o VL de un dominio de unión anti-CD 19, por ejemplo, scFv, comprendido en el CAR pueden ser modificados para retener al menos aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de la región estructural de VH o VL de partida del dominio de unión anti-CD 19, por ejemplo, scFv. La presente descripción contempla modificaciones de toda la construcción de CAR, por ejemplo, las modificaciones en una o más secuencias de aminoácidos de los diversos dominios de la construcción de CAR con el fin de generar moléculas funcionalmente equivalentes. La construcción de CAR puede ser modificada para retener al menos aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de la construcción CAR de partida.

Dominio transmembrana

[0187] Con respecto al dominio transmembrana, en diversas realizaciones, un CAR puede ser diseñado para comprender un dominio transmembrana que se une al dominio extracelular del CAR. Un dominio transmembrana puede incluir uno o más aminoácidos adicionales adyacentes a la región transmembrana, por ejemplo, uno o más aminoácidos asociados con la región extracelular de la proteína de la que deriva el dominio transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región extracelular) y/o uno o más aminoácidos adicionales asociados con la región intracelular de la proteína de la que deriva la proteína transmembrana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 15 aminoácidos de la región intracelular). En un aspecto, el dominio transmembrana es uno que está asociado con uno de los otros dominios que se utiliza del CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana puede ser seleccionado o modificado por sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de la membrana superficial, por ejemplo, para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo de receptor. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de homodimerizar con otro CAR en la superficie celular de CART. En un aspecto diferente, la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana puede ser modificada o sustituida a fin de minimizar las interacciones con los dominios de unión de la pareja de unión nativa presente en la misma CART.

[0188] El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o de una fuente recombinante. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivarse de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. En un aspecto, el dominio transmembrana es capaz de señalar al o a los dominios intracelulares siempre que el CAR se ha unido a una diana. Un dominio transmembrana de uso particular en esta invención puede incluir al menos la región o regiones transmembrana de, por ejemplo, la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

[0189] En algunos casos, el dominio transmembrana se puede unir a la región extracelular de el CAR, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno del CAR, a través de una bisagra, por ejemplo, una bisagra de una proteína humana. Por ejemplo, en una realización, la bisagra puede ser una bisagra de Ig humana (inmunoglobulina), por ejemplo, una bisagra de IgG4, o una bisagra CD8a. En una realización, la bisagra o espaciador comprende (por ejemplo, consiste en) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En un aspecto, el dominio transmembrana comprende (por ejemplo, consiste en) un dominio transmembrana de la SEQ ID NO: 15.

[0190] En un aspecto, la bisagra o espaciador comprende una bisagra IgG4. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos
 ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM (SEQ ID NO: 45). En algunas realizaciones, la bisagra o espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGG
 ACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA
 CCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCA
 GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGG
 GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA
 GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCC
 AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG
 TGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
 CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC
 GGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA
 GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
 CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA
 GCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:46).

[0191] En un aspecto, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de IgD. Por ejemplo, en una realización, la bisagra o espaciador comprende una bisagra de la secuencia de aminoácidos
 RWPEPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET
 KTPECPSTHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG
 GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAQA
 PVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG
 STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVSHEDSRLLNASRSLEVSIVTDH (SEQ ID NO: 47). En algunas realizaciones, la bisagra o espaciador comprende una bisagra codificada por una secuencia de nucleótidos de

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCA
 GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACT
 GGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGA
 GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC
 TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGT
 TTCGTTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAA
 GGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT
 CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCCCTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTC
 TGTCACATGTACTCTAAATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG
 AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTG
 ATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCC
 AACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG
 CTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTC
 TTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTC
 CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACG
 TGACTGACCATT (SEQ ID NO:48).

[0192] En un aspecto, el dominio transmembrana puede ser recombinante, en cuyo caso comprenderá los residuos predominantemente hidrófobos, tales como leucina y valina. En un aspecto, se puede encontrar un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana recombinante.

5 [0193] Opcionalmente, un enlazador corto de oligopéptido o polipéptido, de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y la región citoplásmica del CAR. Un doblete glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado. Por ejemplo, en un aspecto, el enlazador comprende la secuencia de aminoácidos de GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 49). En algunas realizaciones, el enlazador es codificado por una secuencia de nucleótidos de GGTGGCGAGGTTCTGGAGGTGGAGTTCC (SEQ ID NO: 50).

10

Dominio citoplásmico

15 [0194] El dominio citoplásmico o región del CAR incluye un dominio de señalización intracelular. Un dominio de señalización intracelular es generalmente responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmune en la que se ha introducido el CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o actividad ayudante, incluyendo la secreción de citoquinas. Así, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige la célula para realizar una función especializada. Aunque por lo general todo el dominio de señalización intracelular se puede emplear, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. En la medida en que se utiliza una porción truncada del dominio de señalización intracelular, tal porción truncada puede ser usada en lugar de la cadena intacta, siempre que transduzca la señal de la función efectora. El término dominio de señalización intracelular por lo tanto pretende incluir cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

25

[0195] Los ejemplos de dominios de señalización intracelular para uso en el CAR de la invención incluyen las secuencias citoplasmáticas de los receptores de células T (TCR) y co-receptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales tras el acoplamiento del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia recombinante que tiene la misma capacidad funcional.

30

[0196] Se sabe que las señales generadas a través de solo el TCR son insuficientes para la activación completa de la célula T y que también se requiere una señal secundaria y/o coestimuladora. Por lo tanto, la activación de células T se puede decir que estar mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmáticas: aquellas que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través de los TCR (dominios primarios de señalización intracelular) y los que actúan de una manera independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (dominio citoplásmico secundario, por ejemplo, un dominio coestimulador).

35

[0197] Un dominio de señalización primario regula la activación primaria del complejo TCR ya sea en una forma estimuladora o de una manera inhibitoria. Los dominios de señalización intracelulares primarios que actúan de una manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina inmunoreceptores o ITAM.

40

[0198] Ejemplos de ITAM que contiene dominios primarios de señalización intracelular que son de uso particular en la invención incluyen los de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En una realización, un CAR de la invención comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio primario de señalización de CD3-zeta.

45

[0199] En una realización, un dominio primario de señalización comprende un dominio ITAM modificado, por ejemplo, un dominio ITAM mutado que tiene una actividad alterada (por ejemplo, aumento o disminución) en comparación con el dominio ITAM nativo. En una realización, un dominio primario de señalización comprende un dominio primario modificado de señalización intracelular que contiene ITAM, por ejemplo, un dominio primario de señalización intracelular que contiene ITAM optimizado y/o truncado. En una realización, un dominio primario de señalización comprende uno, dos, tres, cuatro o más motivos ITAM.

50

[0200] El dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o se puede combinar con cualquier otro dominio de señalización intracelular deseado (s) útil en el contexto de un CAR de la invención. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular del CAR puede comprender una porción de la cadena CD3 zeta y un dominio de señalización coestimuladora. El dominio de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular que no sea un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficaz de linfocitos a un antígeno. Ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 41BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, linfocitos asociado a la función de antígeno-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares. Por ejemplo, CD27 coestimulación se ha demostrado para mejorar la expansión, la función efectora, y supervivencia de células de CART humanos in vitro y aumenta la persistencia de células T humanas y la actividad antitumoral in vivo (Song et al Blood 2012; 119 (3): 696- 706).

60

65

[0201] Las secuencias de señalización intracelular dentro de la porción citoplasmática del CAR de la invención pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un enlazador oligopeptídico o polipeptídico corto, por ejemplo, entre 2 y 10 aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos) de longitud puede formar el enlace entre las secuencias de señalización intracelular. En una realización, se puede utilizar un doblete de glicina-serina como enlazador adecuado. En una realización, se puede utilizar un solo aminoácido, por ejemplo, una alanina, una glicina, como enlazador adecuado.

[0202] En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más, dominios de señalización coestimuladores. En una realización, los dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más, dominios de señalización coestimuladores están separados por una molécula enlazadora, por ejemplo, una molécula enlazadora descrita en el presente documento. En una realización, el dominio de señalización intracelular comprende dos dominios de señalización coestimuladores. En algunas realizaciones, la molécula enlazadora es un residuo de glicina. En algunas realizaciones, el enlazador es un residuo de alanina.

[0203] En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 41BB. En un aspecto, el dominio de señalización de 41BB es un dominio de señalización de la SEQ ID NO: 16. En un aspecto, el dominio de señalización de CD3-zeta es un dominio de señalización de la SEQ ID NO: 17.

[0204] En un aspecto, el dominio de señalización intracelular está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD27. En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 comprende una secuencia de aminoácidos de QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 51). En un aspecto, el dominio de señalización de CD27 está codificado por una secuencia de ácido nucleico de

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCC
 GCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA
 GCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:52).

[0205] En un aspecto, la célula que expresa CAR descrita en el presente documento puede comprender además un segundo CAR, por ejemplo, un segundo CAR que incluye un dominio de unión a antígeno diferente, por ejemplo, con la misma diana (CD19) o una diana diferente (por ejemplo, CD123). En un ejemplo, cuando la célula que expresa CAR comprende dos o más CARs diferentes, los dominios de unión a antígeno de CARs diferentes pueden ser tal que los dominios de unión al antígeno no interactúan uno con el otro. Por ejemplo, una célula que expresa una primera y segunda CAR puede tener un dominio de unión a antígeno de la primera CAR, por ejemplo, como un fragmento, por ejemplo, un scFv, que no forma una asociación con el dominio de unión a antígeno de la segunda CAR, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno de la segunda CAR es un VHH.

[0206] En otro aspecto, la célula que expresa CAR descrito en el presente documento puede expresar además otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Moléculas inhibidoras, por ejemplo, PD1, pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de montar una respuesta efectora inmune. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. En un ejemplo, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, por ejemplo, una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular se describe en el presente documento. En un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora tal como PD1, LAG3, CTLA4, CD160, BTLA, LAIR1, TIM3, 2B4 y TIGIT, o un fragmento de cualquiera de éstos (por ejemplo, al menos una parte de un dominio extracelular de cualquiera de estos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, CD27 o CD28, por ejemplo, como se describe en el presente documento) y/o una primaria dominio de señalización (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta que describe en el presente documento). en un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, al menos una parte de un dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular se describe en el presente documento (por ejemplo, un CD28 señalización dominio describe en el presente documento y/o un dominio de señalización CD3 zeta describe en el presente documento). PD1 es un miembro de inhibidor de la familia CD28 de receptores, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS, y BTLA. PD-1 se expresa en células B activadas, células T y células mieloides (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8: 765-75). Dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 se han demostrado para regular a la baja la activación de células T tras la unión a PD1 (Freeman et un 2000 J Exp Med 192:.. 1027-1034; Latchman et al 2001 Nat Immunol 2: 261-. 8; Carter et al 2002 Eur J Immunol 32: 634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al 2003 J Mol Med 81: 281-7;

Blank et al 2005 Cancer Immunol Immunother 54: 307-314; Konishi et al 2004 Clin Cancer Res 10: 5094.). La supresión inmune puede ser revertida mediante la inhibición de la interacción local de PD1 con PD-L1.

5 [0207] En un ejemplo, el agente comprende el dominio extracelular (ECD) de una molécula inhibidora, por ejemplo, muerte programada de 1 (PD1), puede fusionarse con un dominio transmembrana y dominios de señalización intracelulares, tales como 41BB y CD3 zeta (también denominado en la presente memoria como un CAR PD1). En un ejemplo, el CAR PD1, cuando se utiliza en combinación con un CAR CD19 descrito en el presente documento, mejora la persistencia de la célula T. En un ejemplo, el CAR es un CAR PD1 que comprende el dominio extracelular de PD1 indicada como subrayada en la SEQ ID NO: 121. En un ejemplo, el CAR PD1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121.

10 Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptsfpallvvtgednatficsfsntsesevlnwyrmspsnqtdk
 15 laafpedrsqpgqdcfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylbgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfql
vtppaprprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrvpvtqt
 20 eedgscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrrdpemggkprkrnpqeglynelqkdk
maeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO:121).

25 [0208] En un ejemplo, el PD1 CAR comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada a continuación (SEQ ID NO: 119).

30 ngwfldspdrpwnpptsfpallvvtgednatficsfsntsesevlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvt
qlpngrdfhmsvvrarrndsgtylbgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtppaprprptpaptiasqpl
slrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrvpvtqtqeedgscrfpeeeeggcel
 35 rvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgk
ghdglyqglstatkdydalhmqalppr (SEQ ID NO:119).

40 [0209] En un ejemplo, el agente comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la PD1 CAR, por ejemplo, PD1 CAR descrita en el presente documento. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico para PD1 CAR se muestra a continuación, con la PD1 ECD subrayada a continuación en la SEQ ID NO: 120

45 atggccctcctgtcactgccctgcttctccccctgcactcctgctccacgccgctagaccaccggatggtttctggac
tctccggatcgcccgtggaatcccccaacctctcaccggcactcttggttgactgagggcgataatgacacctcactgctcgtctc
caacacctcgaatcattcgtgctgaactggtaccgcatgagcccgtcaaaccagaccgacaagctcgccgcttccggaagatcgggt
 50 cgcaaccgggacaggattgctggttccgctgactcaactgccgaatggcagagactccacatgagcgtggtccgctagggcga
cgactccgggacctacctgctgggagccatctcgtggcgcttaaggcccaaatcaagagagcttgagggccgaactgagagtgc
cgagcgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgccctggcctgcccgggagttcagacctgctcagaccactccg
 55 gcgccgcgccaccgactccggcccccaactatcgcgagccagcccctgctgctgagggccgaagcatgccgccctgccgccggagg
tgctgtgcataccggggattggacttcgcatgcacatctacattgggctcctcgcgggaacttggtgctgctcctctgtccctggt
catcacctgtactgcaagcggggtcgaaaaagcttctgtacatttcaagcagccctcatgagggccgtgcaaacaccaggagga
 60 ggacggtgctcctgccggttccccgaagaggaagaaggaggttcgagctgcgcgtgaagttctccggagcgcggacgccccgc
ctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcggaagagtagatgtgctggacaagcggcgccggcc
 65 gggacccccgaaatggcggggaagcctagaagaaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccga
ggcctactccgaaattgggatgaagggagagcggcgaggggaaaggggcacgagcggcctgtaccaaggactgtccaccgccacc
aaggacacatacagatgccctgcacatgcaggccctccccctcgc (SEQ ID NO: 120).

[0210] En otro aspecto, la presente invención proporciona una población de células que expresan CAR, por ejemplo, células de la compra. En algunos casos, la población de células CAR que expresan comprende una mezcla de células que expresan diferentes CARs. Por ejemplo, en un ejemplo, la población de células de CART puede incluir una primera célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión anti-CD 19 descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que tiene un dominio de unión anti-CD19 diferente, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 descrito en el presente documento que difiere de el dominio de unión anti-CD19 en el CAR expresada por la primera célula. Como otro ejemplo, la población de células que expresan CAR puede incluir una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión anti-CD 19, por ejemplo, como se describe en el presente documento, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de unión a un antígeno diana distinta de CD19 (por ejemplo, CD123). En un ejemplo, la población de células que expresa CAR incluye, por ejemplo, una primera célula que expresa un CAR que incluye un dominio primario de señalización intracelular, y una segunda célula que expresa un CAR que incluye un dominio de señalización secundario.

[0211] En otro aspecto, la presente descripción proporciona una población de células en la que al menos una célula en la población expresa una CAR que tiene un dominio anti-CD19 descrito en el presente documento, y una segunda célula que expresa otro agente, por ejemplo, un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Moléculas inhibidoras, por ejemplo, pueden, en algunos casos, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de montar una respuesta efectora inmune. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. En un ejemplo, el agente que inhibe una molécula inhibidora comprende un primer polipéptido, por ejemplo, una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que proporciona una señal positiva a la célula, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular se describe en el presente documento. En un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido, por ejemplo, de una molécula inhibidora tal como PD1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta, o un fragmento de cualquiera de éstos (por ejemplo, al menos una parte de un dominio extracelular de cualquiera de éstos), y un segundo polipéptido que es un dominio de señalización intracelular se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprende un dominio coestimulador (por ejemplo, 41BB, CD27 o CD28, por ejemplo, como se describe en el presente documento) y/o un dominio primario de señalización (por ejemplo, un dominio de señalización CD3 zeta describe en el presente documento). en un ejemplo, el agente comprende un primer polipéptido de PD1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, al menos una porción del dominio extracelular de PD1), y un segundo polipéptido de un dominio de señalización intracelular se describe en el presente documento (por ejemplo, un dominio de señalización de CD28 descrito en el presente documento y/o un dominio de señalización zeta CD3 describe en el presente documento).

Transfección de ARN

[0212] Se describen en el presente documento procedimientos para la producción de un ARN transcrito in vitro CAR. La presente invención también incluye una construcción de ARN que codifica CAR que se puede transfectar directamente en una célula. Un procedimiento para generar ARNm para el uso en la transfección puede implicar la transcripción in vitro (IVT) de una plantilla con cebadores diseñados especialmente, seguido de adición de poliA, para producir una construcción que contiene 3' y 5' la secuencia no traducida ('UTR'), una caperuza 5' y/o del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), el ácido nucleico que va a expresarse, y una cola de poliA, típicamente 50-2000 bases de longitud (SEQ ID NO: 118). El ARN así producido puede transfectar eficientemente diferentes tipos de células. En un aspecto, la plantilla incluye secuencias para el CAR.

[0213] En un aspecto, el CAR anti-CD19 está codificado por un ARN mensajero (ARNm). En un aspecto, el ARNm que codifica el CAR anti-CD19 se introduce en una célula T para la producción de una célula CART.

[0214] En una realización, el CAR con ARN transcrito in vitro puede ser introducido en una célula como una forma de transfección transitoria. El ARN se produce por transcripción in vitro utilizando una plantilla generada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés a partir de cualquier fuente puede ser directamente convertida por PCR en una plantilla para la síntesis de ARNm in vitro usando cebadores apropiados y la ARN polimerasa. La fuente del ADN puede ser, por ejemplo, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintética o cualquier otra fuente apropiada de ADN. El molde deseado para la transcripción in vitro es un CAR de la presente invención. Por ejemplo, el molde para el ARN dle CAR comprende una región extracelular que comprende una cadena único dominio variable de un anticuerpo anti-tumor; una región bisagra, un dominio transmembrana (por ejemplo, un dominio transmembrana de CD8a); y una región citoplasmática que comprende un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, que comprende el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 41BB.

[0215] En una realización, el ADN para ser utilizado para la PCR contiene un marco de lectura abierto. El ADN puede ser de una secuencia de ADN de origen natural del genoma de un organismo. En una realización, el ácido nucleico puede incluir algunos o todos de los 5' y/o 3' no traducidas (UTRs). El ácido nucleico puede incluir exones e intrones. En una realización, el ADN para ser utilizado para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humana. En otra realización, el ADN para ser utilizado para la PCR es una secuencia de ácido nucleico humano, incluido el 5' y 3'

UTRs. El ADN puede ser alternativamente una secuencia de ADN artificial que normalmente no se expresa en un organismo de origen natural. Una secuencia de ADN artificial de ejemplo es uno que contiene porciones de genes que se ligan entre sí para formar un marco de lectura abierto que codifica una proteína de fusión. Las porciones de ADN que se ligan juntos pueden ser de un solo organismo o de más de un organismo.

[0216] Se utiliza PCR para generar una plantilla para la transcripción in vitro de ARNm que se usa para la transfección. Los procedimientos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para uso en PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarios a las regiones del ADN para ser utilizado como una plantilla para la PCR. "Sustancialmente complementaria", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos donde una mayoría o la totalidad de las bases en la secuencia del cebador son complementarios, o una o más bases no son complementarias, o no coincidentes. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de hibridarse o hibridar con la diana de ADN destinado en condiciones de recocido utilizados para la PCR. Los cebadores pueden ser diseñados para ser sustancialmente complementaria a cualquier parte de la plantilla de ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden ser diseñados para amplificar la porción de un ácido nucleico que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluyendo 5' y 3' UTRs. Los cebadores también se pueden diseñar para amplificar una porción de un ácido nucleico que codifica un dominio particular de interés. En una realización, los cebadores se diseñaron para amplificar la región de codificación de un ADNc humano, incluyendo la totalidad o porciones de los 5' y 3' UTRs. Los cebadores útiles para la PCR se pueden generar por procedimientos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. "Cebadores hacia adelante" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarias a los nucleótidos en la plantilla de ADN que están aguas arriba de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "En dirección 5'" se utiliza en el presente documento para referirse a una localización 5, a la secuencia de ADN a amplificar con relación a la hebra de codificación. "Los cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a una plantilla de ADN de doble cadena que están aguas abajo de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "En dirección 3'" se utiliza en el presente documento para referirse a un lugar 3' de la secuencia de ADN que va a amplificarse con respecto a la cadena de codificación.

[0217] Cualquier ADN polimerasa útil para la PCR se puede utilizar en los procedimientos descritos en el presente documento. Los reactivos y la polimerasa están disponibles comercialmente de un número de fuentes.

[0218] Las estructuras químicas con la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficacia de traducción también se pueden usar. El ARN tiene preferiblemente 5' y 3' UTRs. En una realización, el 5' UTR es entre uno y 3000 nucleótidos de longitud. La longitud de 5' y 3' UTR secuencias que se añaden a la región de codificación puede ser alterado por diferentes procedimientos, incluyendo, pero no limitado a, el diseño de cebadores para PCR que hibridan con diferentes regiones de las UTRs. Usando este enfoque, un experto ordinario en la técnica puede modificar las longitudes de 5' y 3' UTR necesarias para lograr la eficacia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

[0219] Las 5' y 3' UTRs pueden ser los de origen natural, endógena 5' y 3' UTRs para el ácido nucleico de interés. Alternativamente, las secuencias UTR que no son endógenos al ácido nucleico de interés se pueden añadir mediante la incorporación de las secuencias de UTR en los cebadores directo e inverso o por cualquier otra modificación de la plantilla. El uso de secuencias UTR que no son endógenos al ácido nucleico de interés puede ser útil para la modificación de la estabilidad y/o eficacia de la traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que los elementos ricos en AU en secuencias 3' UTR pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, 3' UTRs pueden ser seleccionados o diseñados para aumentar la estabilidad del ARN transcrito basado en propiedades de UTRs que son bien conocidos en la técnica.

[0220] En una realización, la UTR 5' puede contener la secuencia de Kozak del ácido nucleico endógeno. Alternativamente, cuando un 5' UTR que no es endógeno al ácido nucleico de interés está siendo añadida por PCR como se describió anteriormente, una secuencia Kozak consenso puede ser rediseñado por la adición de la secuencia 5' UTR. Secuencias de Kozak pueden aumentar la eficiencia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parece ser necesario para todos los ARN para permitir la traducción eficiente. El requisito para secuencias de Kozak para muchos mRNAs se conoce en la técnica. En otras realizaciones UTR 5' puede ser 5' UTR de un virus de ARN, cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras formas de realización diferentes análogos de nucleótidos se pueden utilizar en el 3' o 5' UTR para impedir la degradación de la exonucleasa del ARNm.

[0221] Para permitir la síntesis de ARN a partir de una plantilla de ADN sin necesidad de clonación de genes, un promotor de la transcripción debe estar unido a la plantilla de ADN aguas arriba de la secuencia que se transcribe. Cuando una secuencia que funciona como un promotor para una ARN polimerasa se añade al extremo 5' del cebador hacia adelante, el promotor de la ARN polimerasa se incorpora en el producto de PCR en dirección 5' del marco de lectura abierto que va a ser transcrita. En una realización preferida, el promotor es un promotor de polimerasa de T7, como se describe en otra parte en el presente documento. Otros promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, y promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Las secuencias de nucleótidos de consenso para promotores T7, T3 y SP6 son conocidas en la técnica.

[0222] En una realización preferida, el ARNm tiene tanto una tapa en el extremo 5' y una 3' cola de poli (A) que determinan de unión al ribosoma, la iniciación de la traducción y la estabilidad del mRNA en la célula. En un molde de ADN circular, por ejemplo, ADN de plásmido, ARN polimerasa produce un producto concatémica largo que no es adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN del plásmido linealizado en el extremo de la 3' UTR se traduce en ARNm de tamaño normal, que no es eficaz en la transfección eucariota incluso si está poliadenilado después de la transcripción.

[0223] En un molde de ADN lineal, la ARN polimerasa de fago T7 puede extender el extremo 3' de la transcripción más allá de la última base de la plantilla (Schenborn y Mierendorf, Nuc Acids Res., 13: 6223-36 (1985); Nacheva y. Berzal-Herranz, Eur J. Biochem, 270: 1485-1465 (2003).

[0224] El procedimiento convencional de integración de poliA/T se extiende en un molde de ADN es la clonación molecular. Sin embargo secuencia poliA/T integrado en el ADN plásmido puede causar inestabilidad del plásmido, por lo que las plantillas de ADN de plásmidos obtenidos a partir de células bacterianas son a menudo altamente contaminados con deleciones y otras aberraciones. Esto hace que los procedimientos de clonación no sólo laboriosos y lentos pero a menudo no fiables. Es por ello que un procedimiento que permite la construcción de moldes de ADN con tramo de poliA/T 3' sin clonación altamente deseable.

[0225] El segmento de poliA/T de la plantilla de ADN de la transcripción se puede producir durante la PCR usando un cebador inverso que contiene una cola de poli T, tales como 100T cola (SEQ ID NO: 110) (tamaño puede ser 50-5000 T (SEQ ID nO: 111)), o después de la PCR por cualquier otro procedimiento, incluyendo, pero no limitado a, la ligadura de ADN o en la recombinación in vitro. Poli (A) colas también proporcionan estabilidad al ARN y reducir su degradación. Generalmente, la longitud de una cola de poli (A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una realización, el poli (A) de la cola es de entre 100 y 5000 adenosinas (SEQ ID NO: 112).

[0226] Las colas de poli (A) de ARN pueden extenderse aún más después de la transcripción in vitro con el uso de un poli (A) polimerasa, tal como E. coli poliA polimerasa (E-PAP). En una realización, el aumento de la longitud de una (A) de la cola poli de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos (SEQ ID NO: 113) da como resultado un aumento de dos veces en la eficiencia de traducción del ARN. Además, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del mRNA. Dicha unión puede contener modificado/nucleótidos artificiales, aptámeros y otros compuestos. Por ejemplo, análogos de ATP pueden ser incorporados en la cola de poli (A) utilizando poli polimerasa (A). Los análogos de ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN.

[0227] Las caperuzas 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una realización preferida, los ARN producidos por los procedimientos descritos en el presente documento incluyen una caperuza 5'. La caperuza 5' se proporciona usando técnicas conocidas en la técnica y se describe en el presente documento (Cougot, et al, Trends in Biochem Sci, 29: 436-444 (2001); Stepinski, et al, ARN, 7: 1468-95 (2001); Elango, et al, Biochim Biophys Res Commun, 330: 958-966 (2005)).

[0228] Los ARN producidos por los procedimientos descritos en el presente documento también puede contener una secuencia de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). La secuencia IRES puede ser cualquier viral, cromosómica o una secuencia diseñada artificialmente que inicia la unión a ARNm al ribosoma tapa independiente y facilita la iniciación de la traducción. Cualquier solutos adecuados para la electroporación de células, que pueden contener factores que facilitan la permeabilidad celular y la viabilidad tales como azúcares, péptidos, lípidos, proteínas, antioxidantes, y agentes tensioactivos pueden ser incluidos.

[0229] ARN se puede introducir en células diana usando cualquiera de un número de diferentes procedimientos, por ejemplo, los procedimientos disponibles en el comercio que incluyen, pero no se limitan a, electroporación (Amaya Nucleofector-II (Amaya Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) o el gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburg Alemania), catiónicos liposoma transfección mediada por el uso de la lipofección, la encapsulación de polímero, péptido transfección mediada o sistemas de suministro de partícula biolísticos tales como "pistolas de genes" (véase, por ejemplo, Nishikawa, et al Hum gene Ther, 12 (8):.. 861-70 (2001).

Construcciones de ácido nucleico que codifican un CAR

[0230] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una o más construcciones de CAR descritas en el presente documento. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como un transcrito de ARN mensajero. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se proporciona como una construcción de ADN.

[0231] Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en el que el CAR comprende un anti-CD19 dominio de unión (por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 humanizado), un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio de estimulación, por ejemplo, un dominio de señalización

coestimuladora y/o un dominio primario de señalización, por ejemplo, la cadena zeta. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 es un dominio de unión de anticuerpo anti-CD19 descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD19 que comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con un 95-99% identifican los mismos. En un ejemplo, el dominio transmembrana es de dominio de transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste de la alfa, beta o de la cadena zeta del receptor de células T, CD28, epsilon CD3, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En un ejemplo, el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio de transmembrana por una región bisagra, por ejemplo, una bisagra se describe en el presente documento. En un ejemplo, la región bisagra comprende la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas. En un ejemplo, la molécula de ácido nucleico aislada comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador. En un ejemplo, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste de OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), y 4-1BB (CD137). En un ejemplo, el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 41BB y un dominio de señalización funcional de CD3 zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 51, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma, y la secuencia de la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma, en el que las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una sola cadena polipeptídica.

[0232] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una construcción de CAR que comprende una secuencia líder de la SEQ ID NO: 13, un dominio de scFv que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, (o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas), una región bisagra de la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas), un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas), un dominio coestimulador de 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o un dominio coestimulador de CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 51 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma), y un dominio estimulador de CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO : 17 o SEQ ID NO: 43 (o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas).

[0233] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de polipéptido aislada codificada por la molécula de ácido nucleico. En un ejemplo, la molécula de polipéptido aislada comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO : 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas.

[0234] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión anti-CD 19, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulador, y en el que dicho dominio de unión anti-CD19 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas.

[0235] En un ejemplo, la molécula de CAR codificada comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador. En un ejemplo, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste de OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) y 41BB (CD137). En un ejemplo, el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16. En un ejemplo, el dominio transmembrana es un dominio de transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16 , CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154. En un ejemplo, el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización funcional de 41BB y un dominio de señalización funcional de zeta. En un ejemplo, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 y la secuencia de la SEQ ID NO: 17, en el que las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como una sola cadena polipeptídica. En un ejemplo, el dominio de unión anti-CD19 está conectado al dominio transmembrana por una región bisagra. En un ejemplo, la región bisagra comprende la SEQ ID NO: 14. En un ejemplo, la región bisagra comprende la SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49.

[0236] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de CAR codificada que comprende una secuencia líder de la SEQ ID NO: 13, un dominio de scFv que tiene una secuencia seleccionada del grupo que

consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas, una región bisagra de la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 49, un dominio transmembrana que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 15, un dominio coestimulador de 4-1BB que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 16 o un dominio coestimulador de CD27 que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 51, y un dominio estimulador de CD3 zeta que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43. En un ejemplo, la molécula de CAR codificada comprende una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas.

[0237] Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener usando procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante el cribado de bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen a partir de un vector conocido por incluir el mismo, o mediante el aislamiento directamente de células y tejidos que contienen el mismo, utilizando técnicas estándar. Alternativamente, el gen de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

[0238] La presente invención también proporciona vectores en los que se inserta un ADN de la presente invención. Los vectores derivados de retrovirus, tales como los lentivirus, son herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja añadida sobre los vectores derivados de onco-retrovirus, tales como virus de leucemia murina, en que pueden transducir células no proliferantes, tales como los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de una baja inmunogenicidad.

[0239] En otra realización, el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el CAR deseado de la invención es un vector adenoviral (A5/35). En otra realización, la expresión de ácidos nucleicos que codifican los CAR se puede realizar usando transposones, tales como la bella durmiente, crisper, CAS9, y nucleasas de dedos de zinc. Ver abajo June et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716.

[0240] Resumidamente, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican los CAR se consigue típicamente mediante unión operativa de un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o partes del mismo a un promotor, y la incorporación de la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e integración en eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos deseada.

[0241] Las construcciones de expresión de la presente invención también pueden usarse para la inmunización de ácidos nucleicos y terapia génica, usando protocolos estándar de liberación de genes. Los procedimientos para la liberación de genes son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos. Nos. 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. En otra realización, la invención proporciona un vector de terapia génica.

[0242] El ácido nucleico puede clonarse en un cierto número de tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico puede clonarse en un vector que incluye, pero no limitado a, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

[0243] Además, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia de promotor, sitios de endonucleasas de restricción convenientes, y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, WO 01/96584; WO 01/29058; y la patente de Estados Unidos. No. 6.326.193).

[0244] Se ha desarrollado un número de sistemas basados en virus para la transferencia génica en células de mamífero. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para sistemas de liberación de genes. Puede insertarse un gen seleccionado en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales usando técnicas conocidas en el estado de la técnica. El virus recombinante puede entonces aislarse y liberarse a células del sujeto ya sea in vivo o ex vivo. En la técnica se conocen un número de sistemas retrovirales. En algunas realizaciones, se usan vectores de adenovirus. En la técnica se conocen un número de vectores de adenovirus. En una realización, se usan vectores de lentivirus.

[0245] Los elementos promotores adicionales, por ejemplo, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación de la transcripción. Típicamente, éstos se encuentran en la región de 30-110 pb en dirección 5' del sitio de inicio, aunque se ha observado que un número de promotores contienen elementos funcionales en dirección 3' del sitio de inicio

también. El espaciado entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se desplazan uno respecto al otro. En el promotor de la timidina quinasa (tk), el espaciado entre elementos promotores puede aumentarse a 50 pb antes de que la actividad comience a declinar. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar ya sea cooperativamente o independientemente para activar la transcripción.

[0246] Un ejemplo de un promotor que es capaz de expresar un transgén de CAR en una célula T de mamífero es el promotor EF1a. El promotor EF1a nativo conduce la expresión de la subunidad alfa del complejo de factor-1 de elongación, que es responsable de la liberación enzimática de ARNt de aminoacilo al ribosoma. El promotor EF1a se ha utilizado ampliamente en los plásmidos de expresión de mamíferos y ha demostrado ser eficaz en conducir la expresión de CAR a partir de transgenes clonados en un vector lentiviral. Véase, por ejemplo, Milone et al., Mol. Ther. 17 (8): 1453-1464 (2009). En un aspecto, el promotor EF1a comprende la secuencia proporcionada como SEQ ID NO: 100.

[0247] Otro ejemplo de un promotor es la secuencia de promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de conducir altos niveles de expresión de cualquier secuencia de polinucleótido ligada operativamente al mismo. Sin embargo, otras secuencias de promotores constitutivos también se pueden usar, incluyendo, pero no limitado a, el virus de simio 40 (SV40), el promotor temprano, el virus de tumor mamario de ratón (MMTV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor de repetición terminal larga (LTR), MoMuLV promotor, un promotor aviar virus de la leucemia, un virus de Epstein-Barr promotor temprano inmediato, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, pero no limitado a, el promotor de la actina, el promotor de miosina, el factor de elongación-1 α , el promotor de la hemoglobina, y el promotor de la creatina quinasa. Además, la invención no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la invención. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de girar sobre la expresión de la secuencia de polinucleótido al que está unido operativamente cuando se desea tal expresión, o apagar la expresión cuando no se desea la expresión. Ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a un promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de la progesterona, y un promotor de tetraciclina.

[0248] Con el fin de evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones con las mismas, el vector de expresión para ser introducido en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células que expresan a partir de la población de células buscado ser transfectadas o infectadas a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable se puede llevar en un trozo separado de ADN y usarse en un procedimiento de transfección CO-. Ambos marcadores seleccionables y genes informadores pueden ser flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

[0249] Los genes indicadores se usan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen indicador es un gen que no está presente en o expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, la actividad enzimática. La expresión del gen indicador se ensaya en un momento adecuado después de que el ADN se ha introducido en las células receptoras. Genes indicadores adecuados pueden incluir genes que codifican la luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada, o el gen de la proteína verde fluorescente (por ejemplo, Ui-Tei et al, 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y se pueden preparar usando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente. En general, la construcción con la mínima región flanqueante 5' que muestra el nivel más alto de expresión de gen indicador se identifica como el promotor. Tales regiones promotoras pueden estar ligados a un gen indicador y utilizarse para evaluar agentes por su capacidad para modular la transcripción promotor impulsado.

[0250] Los procedimientos para introducir y expresar genes en una célula se conocen en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula huésped, por ejemplo, de mamífero, bacteriana, de levadura o célula de insecto mediante cualquier procedimiento en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir en una célula huésped por medios biológicos, físicos o químicos.

[0251] Los procedimientos físicos para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, y similares. Los procedimientos para producir células que comprenden los vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, 2012, Molecular cloning: A Laboratory Manual, volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Press, Nueva York). Un procedimiento preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped es la transfección con fosfato de calcio

[0252] Los procedimientos biológicos para la introducción de un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente vectores retrovirales, se han

convertido en el procedimiento más ampliamente usado para insertar genes en, por ejemplo, células humanas de mamífero. Otros vectores virales pueden derivar de lentivirus, poxvirus, virus de herpes simplex I, adenovirus y virus adeno-asociados, y similares. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos. Nos. 5.350.674 y 5.585.362.

5 **[0253]** Los medios químicos para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, micropartículas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal a modo de ejemplo para su uso como un vehículo de suministro in vitro e in vivo es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial). Están disponibles otros procedimientos de suministro dirigido del estado de la técnica de ácidos nucleicos, tales como el suministro de polinucleótidos con nanopartículas dirigidas u otro sistema de suministro de tamaño de submicras adecuado.

15 **[0254]** En el caso en que se utiliza un sistema de administración no viral, un vehículo de entrega a modo de ejemplo es un liposoma. El uso de formulaciones de lípidos se contempla para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula huésped (in vitro, ex vivo o in vivo). En otro aspecto, el ácido nucleico puede estar asociado con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido se puede encapsular en el interior acuoso de un liposoma, entremezclado dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unido a un liposoma mediante una molécula de unión que está asociado con tanto el liposoma y el oligonucleótido, atrapado en un liposoma, complejoado con un liposoma, dispersado en una solución que contiene un lípido, mezclado con un lípido, combinado con un lípido, contenido como una suspensión en un lípido, contenido o complejoado con una micela, o de otra manera asociado con un lípido. Composiciones vector asociado lípido, lípido/ADN o lípido/de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura de "plegada". Pueden también simplemente intercalarse en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser de origen natural o lípidos sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotitas grasas que se producen naturalmente en el citoplasma así como la clase de compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes, y aldehídos.

20 **[0255]** Los lípidos adecuados para su uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") puede obtenerse de Sigma, St. Louis, MO; fosfato de dicetilo ("DCP") se puede obtener a partir de K & K Laboratorios (Plainview, NY); colesterol ("Choi") se puede obtener a partir de Calbiochem-Behring; dimiristilo fosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol pueden almacenarse a aproximadamente - 20°C. El cloroformo se usa como el único disolvente ya que es más fácilmente evaporó el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos individuales y multilamelares de lípidos formados por la generación de bicapas o agregados de lípidos encerradas. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas de lípidos separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan auto-antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh et al, 1991 Glycobiology 5: 505-10). Sin embargo, las composiciones que tienen diferentes estructuras en solución de la estructura vesicular normal, también están abarcados. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas de lípidos. También se contemplan complejos de ácido lipofectamina-nucleicos.

25 **[0256]** Independientemente del procedimiento utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula huésped o la expone una célula al inhibidor de la presente descripción, con el fin de confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula huésped, una variedad de ensayos puede ser realizada. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, los ensayos "moleculares biológicos" bien conocidos por los expertos en la técnica, tal como el sur y transferencia de Northern, RT-PCR y PCR; ensayos bioquímicos "", tales como la detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y transferencias Western) o por ensayos descritos en la presente memoria para identificar agentes que caen dentro del alcance de la invención.

30 **[0257]** La presente invención proporciona además un vector que comprende un CAR que codifica molécula de ácido nucleico. En un aspecto, un vector del CAR se puede transducir directamente en una célula, por ejemplo, una célula T. En un aspecto, el vector es un vector de clonación o expresión, por ejemplo, un vector que incluye, pero no limitado a, uno o más plásmidos (por ejemplo, plásmidos de expresión, vectores de clonación, minivectores, cromosomas dobles minuto), vector retroviral y lentiviral constructos. En un aspecto, el vector es capaz de expresar la construcción de CAR en las células T de mamíferos. En un aspecto, la célula T de mamífero es una célula T humana.

Fuentes de células T

35 **[0258]** Antes de la expansión y la modificación genética, se obtiene una fuente de células T de un sujeto. El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que una respuesta inmunitaria puede ser obtenido (por ejemplo, mamíferos). Ejemplos de sujetos incluyen humanos, perros, gatos, ratones, ratas, y especies transgénicas con las

5 mismas. Las células T pueden obtenerse de un número de fuentes, incluyendo las células de sangre periférica mononucleares, médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre del cordón umbilical, el tejido del timo, el tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido de bazo, y tumores. En ciertos aspectos de la presente invención, cualquier número de líneas de células T disponibles en la técnica, puede ser utilizado. En ciertos aspectos de la presente invención, las células T pueden obtenerse de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la técnica, tales como separación de Ficoll™. En un aspecto preferido, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante aféresis. El producto de aféresis típicamente contiene linfocitos, incluyendo las células T, monocitos, granulocitos, células B, otras células blancas de la sangre nucleadas, células rojas de la sangre y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y para colocar las células en un tampón o medio adecuado para las etapas de procesamiento posteriores. En un aspecto de la invención, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En un aspecto alternativo, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos los cationes divalentes. Pasos de activación iniciales en ausencia de calcio puede conducir a la activación ampliada. Como los expertos ordinarios en la técnica sería fácilmente apreciar una etapa de lavado puede llevarse a cabo por procedimientos conocidos por expertos en la técnica, tales como mediante el uso de una centrifuga "flujo a través" semi-automatizado (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, la Baxter CytoMate, o la célula Haemonetics Ahorro 5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspendieron en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, Ca-libre, Mg-PBS libre, Plasmalyte A, u otra solución de solución salina con o sin tampón. Alternativamente, los componentes no deseados de la muestra de aféresis pueden ser quitados y las células directamente resuspendieron en medios de cultivo.

25 **[0259]** En un aspecto, las células T están aislados de linfocitos de sangre periférica mediante la lisis de las células rojas de la sangre y agotando los monocitos, por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente PERCOLLTF o por elutriación centrifuga. Una subpoblación específica de células T, tales como CD3 +, CD28 +, CD4 +, CD8 +, CD45RA +, y células T CD45RO +, se puede aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, en un aspecto, las células T son aisladas mediante incubación con anti-CD3/anti-CD28 (por ejemplo, 3x28) y conjugado con micropartículas, tales como Dynabeads® M-450 CD3/CD28 T, para un período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseados. En un aspecto, el periodo de tiempo es de unos 30 minutos. En un aspecto adicional, el período de tiempo varía desde 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto adicional, el período de tiempo es al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 horas. En un otro aspecto preferido, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. En un aspecto, el período de tiempo de incubación es de 24 horas. Tiempos de incubación más largos pueden ser utilizados para aislar células T en cualquier situación donde hay células T unos en comparación con otros tipos de células, tales en el aislamiento de los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) de tejido tumoral o a partir de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficacia de la captura de las células T CD8 +. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo se dejó que las células T de unirse a las micropartículas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de micropartículas a las células T (como se describe adicionalmente en el presente documento), subpoblaciones de células T se pueden seleccionar preferentemente favor o en contra a la iniciación del cultivo o en otros puntos de tiempo durante el proceso. Además, aumentando o disminuyendo la relación de anticuerpos anti-CD28 en las micropartículas o otra superficie anti-CD3 y/o, subpoblaciones de células T se pueden seleccionar preferentemente a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros puntos de tiempo deseados. El experto en la técnica reconocería que múltiples rondas de selección también se pueden utilizar en el contexto de esta invención. En ciertos aspectos, puede ser deseable llevar a cabo el procedimiento de selección y el uso de las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Células "no seleccionadas" también pueden ser sometidas a rondas adicionales de selección.

50 **[0260]** El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores únicos a las celdas seleccionadas negativamente la superficie. Un procedimiento es la clasificación de células y/o la selección a través de inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4 + por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales típicamente incluye anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, y CD8. En ciertos aspectos, puede ser deseable para enriquecer o seleccionar positivamente para las células T reguladoras que normalmente expresan CD4 +, CD25 +, CD62Lhi, GITR +, y FoxP3 +. Alternativamente, en ciertos aspectos, las células T reguladoras se agotan por micropartículas conjugadas anti-C25 u otro procedimiento similar de selección.

60 **[0261]** En una realización, una población de células T se puede seleccionar que expresa una o más de IFN-γ, TNF, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B, y perforina, u otras moléculas apropiadas, por ejemplo, otras citoquinas. Los procedimientos para la detección de la expresión de células se pueden determinar, por ejemplo, por los procedimientos descritos en la publicación PCT No.: WO 2013/126712.

65 **[0262]** Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, la concentración de células y la superficie (por ejemplo, partículas tales como micropartículas) puede ser variada. En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que los granos y las células se

mezclan entre sí (por ejemplo, aumentar la concentración de células), para asegurar el contacto máximo de las células y los granos. Por ejemplo, en un aspecto, /ml se utiliza una concentración de 2 mil millones de células. En un aspecto, /ml se utiliza una concentración de 1 mil millones de células. En un aspecto adicional, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, se utiliza 35, 40, 45, o 50 millones de células/ml. En aún un aspecto, una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95, o 100 millones de células/ml se utiliza. En aspectos adicionales, /ml se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células. El uso de concentraciones altas puede provocar un aumento de rendimiento celular, activación celular, y la expansión de células. Además, el uso de concentraciones celulares elevadas permite la captura más eficiente de células que pueden antígenos diana débilmente expresados de interés, tales como células T CD28-negativas, o a partir de muestras en las que hay muchas células tumorales presentes (por ejemplo, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtener. Por ejemplo, utilizando alta concentración de células permite una selección más eficaz de células T CD8 + que normalmente tienen expresión CD28 más débiles.

[0263] En un aspecto relacionado, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de las células T y la superficie (por ejemplo, partículas tales como micropartículas), las interacciones entre las partículas y las células se reduce al mínimo. Esto selecciona para células que expresan grandes cantidades de antígenos deseados para ser unido a las partículas. Por ejemplo, las células T CD4 + expresan altos niveles de CD28 y son capturados de manera más eficiente que las células T CD8 + en concentraciones diluidas. En un aspecto, la concentración de células utilizado es 5×10^6 /ml. En otros aspectos, la concentración usada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a 1×10^6 /ml, y cualquier valor entero en el medio.

[0264] En otros aspectos, las células se pueden incubar en un rotador durante distintos períodos de tiempo a distintas velocidades en cualquiera de 2-10°C o a temperatura ambiente.

[0265] Las células T para la estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. No se desea estar ligado por la teoría, la congelación y posterior descongelación paso proporciona un producto más uniforme mediante la eliminación de los granulocitos y en algún grado monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Mientras que muchas soluciones de congelación y parámetros son conocidos en la técnica y serán útiles en este contexto, un procedimiento implica el uso de PBS que contenía 20% de DMSO y albúmina de suero humano al 8%, o de medios de cultivo que contenían 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% albúmina de suero humano y 7,5% de DMSO, o 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% de dextrosa 5%, 0,45% de NaCl, 10% de dextrano 40 y 5% de dextrosa, 20% albúmina de suero humano, y 7,5% de DMSO o de otros medios de congelación celular adecuados que contiene, por ejemplo, Hespán y Plasmalyte a, las células luego se congelan a -80°C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Otros procedimientos de congelación controlada se pueden utilizar, así como la congelación no controlada inmediatamente a -20°C o en nitrógeno líquido.

[0266] En ciertos aspectos, las células criopreservadas se descongelan y se lavan como se describe en el presente documento y se les permite reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación usando los procedimientos de la presente invención.

[0267] También se contemplan en el contexto de la invención es la colección de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo antes de cuando podrían ser necesarias las células expandidas como descrito en el presente documento. Como tal, la fuente de las células para ser expandido se puede recoger en cualquier punto de tiempo necesario, y las deseadas células, tales como células T, aislados y congelados para su uso posterior en la terapia de células T para cualquier número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia de células T, tales como los descritos en el presente documento. En un aspecto una muestra de sangre o una aféresis se toma de un sujeto generalmente sano. En ciertos aspectos, una muestra de sangre o una aféresis es tomada de un sujeto sano en general que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no se ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés son aislados y congelados para su uso posterior. En ciertos aspectos, las células T pueden expandirse, congelados, y se utilizan en un momento posterior. En ciertos aspectos, las muestras se recogen de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular tal como se describe en el presente documento, pero antes de cualquier tratamiento. En un aspecto adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis a partir de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento pertinentes, incluyendo pero no limitado al tratamiento con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivirales, quimioterapia, radiación, inmunosupresor agentes, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato, y FK506, anticuerpos, u otros agentes immunoablative tales como CAMPATH, los anticuerpos anti-CD3, Cytosan, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, y la irradiación.

[0268] En un aspecto adicional de la presente invención, las células T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento que deja al sujeto con las células T funcionales. En este sentido, se ha observado que después de ciertos tratamientos de cáncer, en determinados tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmune, poco después del tratamiento durante el período en que los pacientes normalmente se recuperan a partir

del tratamiento, la calidad de las células T obtenido puede ser óptimo o mejorado por su capacidad para expandir ex vivo. Del mismo modo, después de la manipulación ex vivo utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para el injerto mejorado y la expansión in vivo. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente invención para recoger las células sanguíneas, incluyendo células T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en ciertos aspectos, la movilización (por ejemplo, de movilización con GM-CSF) y regímenes de acondicionamiento se pueden utilizar para crear una condición en un sujeto en el que la repoblación, la recirculación, la regeneración y/o expansión de tipos de células particulares se favorece, especialmente durante una ventana de tiempo definido después de la terapia. Tipos celulares ilustrativos incluyen células T, células B, células dendríticas y otras células del sistema inmune.

Activación y expansión de células T

[0269] Las células T pueden ser activadas y expandidas normalmente usando los procedimientos, tal como se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la solicitud de patente US No. 20060121005.

[0270] En general, las células T de la invención pueden ser expandido en contacto con una superficie tiene unido al mismo un agente que estimula una señal asociada complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células T. En particular, las poblaciones de células T pueden ser estimuladas como se describe en el presente documento, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o antígeno-fragmento de unión del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado sobre una superficie, o por contacto con una proteína quinasa C activador (por ejemplo, briostatina) en conjunción con un ionóforo de calcio. Para co-estimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, un ligando que se une se utiliza la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células T puede contactarse con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células T. Para estimular la proliferación de cualquiera de las células T CD4 + o células T CD8 +, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9,3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Francia) puede ser usado como pueden otros procedimientos comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al, Transplant Proc 30 (8):... 3975-3977, 1998; Haanen et al, J. Exp Med 190 (9):. 13191328, 1999; Garland et al, J. Immunol Meth 227 (1-2): 53-63, 1999).

[0271] En ciertos aspectos, la señal de estimulación primaria y la señal coestimuladora para la célula T puede ser proporcionada por los diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplado a una superficie. Cuando se acopla a una superficie, los agentes pueden estar acoplados con la misma superficie (es decir, en la formación "cis") o para separar las superficies (es decir, en la formación de "trans"). Alternativamente, un agente puede acoplarse a una superficie y el otro agente en solución. En un aspecto, el agente que proporciona la señal coestimuladora se une a una superficie de la célula y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En ciertos aspectos, los dos agentes pueden estar en solución. En un aspecto, los agentes pueden estar en forma soluble, y luego reticulado a una superficie, tal como una célula que expresa receptores de Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. A este respecto, véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos. Nos. 20040101519 y 20060034810 para las células presentadoras de antígeno artificiales (AAPCS) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de células T en la presente invención.

[0272] En un aspecto, los dos agentes se inmovilizan sobre micropartículas, ya sea en la misma micropartícula, es decir, "cis", o para separar las micropartículas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes son co-inmovilizados a la misma micropartícula en cantidades moleculares equivalentes. En un aspecto, se usa una relación 1:1 de cada anticuerpo unido a las micropartículas para la expansión de células T CD4 + y el crecimiento de células T. En ciertos aspectos de la presente invención, una proporción de anticuerpos anti-CD3:CD28 unidos a las micropartículas se utiliza de tal manera que se observa un aumento en la expansión de células T en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En un aspecto particular un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces se observa en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En un aspecto, la proporción de anticuerpo CD3:CD28 unido a las micropartículas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-CD28 se une más a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es menor que uno. En ciertos aspectos de la invención, la relación de anticuerpo anti CD28 a anticuerpo anti CD3 unido a las micropartículas es mayor que 2:1. En un aspecto particular, se utiliza relación 1:100 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a las micropartículas. En un aspecto, se utiliza una relación un 1:75 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a las micropartículas. En un aspecto adicional, se utiliza relación CD3:CD28 1:50 de anticuerpo unido a las micropartículas. En un aspecto, se utiliza una relación 1:30 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a las micropartículas. En un aspecto preferido, se utiliza una relación 1:10 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a las micropartículas. En un aspecto, se utiliza una relación de 1:3 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a las

micropartículas. En aún un aspecto, se utiliza una relación 3:1 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a las micropartículas.

[0273] Las proporciones de partículas a células de 1: 500 a 500: 1 y cualesquiera valores enteros en el medio puede ser usado para estimular las células T u otras células diana. Como los expertos ordinarios en la técnica puede apreciar fácilmente, la proporción de partículas a las células puede depender del tamaño de partícula con respecto a la célula diana. Por ejemplo, pequeñas micropartículas de tamaño sólo podían unirse unas pocas células, mientras que los granos más grandes podrían obligar a muchos. En ciertos aspectos la relación de células a las partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualesquiera valores enteros en el medio y en otros aspectos, la relación comprende 1:9 a 9:1 y cualquier número entero valores en el medio, también puede ser utilizado para estimular células T. La relación de anti-CD3 y las partículas anti-CD28 acoplado a las células T que dan como resultado la estimulación de células T pueden variar como se señaló anteriormente, sin embargo ciertos valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, y 15:1 con una relación preferida de al menos 1: 1 partículas por célula T. En un aspecto, se utiliza una relación de partículas a células de 1:1 o menos. En un aspecto particular, una partícula preferida: proporción de células es de 1:5. En aspectos adicionales, la relación de partículas a células se puede variar dependiendo del día de la estimulación. Por ejemplo, en un aspecto, la relación de partículas a células es de 1: 1 a 10: 1 en el primer día y las partículas adicionales se añadieron a las células cada día o cada dos días a partir de entonces por hasta 10 días, a las relaciones finales de 1: 1 a 1:10 (basado en los recuentos de células en el día de la adición). En un aspecto particular, la relación de partículas a células es de 1:1 en el primer día de la estimulación y se ajustó a 1:5 en el tercer y quinto días de estimulación. En un aspecto, se añaden partículas en un diario o cada dos días base a una relación final de 1:1 en el primer día, y 1:5 en el tercer y quinto días de estimulación. En un aspecto, la relación de partículas a células es de 2:1 en el primer día de la estimulación y se ajustó a 1:10 en el tercer y quinto días de estimulación. En un aspecto, se añaden partículas en un diario o cada dos días base a una relación final de 1:1 en el primer día, y 1:10 en el tercer y quinto días de estimulación. Un experto en la técnica apreciará que una variedad de otras relaciones puede ser adecuadas para su uso en la presente invención. En particular, las proporciones pueden variar dependiendo del tamaño de las partículas y del tamaño de la célula y el tipo. En un aspecto, las proporciones más típicas de uso en la vecindad de 1:1, 2:1 y 3:1 en el primer día.

[0274] En aspectos adicionales de la presente invención, las células, como las células T, se combinan con micropartículas recubiertas de agente, las micropartículas y las células se separan posteriormente, y luego las células se cultivan. En un aspecto alternativo, antes del cultivo, las micropartículas y las células de agente recubierto no se separaron, pero se cultivan juntos. En un aspecto adicional, las micropartículas y las células se concentran en primer lugar mediante la aplicación de una fuerza, como una fuerza magnética, que resulta en aumento de ligación de marcadores de superficie celular, induciendo de este modo la estimulación de células.

[0275] A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular se pueden ligar al permitir micropartículas paramagnéticas al que están unidos anti-CD3 y anti-CD28 (micropartículas 3x28) para ponerse en contacto con las células T. En un aspecto de las células (por ejemplo, 10^4 a 10^9 T células) y los granos (por ejemplo, Dynabeads® M-450 CD3/CD28 micropartículas paramagnéticas T a una relación de 1: 1) se combinan en un tampón, por ejemplo PBS (sin cationes divalentes tales como, calcio y magnesio). Una vez más, los expertos ordinarios en la técnica pueden apreciar fácilmente cualquier concentración de células puede ser utilizado. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy raro en la muestra y comprender solamente 0,01% de la muestra o toda la muestra (es decir, 100%) puede comprender la célula diana de interés. En consecuencia, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. En ciertos aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las partículas y las células se mezclan entre sí (es decir, aumentar la concentración de células), para asegurar el contacto máximo de las células y partículas. Por ejemplo, en un aspecto,/ml se utiliza una concentración de alrededor de 2 mil millones de células. En un aspecto, mayor que 100 millones de células/ml se utiliza. En un aspecto adicional, una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, se utiliza 35, 40, 45, o 50 millones de células/ml. En aún un aspecto, una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95, o 100 millones de células/ml se utiliza. En aspectos adicionales,/ml se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células. El uso de concentraciones altas puede provocar un aumento de rendimiento celular, activación celular, y la expansión de células. Además, el uso de concentraciones celulares elevadas permite la captura más eficaz de células que pueden antígenos diana débilmente expresas de interés, tales como células T CD28-negativas. Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtener en ciertos aspectos. Por ejemplo, utilizando alta concentración de células permite una selección más eficaz de células T CD8 + que normalmente tienen expresión CD28 más débiles.

[0276] En un aspecto de la presente invención, la mezcla puede ser cultivada durante varias horas (alrededor de 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero por hora en el medio. En un aspecto, la mezcla puede ser cultivada durante 21 días. En un aspecto de la invención, las micropartículas y las células T se cultivan juntos durante aproximadamente ocho días. En un aspecto, las micropartículas y las células T se cultivan juntos durante 2-3 días. Varios ciclos de estimulación también pueden ser deseables de tal manera que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, bovino fetal o humana suero), la

interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF, y TNF- α o cualquier otros aditivos para el crecimiento de células conocidos por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, agente tensioactivo, plasmanato, y agentes tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol reductor. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20, Optimizer, con ácidos añadidos aminoácidos, piruvato de sodio, y vitaminas, ya sea libre de suero o complementado con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina (s) suficiente para el crecimiento y expansión de células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin, se incluyen sólo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que han de ser infundida en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para sostener el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (por ejemplo, 37°C) y la atmósfera (por ejemplo, aire más 5% de CO₂).

[0277] Las células T que han sido expuestas a los tiempos de estimulación variadas pueden presentar características diferentes. Por ejemplo, la sangre típico o productos de células mononucleares de sangre periférica apherese tienen una población de células T auxiliares (TH, CD4 +) que es mayor que el citotóxico o supresor T población celular (TC, CD8 +). La expansión ex vivo de las células T mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que antes sobre los días 8-9 consta predominantemente de células TH, mientras que después de aproximadamente 8-9 días, la población de células T comprende una población cada vez mayor de células TC. En consecuencia, dependiendo de la finalidad del tratamiento, la infusión de un sujeto con una población de células T que comprende predominantemente de células TH puede ser ventajosa. Del mismo modo, si se ha aislado un subconjunto específico de antígeno de células TC puede ser beneficioso para expandir este subconjunto en un grado mayor.

[0278] Además, adicionalmente a los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, de forma reproducible durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, tal reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de células T activadas para propósitos específicos.

[0279] Una vez que se construye un CD19 CAR, varios ensayos se pueden usar para evaluar la actividad de la molécula, tal como, pero no limitado a, la capacidad de expandir las células T después de la estimulación del antígeno, mantener la expansión de células T en ausencia de re-estimulación, y anti-cáncer de actividades en apropiada en modelos in vitro y animales. Los ensayos para evaluar los efectos de un CD19 CAR se describen en mayor detalle más adelante

[0280] El análisis de transferencia Western de la expresión CAR en las células T primarias se puede utilizar para detectar la presencia de monómeros y dímeros. Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Terapia 17 (8): 1453-1464 (2009). Muy brevemente, células T (mezcla 1: 1 de CD4 + y CD8 + células T) que expresan los CARs se expandieron in vitro durante más de 10 días, seguido de la lisis y la SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los CARs que contienen la longitud completa de dominio citoplasmático TCR- ζ y la cadena TCR- ζ endógena son detectados por Western Blot utilizando un anticuerpo a la cadena TCR- ζ . Los mismos subconjuntos de células T se utilizan para el análisis SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras para permitir la evaluación de la formación del dímero covalente.

[0281] En vitro expansión de CAR + células T después de la estimulación del antígeno se puede medir por citometría de flujo. Por ejemplo, una mezcla de CD4 + y CD8 + células T son estimuladas con CD3/ α CD28 APCS seguido de la transducción con vectores lentivirales que expresan GFP bajo el control de los promotores para ser analizados. Promotores de ejemplo incluyen el gen de CMV IE, EF-1 α , ubiquitina C, o promotores (PGK) phosphoglycerokinase. La fluorescencia de GFP se evalúa en el día 6 de cultivo en el CD4 + CD8 y/o + subconjuntos de células T por citometría de flujo. Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Terapia 17 (8): 1453-1464 (2009). Alternativamente, una mezcla de CD4 + y CD8 + células T son estimuladas con micropartículas magnéticas CD3/ α CD28 recubiertas en el día 0, y transducidas con CAR en el día 1 utilizando un vector lentiviral que expresa bicistrónico CAR junto con eGFP usando un ribosomal 2A saltarse secuencia. Los cultivos se re-estimularon con CD19 + células K562 (K562-CD19), de tipo salvaje células K562 (K562 tipo salvaje) o células K562 que expresan hCD32 y 4-1BBL en presencia de antiCD3 y anticuerpo anti-CD28 (K562 -BBL -3/28) después del lavado. Exógena de IL-2 se añade a los cultivos cada dos días a 100 UI/ml. GFP + células T se enumeran por citometría de flujo utilizando el recuento basado en micropartículas. Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Terapia 17 (8): 1453-1464 (2009).

[0282] La expansión de células T+ CAR sostenida en ausencia de re-estimulación también se puede medir. Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Terapia 17 (8): 1453-1464 (2009). Brevemente, el volumen medio de células T (fl) se mide en el día 8 de cultivo usando un contador de partículas Coulter Multisizer III después de la estimulación con micropartículas CD3/ α CD28 recubiertas magnéticas en día 0, y transducción con el CAR se indica en el día 1.

[0283] Los modelos animales también pueden ser utilizados para medir una actividad CART. Por ejemplo, puede utilizarse un modelo de xenoinjerto utilizando células T CAR+ específicas de CD19 humanas para el tratamiento de una ALL pre-B primaria humana en ratones inmunodeficientes. Véase, por ejemplo, Milone et al, Molecular Terapia 17 (8): 1453-1464 (2009). Muy brevemente, tras el establecimiento de todo, los ratones se asignaron al azar a

- grupos de tratamiento como. Diferentes números de α CD19- ζ y α CD19-BB- ζ diseñados células T se inyectan conjuntamente en una relación 1: 1 en NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ ratones que llevan B-ALL. El número de copias de α CD19- ζ y vector α CD19-BB- ζ en el ADN de bazo de ratones se evalúa en diversos momentos después de la inyección de células T. Los animales son evaluados para la leucemia a intervalos semanales. Peripheral CD19 sangre + recuentos de células B-ALL hornos se miden en los ratones que se inyectan con el CAR α CD19- ζ + células T o células T de forma simulada transducidas. Las curvas de supervivencia para los grupos se compararon mediante la prueba de log-rank. Además, la sangre periférica absoluta CD4 + y CD8 + T de células 4 semanas después de la inyección de las células T en ratones NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ ratones pueden también ser analizados. Los ratones son inyectados con células leucémicas y 3 semanas más tarde, se inyectan con células T ingeniería genética para expresar CAR por un vector lentiviral bicistrónico que codifica el CAR vinculado a eGFP. Las células T se normalizan a 45-50% GFP de entrada + células T mediante la mezcla con las células transducidas de forma simulada antes de la inyección, y se confirmaron por citometría de flujo. Los animales son evaluados para la leucemia en intervalos de 1 semana. Las curvas de supervivencia para el CAR + grupos de células T se compararon mediante la prueba de log-rank.
- 5
- 10
- 15 **[0284]** dependiente de la dosis la respuesta al tratamiento CAR puede ser evaluada. Véase, por ejemplo, Milone et al, *Molecular Terapia* 17 (8): 1453-1464 (2009). Por ejemplo, se obtiene sangre periférica 35-70 días después de establecer la leucemia en ratones inyectados en el día 21 con células CAR T, un número equivalente de células T de forma simulada transducidas, o no hay células T. Los ratones de cada grupo se sangran al azar para la determinación de periférica CD19 sangre + Todos los recuentos BLAST y luego murió el día 35 y 49. El resto de los
- 20 animales son evaluados en los días 57 y 70.
- [0285]** La evaluación de la proliferación celular y la producción de citoquinas ha sido descrito previamente, por ejemplo, en Milone et al, *Molecular Terapia* 17 (8):. 1453-1464 (2009). Brevemente, la evaluación de la proliferación CAR mediada se lleva a cabo en placas de microtitulación mediante la mezcla se lavó las células T con células K562 que expresan CD19 (K19) o CD32 y CD137 (KT32-BBL) para una célula T final: relación K562 de 2: 1. Células K562 se irradian con radiación gamma antes de su uso. Anti-CD3 (OKT3 clon) y CD28 anti- (clon 9.3) Los anticuerpos monoclonales se añadieron a los cultivos con células KT32-BBL para servir como un control positivo para la estimulación de la proliferación de células T, ya que estas señales apoyan CD8 largo plazo + expansión de células T ex vivo. Las células T se enumeran en cultivos usando micropartículas fluorescentes CountBright™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y citometría de flujo como se describe por el fabricante. CAR + células T se identifican por la expresión de GFP usando células T que se han diseñado con eGFP-2A vinculado vectores lentivirales CAR que expresan. Para las células CAR + T que no expresan GFP, el CAR + T se detectaron células con biotina proteína CD19 recombinante y un conjugado de avidina-PE secundario. CD4 + y CD8 + expresión en las células T también se detectan simultáneamente con anticuerpos monoclonales específicos (BD Biosciences). Mediciones de citoquinas se realizan en sobrenadantes recogidos 24 horas después de re-estimulación usando el TH1 humano/TH2 de citoquinas por citometría de matriz de micropartículas kit (BD Biosciences, San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se evaluó a través de un citómetro de flujo FACSCalibur, y los datos se analizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 25
- 30
- 35
- 40 **[0286]** La citotoxicidad puede ser evaluada por un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar. Véase, por ejemplo, Milone et al, *Molecular Terapia* 17 (8): 1453-1464 (2009). Brevemente, las células diana (líneas K562 y primarias pro-B-células) se cargan con ^{51}Cr (como NaCrO_4 , New England Nuclear, Boston, MA) a 37°C durante 2 horas con agitación frecuente, se lavaron dos veces en RPMI completo y se sembraron en placas de microtitulación. Células T efectoras se mezclan con células diana en los pocillos en RPMI completo en relaciones variables de célula efectora: célula diana (E: T). (Liberación total, TR) también se preparan pozos adicionales que contienen medios de comunicación sólo (liberación espontánea, SR) o una solución al 1% de Triton-X 100 detergente. Después de 4 horas de incubación a 37°C , se recoge el sobrenadante de cada pocillo. Autorización de ^{51}Cr se mide entonces usando un contador de partículas gamma (Packard Instrument Co., Waltham, MA). Cada condición se realiza al menos por triplicado, y el porcentaje de lisis se calculó usando la fórmula: % de lisis = $(\text{ER} - \text{SR}) / (\text{TR} - \text{SR})$, donde ER representa el promedio de ^{51}Cr liberado para cada condición experimental.
- 45
- 50
- [0287]** Las tecnologías de la imagen se pueden utilizar para evaluar el tráfico específico y la proliferación de las CAR en modelos animales portadores de tumores. Dichos ensayos se han descrito, por ejemplo, en Barrett et al, *Human Gene Therapy* 22: 1575-1586 (2011). Brevemente, C NOD SCID $^{-/-}$ IV (NSG) ratones se inyectan con Nalm-6 células seguido de 7 días más tarde con células T 4 horas después de la electroporación con las construcciones de CAR. Las células T son transfectadas de forma estable con una construcción lentiviral para expresar la luciferasa de luciérnaga, y los ratones son imágenes de bioluminiscencia. Alternativamente, la eficacia terapéutica y la especificidad de una sola inyección de CAR + células T en Nalm-6 modelo de xenoinjerto se pueden medir como la siguiente: los ratones del NSG son inyectados con Nalm-6 transducidas para expresar de forma estable la luciferasa de luciérnaga, seguido de una sola cola-vena la inyección de las células T a electroporación con CD 19 CAR 7 días más tarde. Los animales son imágenes en diversos puntos de tiempo de inyección posterior. Por ejemplo, los mapas de calor fotón densidad de leucemia luciérnaga luciferasepositivo en ratones representante en días 5 (2 días antes del tratamiento) y el día 8 (24 h después de CAR + PBLs) se pueden generar.
- 55
- 60
- 65 **[0288]** Otros ensayos, incluyendo los descritos en la sección de Ejemplos en el presente documento, así como los que se conocen en la técnica, también se pueden utilizar para evaluar las construcciones CD19 CAR de la invención.

Aplicación terapéutica*Enfermedades y/o trastornos asociados a CD19*

- 5
- [0289]** En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar una enfermedad asociada con la expresión de CD19. En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar una enfermedad en la que una parte del tumor es negativa para CD19 y parte del tumor es positiva para CD19. Por ejemplo, el CAR de la presente descripción es útil para el tratamiento de sujetos que se han sometido a tratamiento para una enfermedad asociada con la elevada expresión de CD19, en donde el sujeto que ha experimentado tratamiento para niveles elevados de CD19 muestra una enfermedad asociada con niveles elevados de CD19.
- 10
- [0290]** En un aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende CD19 CAR unido operativamente al promotor para la expresión en células T de mamíferos. En un aspecto, la invención proporciona una célula T recombinante que expresa el CD19 CAR para su uso en el tratamiento de tumores de expresión de CD19, donde la célula T recombinante que expresa el CD19 CAR se denomina un CAR CD19. En un aspecto, la CART CD19 de la invención es capaz de poner en contacto una célula tumoral con al menos un CD19 CAR de la invención expresa en su superficie de tal manera que CART se dirige a la célula tumoral y el crecimiento del tumor es inhibido.
- 15
- [0291]** En un aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de inhibir el crecimiento de una célula tumoral que expresa CD19, que comprende poner en contacto la célula tumoral con una célula CART CD19 de la presente invención, de tal manera que el CART se activa en respuesta al antígeno y reconoce la célula de cáncer, en el que el crecimiento del tumor es inhibido.
- 20
- [0292]** En un aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de tratamiento de cáncer en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al sujeto una célula CART CD19 de la presente invención tal que el cáncer es tratado en el sujeto. Un ejemplo de un cáncer que es tratable por la célula CART CD19 de la invención es un cáncer asociado con la expresión de CD19. En un aspecto, el cáncer asociado con la expresión de CD19 es un cáncer hematológico. En un aspecto, el cáncer hematológico es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, un cáncer asociado con la expresión de CD19 incluye cánceres y tumores malignos, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, una o más leucemias agudas, incluyendo, pero no limitadas a, por ejemplo, la leucemia linfocítica aguda de células B ("BALL"), leucemia linfocítica aguda de células T ("TALL"), leucemia linfocítica aguda (ALL); una o más leucemias crónicas incluyendo, pero no limitado a, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos adicionales o condiciones hematológicas, incluyendo, pero no limitado a, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablasto, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenström, y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y similares. Además una enfermedad asociada con la expresión de CD19 incluyen, pero no limitado a, cánceres atípicos y/o no clásicos, malignidades, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas asociadas con la expresión de CD19.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- [0293]** En algunas realizaciones, un cáncer que puede ser tratado con un CAR CD19, por ejemplo, descrito en el presente documento, es el mieloma múltiple. El mieloma múltiple es un cáncer de la sangre, caracterizado por la acumulación de un clon de células plasmáticas en la médula ósea. Las terapias actuales para el mieloma múltiple incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento con lenalidomida, que es un análogo de la talidomida. La lenalidomida tiene actividades que incluyen la actividad anti-tumoral, inhibición de la angiogénesis, y la inmunomodulación. Generalmente, se cree que las células de mieloma son negativas para la expresión CD19 mediante citometría de flujo. La presente invención abarca el reconocimiento de que un pequeño porcentaje de células tumorales de mieloma expresan CD19, tal como se demuestra en el Ejemplo 6. De este modo, en algunas realizaciones, un CAR C19, por ejemplo, como se describe en el presente documento, se puede utilizar para reconocer las células de mieloma. En algunas realizaciones, la terapia con CAR CD19 se puede usar en combinación con una o más terapias adicionales, por ejemplo, tratamiento con lenalidomida.
- 50
- 55
- [0294]** La invención incluye un tipo de terapia celular donde las células T se modifican genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula T con CAR se infunde a un receptor en necesidad del mismo. La célula infundida es capaz de matar las células tumorales en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células T modificadas con CAR son capaces de replicarse in vivo dando lugar a una persistencia a largo plazo que puede conducir a control tumoral sostenido. En diversos aspectos, las células T administradas al paciente, o su progenie, persisten en el paciente durante al menos cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, trece meses, catorce meses, quince meses, dieciséis meses, diecisiete meses, dieciocho meses, diecinueve meses, veinte meses, veintiún meses, veintidós meses, veintitrés meses, dos años, tres años, cuatro años, o cinco años después de la administración de la célula T al paciente.
- 60
- 65

5 **[0295]** La invención también incluye un tipo de terapia celular donde se modifican las células T, por ejemplo, por el ARN transcrito in vitro, para expresar transitoriamente un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la célula T con CAR se infunde a un receptor en necesidad del mismo. La célula infundida es capaz de matar células tumorales en el receptor. Por lo tanto, en varios aspectos, las células T administradas al paciente están presentes durante menos de un mes, por ejemplo, tres semanas, dos semanas, una semana, después de la administración de las células T al paciente.

10 **[0296]** Sin desear estar ligado por ninguna teoría en particular, la respuesta de inmunidad anti-tumoral provocada por las células T modificadas con CAR puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva, o alternativamente puede ser debido a una respuesta inmunitaria directa vs indirecta. En un aspecto, las células T transducidas con CAR muestran la secreción específica de citoquinas proinflamatorias y una potente actividad citolítica en respuesta a células de cáncer humano que expresan CD19, resistir la inhibición de CD19 soluble, mediar la destrucción circundante y mediar en la regresión de un tumor humano establecido. Por ejemplo, las células tumorales sin antígeno menos dentro de un campo heterogéneo de tumores que expresan CD19 pueden ser susceptibles a la destrucción indirecta por las células T redirigidas a CD19 que ha reaccionado previamente contra las células cancerosas positivas al antígeno adyacentes.

15

20 **[0297]** En un aspecto, las células T modificadas con CAR completamente humanas de la invención pueden ser un tipo de vacuna para la inmunización ex vivo y/o en la terapia in vivo en un mamífero. En un aspecto, el mamífero es un ser humano.

25 **[0298]** Con respecto a la inmunización ex vivo, al menos una de las siguientes situaciones tiene lugar in vitro antes de la administración de la célula en un mamífero: i) expansión de las células, ii) la introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR a las células o iii) crioconservación de las células.

30 **[0299]** Los procedimientos ex vivo son bien conocidos en la técnica y se discuten más completamente a continuación. Brevemente, las células se aíslan de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o transfectan in vitro) con un vector que expresa un CAR descrito en el presente documento. La célula modificada con CAR puede administrarse a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. El receptor mamífero puede ser un ser humano y la célula modificada con CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Alternativamente, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

35 **[0300]** El procedimiento para la expansión ex vivo de células madre y progenitoras hematopoyéticas que se describe en la patente de los Estados Unidos. No. 5.199.942, se puede aplicar a las células de la presente invención. Otros procedimientos adecuados son conocidos en la técnica, por lo tanto, la presente invención no se limita a ningún procedimiento particular de la expansión ex vivo de las células. Brevemente, el cultivo y la expansión ex vivo de células T comprende: (1) recoger células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero de la recogida de sangre periférica o de explantes de médula ósea; y (2) expandir tales células ex vivo. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la patente de los Estados Unidos. No. 5.199.942, otros factores, tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y el ligando c-kit, se pueden utilizar para el cultivo y la expansión de las células.

40

45 **[0301]** Además de usar una vacuna basada en células en términos de inmunización ex vivo, la presente descripción también proporciona composiciones y procedimientos para la inmunización in vivo para provocar una respuesta inmunitaria dirigida contra un antígeno en un paciente.

50 **[0302]** En general, las células activadas y expandidas como se describen en el presente documento se pueden utilizar en el tratamiento y prevención de enfermedades que aparecen en individuos que están inmunocomprometidos. En particular, las células T modificadas con CAR de la invención se utilizan en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de CD19. En ciertos aspectos, las células de la invención se utilizan en el tratamiento de pacientes en riesgo de desarrollar enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de CD19. Por lo tanto, la presente descripción proporciona procedimientos para el tratamiento o la prevención de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la expresión de CD19 que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz de las células T modificadas con CAR de la invención.

55

60 **[0303]** En un aspecto, las células CART de las invenciones pueden utilizarse para tratar una enfermedad proliferativa, tal como un cáncer o tumor maligno o es una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia. En un aspecto, el cáncer es un cáncer hematológico. En un aspecto, el cáncer hematológico es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, las células CART de la invención pueden usarse para tratar cánceres y tumores malignos tales como, pero no limitado a, por ejemplo, leucemias agudas incluyendo, pero no limitados a, por ejemplo, la leucemia linfocítica aguda de células B ("BALL"), leucemia linfocítica aguda de células T ("TALL"), leucemia linfocítica aguda (ALL); una o más leucemias crónicas incluyendo, pero no limitado a, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos adicionales o condiciones hematológicas, incluyendo, pero no limitado a, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasma de

65

células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom, y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y similares. Además una enfermedad asociada con la expresión de CD 19 incluyen, pero no limitada a, por ejemplo, cánceres atípicos y/o no clásicos, tumores malignos, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan CD19. Las indicaciones no relacionadas con cáncer asociadas con la expresión de CD19 incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, enfermedad autoinmune, (por ejemplo, lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y el trasplante.

[0304] Las células T modificadas con CAR de la presente invención se pueden administrar ya sea solas, o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes, tales como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones de células.

Cáncer hematológico

[0305] Las afecciones de cáncer hematológico son los tipos de cáncer, tales como leucemia y afecciones linfoproliferativas malignas que afectan a la sangre, la médula ósea y el sistema linfático.

[0306] La leucemia puede ser clasificada como leucemia aguda y leucemia crónica. La leucemia aguda puede clasificarse adicionalmente como leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia linfoide aguda (ALL). La leucemia crónica incluye la leucemia mielógena crónica (CML) y la leucemia linfoide crónica (CLL). Otras enfermedades relacionadas incluyen síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como "preleucemia"), que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y el riesgo de transformación a AML.

[0307] La presente descripción proporciona composiciones y procedimientos para tratar el cáncer. En un aspecto, el cáncer es un cáncer hematológico que incluye, pero no se limita a, cáncer hematológico, es una leucemia o un linfoma. En un aspecto, las células CART de la invención pueden usarse para tratar cánceres y tumores malignos tales como, pero no limitado a, por ejemplo, leucemias agudas incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, la leucemia linfoide aguda de células B ("BALL"), leucemia linfoide aguda de células T ("TALL"), leucemia linfoide aguda (ALL); una o más leucemias crónicas incluyendo, pero no limitado a, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); cánceres hematológicos adicionales o condiciones hematológicas, incluyendo, pero no limitado a, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom, y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides, y similares. Además una enfermedad asociada con la expresión de CD19 incluye, pero no limita a, por ejemplo, cánceres atípicos y/o no clásicos, tumores malignos, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan CD19.

[0308] La presente descripción también proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir una población de células que expresan CD19, comprendiendo los procedimientos poner en contacto una población de células que comprende una célula que expresa CD19 con una célula CART anti-CD19 de la invención que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto específico, la presente descripción proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD19, comprendiendo los procedimientos poner en contacto la población de células del cáncer que expresan CD19 con una célula CART anti-CD19 de la invención que se une a células que expresan CD19. En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para inhibir la proliferación o reducir la población de células cancerosas que expresan CD19, comprendiendo los procedimientos poner en contacto la población de células cancerosas que expresan CD19 con una célula CART anti-CD19 de la invención que se une a la célula que expresa CD19. En ciertos aspectos, la célula CART anti-CD19 de la invención reduce la cantidad, número, cantidad o porcentaje de células y/o células de cáncer en al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 65%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 95%, o al menos 99% en un sujeto con o modelo animal para la leucemia mielocida u otro cáncer asociado con células que expresan CD19 respecto a un control negativo. En un aspecto, el sujeto es un ser humano.

[0309] La presente descripción también proporciona procedimientos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con células que expresan CD19 (por ejemplo, un cáncer hematológico o cáncer atípico que expresa CD19), comprendiendo los procedimientos administrar a un sujeto en necesidad de una célula CART anti-CD19 de la invención que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, el sujeto es un ser humano. Ejemplos no limitantes de trastornos asociados con células que expresan CD19 incluyen trastornos autoinmunes (tales como lupus), trastornos inflamatorios (tales como alergias y asma) y cánceres (tales como

cánceres hematológicos o cánceres atípicos que expresan CD19).

[0310] La presente descripción también proporciona procedimientos para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad asociada con células que expresan CD19, comprendiendo los procedimientos administrar a un sujeto en necesidad de una célula CART anti-CD19 de la invención que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, el sujeto es un humano.

[0311] La presente descripción proporciona procedimientos para prevenir la recaída de cáncer asociado con células que expresan CD19, comprendiendo los procedimientos administrar a un sujeto en necesidad de la misma una célula CART anti-CD19 de la invención que se une a la célula que expresa CD19. En un aspecto, los procedimientos comprenden administrar al sujeto en necesidad de la misma una cantidad eficaz de una célula CART anti-CD19 descrita en el presente documento que se une a la célula que expresa CD19 en combinación con una cantidad eficaz de otra terapia.

Terapias de combinación

[0312] Una célula que expresa CAR descrito en el presente documento puede usarse en combinación con otros agentes y terapias conocidos. Administrado "en combinación", como se usa en el presente documento, significa que dos (o más) diferentes tratamientos se aplican al sujeto durante el transcurso de la afección del sujeto con el trastorno, por ejemplo, los dos o más tratamientos se aplican después de que el sujeto ha sido diagnosticado con el trastorno y antes de que el trastorno se haya curado o eliminado o el tratamiento haya cesado por otras razones. En algunas realizaciones, la aplicación de un tratamiento aún tiene lugar cuando empieza la aplicación del segundo, de modo que hay una superposición en términos de administración. Esto a veces se denomina aquí como "simultáneo" o "aplicación o liberación concurrente". En otras realizaciones, la aplicación de un tratamiento termina antes de que comience la aplicación del otro tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los casos, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor medida, que la que se observaría si el segundo tratamiento se administra en ausencia del primer tratamiento, o se observa una situación análoga con el primer tratamiento. En algunas realizaciones, la aplicación es tal que la reducción de un síntoma, o de otro parámetro relacionado con el trastorno, es mayor que la que se observa con un solo tratamiento administrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, en su totalidad aditivo, o mayor que aditivo. La aplicación puede ser tal que un efecto del primer tratamiento aplicado es todavía detectable cuando se aplica el segundo.

[0313] Una célula que expresa CAR descrito en el presente documento y el al menos un agente terapéutico adicional se pueden administrar simultáneamente, en la misma o en composiciones separadas, o secuencialmente. Para la administración secuencial, la célula que expresa CAR descrito en el presente documento se puede administrar primero y el agente adicional se puede administrar segundo, o puede invertirse el orden de administración.

[0314] En aspectos adicionales, una célula que expresa CAR descrito en el presente documento puede usarse en un régimen de tratamiento en combinación con cirugía, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato, y FK506, anticuerpos, u otros agentes inmunoblivos, tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas, y la irradiación, vacuna de péptido, tal como la descrita en Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108: 963-971.

[0315] En un ejemplo, una célula que expresa CAR descrito en el presente documento puede usarse en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos de ejemplo incluyen una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina (por ejemplo, doxorubicina liposomal)), un alcaloide de vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina), un agente alquilante (por ejemplo, ciclofosfamida, decarbazina, melfalán, ifosfamida, temozolomida), un anticuerpo de células inmunitarias (por ejemplo, alemtuzamab, gemtuzumab, rituximab, tositumomab), un antimetabolito (incluyendo, por ejemplo, antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa (por ejemplo, fludarabina)), un inhibidor de mTOR, un agonista de la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides de TNFR (GITR), un inhibidor de proteasomas (por ejemplo, aclacinomicina A, gliotoxina o bortezomib), un inmunomodulador, tal como talidomida o un derivado de la talidomida (por ejemplo, lenalidomida).

[0316] Los agentes quimioterapéuticos general considerados para su uso en terapias de combinación incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfan (Myleran®), inyección busulfán (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonilo-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucilo (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytosan® o Neosar®), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar-U®), citarabina liposoma inyección (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (actinomicina D, Cosmegen), clorhidrato de daunorubicina (Cerubidine®), la inyección de liposomas de citrato de daunorubicina (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), hidrocloreuro de doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (VePesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Acrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitibine,

gemcitabina (difluorodeoxicidina), hidroxurea (Hydrea®), idarrubicina (Idamycin®), ifosfamida (Ifex®), irinotecan (Camptosar®), L-asparaginasa (Elspar®), calcio leucovorina, melfalán (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), Mylotarg, paclitaxel (Taxol®), Phoenix (itrio90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosan 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), hidrocloreto de topotecan para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), y vinorelbina (Navelbine®).

[0317] Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen, sin limitación, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo (aminouracilo Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethylodopan®, Desmethylodopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, mostaza nitrogenada de uracilo®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), clormetina (Mustargen®), ciclofosfamida (Cytosan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ifosfamida (Mitoxana®), melfalán (Alkeran®), clorambucilo (Leukeran®), pipobromán (Amedel®, Vercyte®), trietilenmelamina (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), Trietilenfosforamina, temozolomida (Temodar®), tiotepa (Thioplex®), busulfan (Busilvex®, Myleran®), carmustina (BiCNU®), lomustina (CeeNU®), estreptozocina (Zanosar®) y dacarbazina (DTIC-Dome®). Agentes de alquilación de ejemplo adicionales incluyen, sin limitación, el oxaliplatino (Eloxatin); Temozolomida (Temodar® y Temodal®); Dactinomicina (también conocido como actinomycin-D, Cosmegen®); Melfalán (también conocido como L-PAM, L-sarcolisina, y mostaza de fenilalanina, Alkeran®); Altretamina (también conocido como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); La carmustina (BiCNU®); Bendamustina (Treanda®); Busulfan (Busulfex® y Myleran®); Carboplatino (Paraplatin®); Lomustina (también conocido como CCNU, CeeNU®); El cisplatino (también conocido como CDDP, Platino® y Platino®-AQ); Clorambucilo (Leukeran®); Ciclofosfamida (Cytosan® y Neosar®); Dacarbazina (también conocido como DTIC, DIC y carboxamida imidazol, DTIC-Dome®); Altretamina (también conocido como hexametilmelamina (HMM), Hexalen®); Ifosfamida (Ifex®); Prednumustine; Procarbazina (Matulane®); Mecloretamina (también conocido como mostaza de nitrógeno, mustina e hidrocloreto de mecloretamina, Mustargen®); Estreptozocina (Zanosar®); Tiotepa (también conocido como thiophosphamide, TESPAs y TSPA, Thioplex®); La ciclofosfamida (Endoxan®, Cytosan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); y bendamustina HCl (Treanda®).

[0318] Los inhibidores de mTOR de ejemplo incluyen, por ejemplo, temsirolimus; ridaforolimus (formalmente conocido como deferolimus, dimetilfosfinato de (1R, 2R, 4S)-4-[(2R)-2-[(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo [30.3.1.0⁴.9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la publicación PCT No. WO 03/064383); everolimus (Afinitor® o RAD001); rapamicina (AY22989, Sirolimus®); simapimod (CAS 164301-51-3); emsirolimus, (5-{2,4-bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido [2,3-d] pirimidin-7-il]-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[trans-4-(2-hidroxiatoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-d] pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y N²-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopirano-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartil-serina, sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1) y XL765.

[0319] Los inmunomoduladores de ejemplo incluyen, por ejemplo, afutuzumab (disponible de Roche®); pegfilgrastim (Neulasta®); lenalidomida (CC-5013, Revlimid®); talidomida (Thalomid®), actimid (CC4047); y IRX-2 (mezcla de citoquinas humanas, incluyendo la interleucina 1, interleucina 2 e interferón γ, CAS 951209-71-5, disponible de IRX Therapeutics).

[0320] Las antraciclinas de ejemplo incluyen, por ejemplo, doxorubicina (Adriamycin® y Rubex®); bleomicina (lenoxane®); daunorubicina (clorhidrato de dauorubicina, daunomicina y clorhidrato de rubidomicina, Cerubidine®); daunorubicina liposomal (liposomas de citrato de daunorubicina, DaunoXome®); mitoxantrona (DHAD, Novantrone®); epirubicina (Ellence™); idarrubicina (Idamycin®, Idamycin PFS®); mitomicina C (Mutamycin®); geldanamycin; herbimicina; ravidomicina; y desacetilravidomicina.

[0321] Los alcaloides de vinca de ejemplo incluyen, por ejemplo, tartrato de vinorelbina (Navelbine®), vincristina (Oncovin®), y vindesina (Eldisine®); vinblastina (también conocido como sulfato de vinblastina, vincalécoblastina y VLB, Alkaban-AQ® y Velban®); y vinorelbina (Navelbine®).

[0322] Los inhibidores de proteosomas de ejemplo incluyen bortezomib (Velcade®); carfilzomib (PX-171-007, (S)-4-metil-N-((S)-1-(((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il)-1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinoacetamido)-4-fenilbutanamido)pentanamida); marizomib (NPI-0052); citrato de ixazomib (MLN-9708); delanzomib (CEP-18770); y O-metil-N-[(2-metil-5-tiazolil) carbonil]-L-seril-O-metil-N-[(1S)-2-[(2R)-2-metil-2-oxiranilo]-2-oxo-1-(fenilmetil)etil]-L-serinamida (ONX-0912).

[0323] Los agonistas de G1TR de ejemplo incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión G1TR y anticuerpos anti-G1TR (por ejemplo, anticuerpos bivalentes anti-G1TR) tales como, por ejemplo, una proteína de fusión G1TR describe en la Patente de Estados Unidos No.: 6.111.090, la Patente Europea No.: 090505B1, Patente de Estados Unidos No.: 8.586.023, la publicación PCT Nos.: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-G1TR describe, por ejemplo, en la patente US No.: 7.025.962, la Patente Europea No.: 1947183B1, Patente de Estados Unidos No.: 7.812.135, Patente de Estados Unidos No.: 8.388.967, Patente de Estados Unidos No.: 8.591.886, la Patente

Europea No.: EP 1.866.339, la publicación PCT No.: WO 2011/028683, la publicación PCT No.: WO 2013/039954, la publicación PCT No.: WO2005/007190, PCT Publication No.: WO 2007/133822, la publicación PCT No.: WO2005/055808, la publicación PCT No.: WO 99/40196, publicación PCT No.: WO 2001/03720, la publicación de PCT No.: WO99/20758, la publicación PCT No.: WO2006/083289, PCT Publication No.: WO 2005/115451, patente de Estados Unidos No.: 7.618.632, y la publicación PCT No.: WO 2011/051726.

[0324] En un ejemplo, una célula que expresa CAR descrito en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un inhibidor de mTOR, por ejemplo, un inhibidor de mTOR descrito en el presente documento, por ejemplo, un rapálogo, tal como everolimus. En un ejemplo, el inhibidor de mTOR se administra antes de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el inhibidor de mTOR puede ser administrado antes de la aféresis de las células. En un ejemplo, el sujeto tiene CLL.

[0325] En un ejemplo, una célula que expresa CAR descrita en el presente documento se administra a un sujeto en combinación con un agonista de G1TR, por ejemplo, un agonista de G1TR descrito en el presente documento. En un ejemplo, el agonista de G1TR se administra antes de la célula que expresa CAR. Por ejemplo, en un ejemplo, el agonista de G1TR se puede administrar antes de la aféresis de las células. En un ejemplo, el sujeto tiene CLL.

[0326] Los fármacos que inhiben o bien la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al, Cell 66: 807-815, 1991; Henderson et al, Immun., 73: 316-321, 1991; Bierer et al, Curr Opin Immun 5:..... 763-773, 1993) pueden también ser utilizado. En un aspecto adicional, las composiciones celulares de la presente invención se pueden administrar a un paciente en combinación con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después), la terapia ablativa de células T usando agentes de quimioterapia tales como, fludarabina, la radiación trasplante de médula ósea de haz externo terapia (XRT), ciclofosfamida, y/o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En un aspecto, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de la terapia ablativa de células B tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con quimioterapia de alta dosis seguida de sangre periférica trasplante de células madre. En ciertas realizaciones, tras el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunes expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

[0327] En una realización, el sujeto se puede administrar un agente que reduce o mejora un efecto secundario asociado con la administración de una célula que expresa CAR. Los efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa CAR incluyen, pero no se limitan a CRS, y linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), también denominado síndrome de activación de macrófagos (MAS). Los síntomas de la CRS incluyen fiebre alta, náuseas, hipotensión transitoria, hipoxia, y similares. En consecuencia, los procedimientos descritos en el presente documento pueden comprender la administración de una célula que expresa CAR describe en el presente documento a un sujeto y la administración además un agente para controlar los niveles elevados de un factor soluble que resulta del tratamiento con una célula que expresa CAR. En una realización, el factor soluble elevado en el sujeto es uno o más de IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-6. Por lo tanto, un agente administrado para el tratamiento de este efecto secundario puede ser un agente que neutraliza uno o más de estos factores solubles. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a un esteroide, un inhibidor de TNF, y un inhibidor de IL-6. Un ejemplo de un inhibidor de TNF es entanercept. Un ejemplo de un inhibidor de IL-6 es tocilizumab (toc).

[0328] En una realización, el sujeto se puede administrar un agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR. Por ejemplo, en una realización, el agente puede ser un agente que inhibe una molécula inhibidora. Moléculas inhibidoras, por ejemplo, muerte programada de 1 (PD1), pueden, en algunas realizaciones, disminuir la capacidad de una célula que expresa CAR de montar una respuesta efectora inmune. Ejemplos de moléculas inhibidoras incluyen PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y TGFR beta. La inhibición de una molécula inhibidora, por ejemplo, por la inhibición a nivel de ADN, ARN o proteína, puede optimizar un rendimiento de la célula que expresa CAR. En realizaciones, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un ácido nucleico inhibidor, por ejemplo, un dsRNA, por ejemplo, un siARN o shRNA, se puede utilizar para inhibir la expresión de una molécula inhibidora en la célula que expresa CAR. En una realización, el inhibidor es un shRNA. En una realización, la molécula inhibidora es inhibida dentro de una célula que expresa CAR. En estas realizaciones, una molécula de dsRNA que inhibe la expresión de la molécula inhibidora está vinculada con el ácido nucleico que codifica un componente, por ejemplo, todos los componentes, de el CAR. En una realización, el inhibidor de una señal inhibidora puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a una molécula inhibidora. Por ejemplo, el agente puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a PD1, PD-L1, PD-L2 o CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab (también referido como MDX-010 y MDX-101, y comercializado como Yervoy®; Bristol -Myers Squibb;.. tremelimumab (anticuerpo monoclonal IgG2 disponible de Pfizer, anteriormente conocido como ticilimumab, CP-675206)) En una realización, el agente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a TIM3 En una realización, el agente es un. anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a LAG3.

[0329] PD1 es un miembro de inhibidor de la familia CD28 de receptores, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS, y BTLA. PD1 se expresa en células B activadas, células T y células mieloides (Agata et al 1996 Int Immunol. 8: 765-

75). Dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 se han demostrado para regular a la baja la activación de células T tras la unión a PD1 (Freeman et al 2000 J Exp Med 192: 1027-1034; Latchman et al 2001 Nat Immunol 2: 261-8; Carter et al 2002 Eur J Immunol 32: 634-43). PD-L1 es abundante en cánceres humanos (Dong et al 2003 J Mol Med 81: 281-7; Blank et al 2005 Cancer Immunol Immunother 54: 307-314; Konishi et al 2004 Clin Cancer Res 10: 5094.). La supresión inmune puede ser revertida mediante la inhibición de la interacción local de PD1 con PD-L1. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y otros inhibidores de PD1, PD-L1 y PD-L2 están disponibles en la técnica y pueden ser utilizados combinación con un CD19 CAR descrito en el presente documento. Por ejemplo, nivolumab (también referido como BMS-936558 o MDX1106; Bristol-Myers Squibb) es un anticuerpo IgG4 monoclonal totalmente humano que expresamente bloquea PD1. Nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD1 se describen en US 8.008.449 y WO2006/121168. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a PD1. Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD1 humanizados se describen en WO2009/101611. Lambrolizumab (también referido como MK03475; Merck) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD1. Lambrolizumab y otros anticuerpos anti-PD1 humanizados se describen en US 8.354.509 y WO2009/114335. MDPL3280A (Genentech/Roche) es un Fc humano optimizado anticuerpo monoclonal IgG1 que se une a PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos para PD-L1 se describen en la Patente de Estados Unidos No.: 7.943.743 y la Publicación de Estados Unidos No.: 20120039906. Otros agentes de unión anti-PD-L1 incluyen YW243.55.S70 (se muestran regiones variables de cadena pesada y ligera en la SEQ ID NOs 20 y 21 en WO2010/077634) y MDX-1 105 (también referido como BMS-936559, y, por ejemplo, agentes de unión anti-PD-L1 dan a conocer en el documento WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIG; Amplimmune; por ejemplo, se describe en WO2010/027827 y WO2011/066342), es una fusión del receptor soluble PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD1 y B7-H1. Otros anticuerpos anti-PD1 incluyen AMP 514 (Amplimmune), entre otros, por ejemplo, anticuerpos anti-PD1 descritos en US 8609089, US 2010028330, y/o US 20120114649.

[0330] En algunas realizaciones, el agente que potencia la actividad de una célula que expresa CAR puede ser, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, en el que el primer dominio es una molécula inhibidora, o fragmento del mismo, y el segundo dominio es un polipéptido que se asocia con una señal positiva, por ejemplo, un polipéptido comprising un dominio de señalización antracelular como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el polipéptido que se asocia con una señal positiva puede incluir un dominio coestimulador de CD28, CD27, ICOS, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular de CD28, CD27 y/o ICOS, y/o un dominio primario de señalización, por ejemplo, de CD3 zeta, por ejemplo, se describe en el presente documento. En una realización, la proteína de fusión se expresa por la misma célula que expresa el CAR. En otra realización, la proteína de fusión se expresa por una célula, por ejemplo, una célula T que no expresa un anticuerpo anti-CD19 CAR.

[0331] En una realización, el agente que mejora la actividad de una célula que expresa CAR descrita en el presente documento es miR-17-92.

Composiciones farmacéuticas y tratamientos

[0332] Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden comprender una célula que expresa CAR, por ejemplo, una pluralidad de células que expresan CAR, tal como se describen en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable vehículos, diluyentes o excipientes. Tales composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención son, en un aspecto formulado para administración intravenosa.

[0333] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de una manera apropiada a la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración serán determinadas por factores, tales como la condición del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque se pueden determinar las dosis apropiadas mediante ensayos clínicos.

[0334] En una realización, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de, por ejemplo, no hay niveles detectables de un contaminante, por ejemplo, seleccionados del grupo que consiste en endotoxina, micoplasma, la replicación lentivirus competente (RCL), p24, VSV-G ácido nucleico, gag de VIH, micropartículas recubiertas anti-CD3/anti-CD28 residuales, anticuerpos de ratón, suero humano agrupado, albúmina de suero bovino, suero bovino, los componentes de medios de cultivo, células de empaquetamiento de vectores o componentes de plásmido, una bacteria y un hongo. En una realización, la bacteria es al menos uno seleccionado del grupo que consiste de *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* grupo A.

[0335] Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz anti-tumor", "una cantidad eficaz inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede ser determinado por un médico con la consideración de las diferencias individuales en

edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y estado del paciente (sujeto). Por lo general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células T descritos en el presente documento se puede administrar a una dosis de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, en algunos casos 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todo número entero valores dentro de esos rangos. Composiciones de células T también se pueden administrar varias veces en estas dosis. Las células se pueden administrar mediante el uso de técnicas de infusión que se conocen comúnmente en la inmunoterapia (ver, por ejemplo, Rosenberg et al, New Eng J. of Med 319: 1676, 1988).

[0336] En ciertos aspectos, puede ser deseable administrar las células T activadas a un sujeto y, posteriormente, volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar las células T de las mismas de acuerdo con la presente invención, y reinfundir al paciente con estas células T activadas y expandidas. Este proceso puede llevarse a cabo varias veces cada pocas semanas. En ciertos aspectos, las células T pueden ser activadas a partir de extracciones de sangre de desde 10 cc a 400 cc. En ciertos aspectos, las células T se activan desde extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc o 100 cc.

[0337] La administración de las presentes composiciones se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un arterialmente trans paciente, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por (iv) la inyección intravenosa, o intraperitoneal. En un aspecto, las composiciones de células T de la presente invención se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En un aspecto, las composiciones de células T de la presente invención se administran por inyección iv. Las composiciones de células T pueden ser inyectadas directamente en un tumor, nódulo linfático o sitio de la infección.

[0338] En un aspecto particular, a modo de ejemplo, los sujetos pueden someterse a leucoféresis, en el que los leucocitos se recogen, enriquecido, o agotan ex vivo para seleccionar y/o aislar las células de interés, por ejemplo, las células T. Estos aislados de células T pueden expandirse mediante procedimientos conocidos en la técnica y se tratan de tal manera que una o más construcciones CAR de la invención pueden ser introducidos, creando de este modo una célula CAR T de la invención. Los sujetos en necesidad con las mismas pueden someterse posteriormente tratamiento estándar con quimioterapia de alta dosis seguida de sangre periférica trasplante de células madre. En ciertos aspectos, siguientes o concurrentes con el trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células CAR T expandidas de la presente invención. En un aspecto adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

[0339] La dosificación de los tratamientos anteriores para ser administrada a un paciente variará con la naturaleza precisa de la condición a tratar y el receptor del tratamiento. El escalado de las dosificaciones para administración humana se puede realizar de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, generalmente estará en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, generalmente administrados diariamente durante un periodo entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 10 mg por día, aunque en algunos casos las dosis más grandes de hasta 40 mg por día puede ser utilizado (describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.120.766).

[0340] En una realización, el CAR se introduce en las células T, por ejemplo, utilizando la transcripción in vitro, y el sujeto (por ejemplo, humano) recibe una administración inicial de células CAR T de la invención, y uno o más posteriores administraciones de las células CAR T de la invención, en el que las una o más administraciones posteriores se administran menos de 15 días, por ejemplo, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 días después de la administración anterior. En una realización, más de una administración de las células CAR T de la invención se administra al sujeto (por ejemplo, humano) por semana, por ejemplo, 2, 3, o 4 administraciones de las células CAR T de la invención se administran por semana. En una realización, el sujeto (por ejemplo, sujeto humano) recibe más de una administración de las células CAR T por semana (por ejemplo, 2, 3 o 4 administraciones por semana) (también denominado aquí como un ciclo), seguido de una semana de no CAR T administraciones células, y luego una o más administración adicional de las células T CAR (por ejemplo, más de una administración de las células T CAR por semana) se administra al sujeto. En otra realización, el sujeto (por ejemplo, sujeto humano) recibe más de un ciclo de las células T CAR, y el tiempo entre cada ciclo es inferior a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, o 3 días. En una realización, las células T CAR se administran cada dos días durante 3 administraciones por semana. En una realización, las células CAR T de la invención se administran durante al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más semanas.

[0341] En un aspecto, las CART de CD19 se generan utilizando vectores virales lentivirales, tales como lentivirus. Los CART generados de esta manera tendrán una expresión del CAR estable.

[0342] En un aspecto, los CART expresan transitoriamente vectores CAR durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días después de la transducción. La expresión transitoria de los CAR puede efectuarse mediante la liberación del vector de ARN de CAR. En un aspecto, el ARN CAR se transduce en la célula T mediante electroporación.

[0343] Un problema potencial que puede surgir en pacientes que están siendo tratados mediante células CART que se expresan transitoriamente (particularmente con scFv murinos que contienen CART) es la anafilaxia después de

múltiples tratamientos.

[0344] Sin desear quedar ligado por esta teoría, se cree que una respuesta tan anafiláctica podría ser causada por un paciente desarrolle respuesta anti-CAR humoral, es decir, los anticuerpos anti-CAR que tienen un isotipo anti-IgE. Se cree que las células productoras de anticuerpos de un paciente se someten a un cambio de clase de isotipo IgG (que no causa anafilaxia) a isotipo IgE cuando hay una rotura de diez a catorce días en la exposición a antígeno.

[0345] Si un paciente tiene un alto riesgo de generar una respuesta de anticuerpos anti-CAR durante el curso de la terapia con CAR transitoria (tales como los generados por transducciones de ARN), las pausas de infusión de CART no deben durar más de diez a catorce días.

EJEMPLOS

[0346] La invención se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan para fines de ilustración solamente y no pretenden ser limitativos, a menos que se especifique lo contrario. De este modo, la invención de ninguna manera debería ser interpretada como limitada a los siguientes ejemplos. La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

[0347] Sin más descripción, se cree que un experto ordinario en la amteria puede, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, realizar y utilizar los compuestos de la presente invención y realizar los procedimientos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo señalan específicamente diversos aspectos de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes en modo alguno del resto de la descripción.

Ejemplo 1: Humanización de anticuerpo anti-CD19 murino

[0348] Se desea la humanización del anticuerpo CD19 murino para el entorno clínico, donde los residuos específicos de ratón pueden inducir un antígeno anti-ratón humano (HAMA) en pacientes que reciben tratamiento CART19, es decir, el tratamiento con las células T transducidas con la construcción CAR19. Secuencias de VH y VL del anticuerpo CD19 murino hibridoma derivado se extrajeron de la literatura publicada (Nicholson et al, 1997, supra). La humanización se llevó a cabo mediante el injerto de las regiones de CDR de anticuerpo CD19 murino en la línea germinal de los marcos aceptores VH4_4-59 humana y (base de datos VBASE) VK3_L25. Además de las regiones CDR, cinco restos del marco, es decir VH # 71, # 73, # 78 y VL # 71 # 87, que se piensa para apoyar la integridad estructural de las regiones CDR fueron retenidos de la secuencia murina. Además, los elementos J humanos JH4 y JK2 se utilizaron para la cadena pesada y ligera, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos resultantes del anticuerpo humanizado se designaron FMC63_VL_hz y FMC63_VH_hz1, respectivamente, y se muestran a continuación en la Tabla 1. La numeración de los residuos sigue Kabat (Kabat EA et al, 1991, supra). Para las definiciones de CDR, se usaron tanto Kabat así como Chothia et al, 1987 supra). Los residuos procedentes de CD19 de ratón se muestran en *negrita/cursiva*. Posiciones # 60/61/62 en caja indican el potencial sitio de modificación post-traducciona (PTF) en CDR H2, también denominado HCDR2.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de dominios variables de CD19 humanizados (SEQ ID NOS: 114-117, respectivamente, en orden de aparición).

Chothia CDR		CDR H1		CDR H2
Kabat CDR		CDR H1		CDR H2
Kabat #	1-27	28-35	36-51	52-62
FMC63 VH_hz1	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCTVSGVSL	LPDYQVS	WIRQPPGKGLEWIGVIW
FMC63 VH_hz2	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCTVSGVSL	LPDYQVS	WIRQPPGKGLEWIGVIW
FMC63 VH_hz3	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCTVSGVSL	LPDYQVS	WIRQPPGKGLEWIGVIW

Chothia CDR		CDR H3
Kabat CDR		CDR H3
Kabat #	63-68	69-75
FMC63 VH_hz1	RVTISKDN	SKNQVSLKLS
FMC63 VH_hz2	RVTISKDN	SKNQVSLKLS
FMC63 VH_hz3	RVTISKDN	SKNQVSLKLS

Chothia CDR		CDR L1		CDR L2
Kabat CDR		CDR L1		CDR L2
Kabat #	1-27	28-35	36-51	52-62
FMC63 VL_hz	EIVMTQSPATLSLSPGERATL	LS	SCRASQ	DISKYL

Chothia CDR		CDR L3
Kabat CDR		CDR L3
Kabat #	63-68	69-75
FMC63 VL_hz	GIPARFSGSGSDTYTLTI	SS

45

[0349] Estas IgG CD19 humanizadas se utilizaron para generar scFv solubles para la prueba de expresión y scFv para las construcciones completas de CART CD19 (ver ejemplos a continuación). De interés fue que durante la humanización, la posición 62 en la región CDRH2 prefiere ser un residuo de serina en lugar de la alanina presente en el murino CDRH2. La secuencia murina carece de una modificación post-traducciona (PTF), y tiene asparagina-serina-alanina en las posiciones 60/61/62, respectivamente, en CDRH2. Esto genera potencial motivos PTF (indicado como la caja citan en CDRH2) durante el curso de la humanización. Si el sitio PTF generada durante el proceso de humanización era en realidad un "verdadero" sitio de PTF o meramente una teórica fue probada. Se planteó la hipótesis de que la asparagina motivo de aminoácidos seguido por serina (NS) puede ser susceptible a la desamidación después de la traducción, pero no es algo que era fácilmente aparente. También se planteó la hipótesis de que la asparagina seguido de cualquier aminoácido excepto prolina y luego seguido por serina (NxS, x ≠ P) pueden ser susceptibles a post-translacional N-glicosilación. Para probar esta hipótesis, dos variantes de IgG, se generaron en la que la asparagina en la posición 60 (conocido por ser un sitio de glicosilación) se mutó a serina o glutamina y designado FMC63_VH_hz2 (N60S) y FMC63_VH_hz2 (N60Q), respectivamente. Estas construcciones se generaron con el fin de eliminar el potencial sitio de modificación postraducciona (PTF) y la prueba para la actividad retenida (Véase el Ejemplo 2 a continuación).

Clonación:

[0350] Se obtuvieron secuencias de ADN que codifican los dominios VL y VH de ratón y humanizados y los codones para las construcciones fueron optimizados para la expresión en células de Homo sapiens.

[0351] Las secuencias que codifican VL y dominio VH se subclonaron a partir de los vectores de clonación en vectores adecuados para la secreción en células de mamífero expresión. Las cadenas pesada y ligera se clonaron en vectores de expresión individuales para permitir la co-transfección. Elementos del vector de expresión incluyen un promotor (citomegalovirus (CMV) potenciador-promotor), una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y el terminador de la transcripción (hormona de crecimiento bovina (BGH) de genes), una replicación episomal elemento que permita y la replicación en procariontes (por ejemplo, origen SV40 y ColE1 o otros conocidos en la técnica) y elementos para permitir la selección (gen de resistencia a ampicilina y el marcador de zeocina).

Expresión:

[0352] Se expresaron candidatos de IgG quiméricos y humanizados en células de mamífero HEK293F a escala de 1 ml. Sobrenadantes clarificados se utilizaron para estudios de unión FACS. Más precisamente, se diluyeron las células HEK293F a 5E5 células/ml en medio de FreeStyle complementado con Pen/Strep y 1 ml transferidos en 24 ronda placa de pocillos profundos inferior. 0,5 g de la luz y 0,5 g de la cadena pesada de plásmidos de expresión de mamífero se diluyeron en el mismo medio junto con 4 ul de FuGENE HD (Roche REF 04709705001). Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió la mezcla de ADN/Fugene gota a gota a las células y se coloca en una incubadora de CO₂ 5% a 250 rpm, 37°C durante cinco días. El sobrenadante se separó a continuación de las células por centrifugación. Para medir el contenido de IgG, partes alícuotas de 200 ul se colocaron en los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos. Todas las muestras y los patrones se miden por duplicado utilizando la proteína A de inmersión y lectura biosensores (Fortebio Cat No 18-5010). La placa se colocó en un instrumento Octeto (Fortebio) y se dejó equilibrar a 27°C en la cámara de termostatazido. Los datos se procesaron automáticamente usando la versión de software del usuario Octeto 3,0 y la concentración determinada por comparación con una curva estándar de IgG.

Análisis de unión mediante FACS:

[0353] Los anticuerpos humanizados y quimeras fueron evaluados con una citometría de flujo ensayo de unión utilizando la línea de células 300.19-hsCD19FL. Esta línea celular se generó por transfección de la línea celular de ratón preB 300.19 con un vector (hCD19 FL/pEF4-myc-His A) que codifica la longitud completa CD 19 secuencia de codificación humana y el promotor natural, así como un gen de resistencia a zeocina. En breve, 300.19 células se electroporaron con el plásmido linealizado y luego las células que expresan altos niveles de hsCD19 se identificaron utilizando un CD19 Ab (HIB19 clon de BD 555415) anti-humano conjugado con APC y posteriormente ordenados usando un FACS Aria citómetro de flujo. Las células hsCD19 + según se cultivaron y se confirmó que expresaban de forma estable altos niveles de hsCD19.

[0354] El ensayo de unión se puede realizar directamente con el medio de cultivo libre de suero que contiene la IgG expresada. Todas las IgG evaluados se normalizaron con la misma concentración (85 nm), antes de ser diluido por una dilución en serie 3 veces hasta 13:04. Luego, en una placa de 96 pocillos, alícuotas de 5x10⁵ células/pocillo se incubaron durante 30 min a 4°C con IgG diluidas. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS (0,5% de BSA en PBS) antes de la adición del anticuerpo de detección, un APC conjugado de cabra anti-hu IgG, Fc fragmento específico (Dianova # 109-136-098), diluido 1: 1000 en tampón FACS. Las células se incubaron otros 30 min a 4°C, luego se lavaron dos veces en tampón FACS y se analizaron utilizando FACS Calibur (BD Bioscience). Las curvas de unión de trazado (mediana de intensidad de fluorescencia frente a la concentración de IgG) y CE₅₀ determinación se realizaron con el software GraphPad PRISMTF 3,0 con análisis de regresión no lineal, dosis-respuesta sigmoidal

(pendiente variable).

[0355] El análisis por FACS muestra que la unión aparente para todas las IgG evaluados puede variar ampliamente, con algunas construcciones que muestran un cambio de pliegue de 5 a 10 en EC50 como una IgG frente a un scFv. En base a los valores de CE₅₀, se eligen los candidatos líderes que tienen una afinidad de unión dentro de un factor de 2 o mejor en comparación con la referencia quimérica.

Ejemplo 2: Caracterización de fragmentos scFv solubles anti-CD19 derivados de anticuerpos IgG de CD19 humanizados

[0356] Se generaron fragmentos de scFv solubles a partir de las IgG CD19 humanizadas descritas en el Ejemplo 1 utilizando técnicas de biología molécula estándar. Estos scFv solubles se utilizaron en los estudios de caracterización para examinar la estabilidad, la expresión de la superficie celular, y propiedades de unión de los scFv. Además, también se llevaron a cabo experimentos para investigar el impacto del PTF potencial introducido durante el proceso de humanización.

Expresión y purificación de scFv

[0357] Para la transfección de cada construcción de scFv, se transfectaron alrededor de 3E8 células 293F con 100 ug de plásmido utilizando PEI como el reactivo de transfección en una proporción de 3:1 (PEI: ADN). Las células fueron cultivadas en 100 ml de Medio de Expresión EXPi293 (Invitrogen) en un matraz agitador a 37°C, 125 rpm, 8% de CO₂. El cultivo se recogió después de seis días y se utilizó para la purificación de proteínas.

[0358] Las células 293F se recogieron por centrifugar a 3500 g durante 20 minutos. El sobrenadante se recogió y se filtró a través de la Unidad de filtro VacuCap90 PF (w/0.8/0.2µm de Super membrana, PALL). Alrededor de 400 ul de micropartículas de agarosa Ni-NTA (Qiagen) se añadieron al sobrenadante. La mezcla se hizo girar y se incubó durante 4 horas a 4°C. Se cargó en una columna de purificación y se lavó con tampón de lavado con 20 mM de histidina. La proteína se eluyó con 500? L de tampón de elución con 300 mM de histidina. Las muestras se dializaron frente a tampón PBS a 4°C durante la noche. Las muestras de proteína se cuantificaron utilizando 2000c NanoDrop.

Conformación de scFv y análisis de estabilidad coloidal

[0359] La termoestabilidad de los scFv se determinó mediante DSF: Mezcla de 10-20 µl de muestra de proteína con el colorante Sypro Orange (Invitrogen Cat # S6650) de una dilución final de 1:1000, en un volumen total de 25 ul en PBS, realizar BioRad CFX1000 (25°C durante 2 min, a continuación, incrementar 0,5°C durante 30 segundos, de 25 a 95°C).

[0360] Para el experimento SEC analítico, se inyectaron alrededor de 15-20 µg de muestra de proteína de scFv en 20 µl de PBS en TSKgel Super SW2000 a un caudal de 0,3 ml/min en Agilent serie 1100.

EC50 mediante la unión FACS

[0361] Ratones de línea celular 300.CD19 se cultivaron en RPMI 1640 con 0,5 mg/ml de Zeocin. Alrededor de las células 5E5/por pocillo se transfirieron a la placa de pocillos BD Falcon 96. Las células se giran hacia abajo a 900 rpm (Sorval Leyenda XT centrífuga) durante 3 minutos. El sobrenadante se eliminó. Muestras de proteínas Anti-CD19 scFv se diluyeron en DPBS con 5% de FBS. Las muestras se añadieron a los pocillos, se mezclaron bien con las células y se incubaron durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces en los DPBS con 5% de FBS. Las células se incubaron con antipoly Su PE (R & D) durante 1 hora, se lavaron dos veces antes del análisis FACS (LSRII de BD Biosciences).

Análisis cinético por Proteon

[0362] La cinética se determinó utilizando Bio-Rad Proteon. La inmovilización se realizó usando acoplamiento de amina estándar en un chip sensor GLC. Las muestras de scFv se diluyeron a 0,03 mg/ml en acetato de pH 4,5 y se aplican al chip a un caudal de 30 ul/min durante 300 segundos. El ligando de CD19 era entonces de serie diluido en PBS-Tween y se inyecta a un caudal de 50 ul/min durante 120 segundos con un tiempo de disociación de 480 segundos. La superficie del chip se regeneró con glicina pH 2,5. Datos se ajustaron mediante un modelo 1:1 de Langmuir.

Expresión en superficie de las construcciones de CART19 y tinción por FACS

[0363] Las células en suspensión HEK293F transfectadas transitoriamente con diferentes CART anti-hCD19 se recogieron 2 días después de la transfección. Alrededor de las células 1E6 se colocaron en cada pocillo de una placa de forma de V 96 (Greiner Bio-One, Alemania) y se lavó tres veces con 0,2 ml de tampón FACS (1X PBS que contienen 4% de albúmina de suero bovino (BSA) (BSA fracción V, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). las células se resuspendieron en 0,2 ml del tampón de FCAS, ya sea con 0,2 g de proteína biotinilada L (GenScript, Piscataway,

NJ) o 100 nM de hCD19 (AA 1-291) -hIgG1 Fc (generada en NIBRI) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. después, las células se lavaron con 0,2 ml de tampón FACS tres veces, y se incubaron con 1 l de estreptavidina Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Grand Island, NY) en 0,2 ml de tampón FACS para muestras con la proteína L, o 2 ul de PE Fc anti-humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) en 0,2 ml de tampón FACS para muestras con hCD19-hIgG1 Fc durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Después de lavar con 0,2 ml de tampón de FACS tres veces, se analizaron las células en un LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) utilizando la máquina FACSDiva Software (BD Biosciences, San Jose, CA). La tinción de inmunofluorescencia se analizó como el logaritmo de la fluorescencia relativa de las células vivas, y el porcentaje de las células positivas o PE Alexa Fluor 488 se midieron.

Análisis de PMT potenciales generados durante el proceso de humanización

[0364] De interés fue que durante la humanización, la posición 62 en la región CDRH2 prefiere ser un residuo de serina en lugar de la alanina presente en la CDRH2 murina como se describe en el Ejemplo 1. Se ensayó si el sitio PTF generado durante el proceso de humanización era en realidad un "verdadero" sitio de PTF o meramente teórica. Dos variantes de IgG se generaron en la que la asparagina en la posición 60 (conocida por ser un sitio de glicosilación) se mutó a serina o glutamina y se designaron FMC63_VH_hz2 (N60S) y FMC63_VH_hz2 (N60Q), respectivamente. Estas construcciones se generaron con el fin de eliminar el potencial sitio de modificación postraduccional (PTF) y analizar la actividad retenida.

Resultados

[0365] scFv anti-CD 19 humanizados y scFv de ratón se expresaron en células 293F y se purificaron por medio de etiqueta de His. La expresión y el rendimiento de todos los scFv humanizados fue mucho mayor que el scFv de ratón original (datos no mostrados).

[0366] Para confirmar la identidad y evaluar la integridad, las construcciones de scFV se analizan con o sin incubación con N-glicanasa F (PNGasa F) seguido por espectrometría de masas-cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC-MS) (Ver Figura 3) y SDS PAGE (datos no mostrados). PNGasaF es una enzima específica para la extracción de estructuras de glicanos unidos a N de la secuencia consenso NXS/T/C, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina. Brevemente, las muestras se diluyen en agua a 0,1 ug/ul y se dejaron sin tratar o se incubaron con PNGasaF en una relación 1:2 (p/p) PNGasaF:scFV durante 3 horas a 37°C.

[0367] El análisis SDS-PAGE se realiza usando un 4-12% de gel de Bis-Tris NuPAGE de Novex. Aproximadamente 2 µg de scFV se cargan en cada carril y la electroforesis se lleva a cabo a 200 V constante durante 40 minutos. Después de la electroforesis, el gel se tiñe usando tinción de PhastGel Blue R 250 (Amersham Pharmacia) y se destiñó con ácido acético al 10%, 30% de metanol.

[0368] El análisis por HPLC-MS se lleva a cabo en el sistema Acquity UPLC del agua acoplado a un espectrómetro de masas Xevo-ToF. Aproximadamente 1 g de cada muestra se carga en una R 1/10 2,1 x mm 10 m de columna 100 POROS (Applied Biosciences) ajustado a 60°C a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Las fases móviles se componen de 0,1% de ácido fórmico (A) y ácido fórmico al 0,1%, 75% de isopropanol, 25% de acetonitrilo (B). La proteína se eluyó de la columna con un gradiente de fase inversa de 25% -90% de B en 12 minutos. La adquisición se realiza utilizando exploración electrospray positivo en el rango de m/z de 600-4000 Da con una rampa de voltaje de cono fuente 20-50V. Los espectros resultantes se deconvolutados usando MaxEnt1.

[0369] El sitio de glicosilación se introdujo durante el proceso de humanización. La no PTF variantes (VH: N60S o N60Q) eran sin esta forma adicional. La construcción fue el único con un sitio de consenso de glicosilación ligada a N en HC CDR2. A partir del análisis SDS-PAGE, las muestras no tratadas migran como bandas individuales consistentes con los pesos moleculares aproximados de las secuencias para todos los constructos excepto 103101-WT (S/N) para los que se observa doblete. Esta construcción es el único con un sitio de consenso de glicosilación ligada a N en H-CDR2. Cuando se trata con PNGasaF, la banda de mayor peso molecular del doblete ya no está presente lo que sugiere la ocupación parcial del sitio. Del mismo modo, los pesos moleculares observados a partir de los espectros de masas deconvolutados son consistentes con los predichos a partir de las secuencias de aminoácidos. Sin embargo, mientras que las otras construcciones demostraron una única especie molecular primarios, 103101-WT (S/N) también tenía una población 1217 Daltons mayor que la predicha a partir de la secuencia que ya no está presente después del tratamiento con PNGasaF. Esto es consistente con la presencia de un único predominante glicofoma unida a N, probablemente oligomanosa 5 basado en la masa. La presencia de la forma glicosilada fue confirmada por el análisis de MS como se muestra en la figura. 3.

[0370] La estabilidad de la conformación se midió por barrido diferencial Fluorimetría (DSF). Como se muestra en la Fig. 4, la Tf de ratón scFv fue de 57°C, mientras que las variantes humanas mostraron una mayor Tf en alrededor de 70°C. La Tf para todo el scFv humanizado es mucho mejor que el scFv murino, mostrando claramente que todo el scFv humanizado son más estables que el scFv murino. Esta estabilidad probablemente se traducirá en la construcción CART19, probable que conduce a propiedades terapéuticas mejoradas.

[0371] La actividad de la scFv purificada fue medida mediante la unión a células de expresión hCD19, así como mediante la unión a antígeno hCD19 utilizando el procedimiento de detección basado SPR. Línea celular de ratón 300 se utilizó para determinar la unión de scFv. La CE₅₀ de ratón scFv para hCD19 fue de alrededor de 06 a 1,6 nM. Las variantes humanizadas mostraron CE₅₀ de la misma gama en la nM CE bajo o sub₅₀ s gama.

Ejemplo 3: Construcciones de CD19 CAR

[0372] Los ScFv que se utilizará en la construcción final de CAR se derivaron de la IgG humanizada descrita en el Ejemplo 1. El orden en que los dominios VL y VH aparecen en el scFv se varió (es decir, orientación VL-VH, o VH-VL), y donde tres o cuatro copias de la subunidad de "G4S" (SEQ ID NO: 18), en el que cada subunidad comprende la secuencia de GGGGS (SEQ ID NO: 18) (por ejemplo, (G4S)₃ (SEQ ID NO: 107) o (G4S)₄ (SEQ ID NO: 106)), conectan los dominios variables para crear la totalidad del dominio de scFv, tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Construcciones de scFv de CD19 humanizadas que muestran la orientación de VH y VL y la longitud del enlazador ("3G4S" se describe como SEQ ID NO: 107 y "4G4S" se describe como SEQ ID NO: 106)

ID de construcción	Longitud de aa	anotación	Cambio de Vh
mscFvCTL019	486	VL-VH, 3G4S	
104879	491	VL- VH, 4G4S	N/S
104880	491	VL-VH, 4G4S	N/Q
104881	491	VH-VL, 4G4S	N/S
104882	491	VH-VL, 4G4S	N/Q
104875	486	VL-VH, 3G4S	N/S
104876	486	VL-VH, 3G4S	N/Q
104877	486	VH-VL, 3G4S	N/S
104878	486	VH-VL, 3G4S	N/Q
105974	491	VL-VH, 4G4S	S/N
105975	491	VH-VL, 4G4S	S/N
105976	486	VL-VH, 3G4S	S/N
105977	486	VH-VL, 3G4S	S/N

[0373] Las secuencias de los fragmentos de scFv humanizados (SEQ ID NOS: 1-12) se proporcionan a continuación en la Tabla 3. Se generaron construcciones de CAR completas usando SEQ ID NOS: 1-12 con secuencias adicionales, SEQ ID NOS: 13-17, que se muestran a continuación, para generar construcciones de CAR completas con SEQ ID NOS: 31-42.

- líder (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 13)
MALPVTALLLPLALLLHAARP
- líder (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 54)

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACC

C

- bisagra CD8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 14)
TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
- bisagra CD8 (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 55)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTTCGCAGCCCCTG
TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTG
GACTTCGCCTGTGAT

- CD8 transmembrana (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 15)
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
- transmembrana (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 56)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCAC
CCTTACTGC

- dominio intracelular 4-1BB (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 16)
KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
- dominio intracelular 4-1BB (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 60)

5 AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGT
GAACTG

10 - dominio CD3 zeta (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 17)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGYQLSTATKDTYDALHMQUALPPR

15 - **CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 101)**

20 AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTC
TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA
25 TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC
CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

30 - dominio CD3 zeta (secuencia de aminoácido; NCBI Referencia de secuencia NM_000734.3) (SEQ ID NO: 43)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGYQLSTATKDTYDALHMQUALPPR

35 - **CD3 zeta (secuencia de ácido nucleico; NCBI secuencia de Referencia NM_000734.3); (SEQ ID NO: 44)**

40 AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
45 AGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
50 ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

55 - **Bisagra IgG4 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 102)**

60 ESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM

65 - **Bisagra IgG4 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 103)**

5

10 GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCA
 GCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGT
 GACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG
 GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACC
 15 TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC
 AAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCC
 20 AAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACC
 AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCTTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACA
 25 GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGG
 GCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAG
 CCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

30

[0374] Todos estos clones contenían un cambio residuo Q/K en el dominio de señal del dominio coestimulador derivado de 4-1BB.

Tabla 3: Construcciones de CD19 CAR humanizadas

35

Nombre	SEQ ID	Secuencia
CAR1		
Dominio scFv de CAR1	1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHT SRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPD YGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYYSLSKSRVTISKDNSKNQVSLKL <u>SSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGOGTLVTVSS</u>
103101 CAR1 ScFv-nt soluble	61	atggcctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggccccgaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaacctgtcttgacagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccatctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcaactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgcctacaccttggacagggaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaccgggtcttgtgaagccatcagaactcttccactgactgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgatttgggctctgagactacttactactcttcatccc tcaagtacgcgctcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgctgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactgggacagggactctggctcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat

ES 2 734 549 T3

<p>103101 CAR1 ScFv-aa soluble</p>	<p>73</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratls</u>scrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqg ntlpytfgqgkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpstsltctvs gvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyggsyamdywgqgtlvtvsshhhhhhhh</p>
<p>104875 CAR1 Completa- nt</p>	<p>85</p>	<p>atggccctccctgtcacogccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgc tcggcccgaaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggtg agcgcgaaccctgtcttgcagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcaactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttggatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggtctgagactacttactactcttcatccc tcaagtacgcgctcaccatctcaaggaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgctgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcc cagcctctgtccctcgctccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgca taccggggtcttgacttcgctcgcatatctacatttggcccctctggctgga cttgcggggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggagaa cagctctacaacgaactcaatcttggcggagagaggagtagcagctgctggaaa gaggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgagaaagaatccccaa aggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaaacgcagaagaggcaaggccacgagcggactgtaccaggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggccctgccgctc</p>
		<p>gg</p>
<p>104875 CAR1 Completa- aa</p>	<p>31</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqg <u>ntlpytfgqgk</u>leikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpstsltctvs gvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdsknqvslk lssvtaadtavyycakhyyggsyamdywgqgtlvtvssttpaprpptpaptias qplsrlrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr klllyifkqpfmrvpqtqqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgn qlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdmaeaysei gmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p>CAR2</p>		
<p>Dominio scFv de CAR2</p>	<p>2</p>	<p>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsg giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavycqqgntlpytfgqgkleikgggsg gggsgggsgvqlqesgpglvkpstsltctvsgvslpdygvswirppgkgle wigviwgsettyysslksrvtiskdsknqvslklssvtaadtavyycakhyy gsyamdywgqgtlvtvss</p>

ES 2 734 549 T3

<p>103102 CAR2 ScFv-nt soluble</p>	<p>62</p>	<p>atggccctccctgtcacgcctgctgcttccgctggetcttctgctccacgcgc tcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgcactcttagcctttcaccggg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagccggacaggtcctcgctctgatctaccacaccgctgct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcaactacagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcggaaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttctgactgtgagc ggagtgtctctccccgattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccc tcaagtcaagcgtcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggtactctgggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat</p>
<p>103102 CAR2 ScFv-aa soluble</p>	<p>74</p>	<p><u>MALPVTALLPLALLHAARP</u>eivmtqspatlsispgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvs gvslpdygvswirppgglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnknqvslk lssvtaadtavyycahyyyggsyamywgqgtlvtvsshhhhhhh</p>
<p>104876 CAR2 Completa- nt</p>	<p>86</p>	<p>atggccctccctgtcacgcctgctgcttccgctggetcttctgctccacgcgc tcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgcactcttagcctttcaccggg</p>

		<p>agcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacce tcaactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaaggg aacaccctgcctacacctttggacagggaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggaggaggaagccaggtccaactccaagaaa gcccaccgggtcttgtgaagccatcagaaaactctttcactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacgggggtcttggatcagacagccaccggggaaggg tctggaatggattggagtgatttggggctctgagactacttactaccaatcatccc tcaagtacgcgctcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacaggggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttgggccccctctggctggtgta cttgcggggctcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacia gcccagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt gggatgaaaggggaaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcccctc gg</p>
104876 CAR2 Completa- aa	32	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc<u>rasqdiskyl</u>nw yqqkpgqaprlliy<u>htsrllhs</u>giparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfc<u>ggg</u> <u>ntlpyt</u>fgqgkleikggggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsltctvs gvs<u>ldygv</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyyqsslks</u>rvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyyca<u>hyyyggsyamy</u>wgqgtlvtvssttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr klllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
CAR3		
Dominio scFv de CAR3	3	<p>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgset tyysssllksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyyca<u>hyyyggsyamy</u>wgq gtlvtvssggggsgggsgggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskyl</p>
		<p>nwyqqkpgqaprlliyhtsrllhsiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcq qgntlpytfgqgkleik</p>

ES 2 734 549 T3

<p>103104 CAR3 ScFv-nt soluble</p>	<p>63</p>	<p>atggctctgcccgtagaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccg tgcgccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccaggaactctggctcactgtgtcatctggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgtggagggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccgggaacgggtacccttcttctgctgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttctacc acacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgcttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgacctctcatctctccagcccaggacttcgccgtctactt ctgccagcaggtaaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac</p>
<p>103104 CAR3 ScFv-aa soluble</p>	<p>75</p>	<p><u>MALPVTALLPLALLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdsknqvsllkssvtaada vyycahyyyggsyamydwgqtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratlscrasdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfsgsgg tdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkcleik<hhhhhhh< h=""></hhhhhhh<></p>
<p>104877 CAR3 Completa- nt</p>	<p>87</p>	<p>atggctctgcccgtagaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccg tgcgccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaaagggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccaggaactctggctcactgtgtcatctggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgtggagggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccgggaacgggtacccttcttctgctgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggcccctaggcttcttctacc acacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgcttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgacctctcatctctccagcccaggacttcgccgtctactt ctgccagcaggtaaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgcccggaccatgcctct cagccgctttccctgctccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgca</p>
		<p>taccggggtcttgacttcgctcgcgatctacatttgggcccctctgctggtga cttgcggggtcctgctgcttactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactca agaggagacggctgtcatgccggttcccagaggaggaggaggcggctgcgaac tgcgcgtgaaatcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgactgtggtgcaa gaggagaggacgggaccagaaatgggagggaagccgcagaaagaatccccaa agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaaggccacgacggactgtaccaggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggccctgccgcctc gg</p>

<p>104877 CAR3 Completa- aa</p>	<p>33</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyysssllksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyyca<hyhygygsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls< h=""> lspgeratls<crasqdiskyl< cr="">nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfcqgntlpytfgqgkcleiktttpaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr kklliyifkqpfmrpvqttqeedgcsrffpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqgn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeaysei gmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</crasqdiskyl<></hyhygygsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls<></p>
<p>CAR4</p>		
<p>Dominio scFv de CAR4</p>	<p>4</p>	<p>qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgset tyyqssllksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyycahyhygygsyamdywgq gtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcq qgntlpytfgqgkcleik</p>
<p>103106 CAR4 ScFv soluble - nt</p>	<p>64</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtcacgctcaagaatcaggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccggtgagcggagtgccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaccacttactatcaatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgacctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg ggccaggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggaggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccggggaacgggctaccctttctgtcgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagcgggacaggcccctaggcttcttatctacc acacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgcttagcgggtctggaagcggg</p>
		<p>accgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggacttcgcccgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgcccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac</p>
<p>103106 CAR4 ScFv soluble - aa</p>	<p>76</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqssllksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyycahyhygygsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatls lspgeratls crasqdiskyl nwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfcqgntlpytfgqgkcleik<hhhhhhh< h=""></hhhhhhh<></p>

<p>104878 CAR4 Completa- nt</p>	<p>88</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgcaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcggagtgatttggggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtacaggggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggaggggtcctacgccatggactactg gggccagggaaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggaggtggctccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccgggaacgggctaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccctaggcttcttctacc acacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgcttttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgaccatctcatctctccagcccagggacttgcgcgtctactt ctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagggcaccaagcttgaga tcaaaccactactcccgtccaagggccaccaccctgccccgaccatcgctct cagccgctttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcgtgca taccgggggtcttgacttgcctgcatatctacatttggggcccctctggctggtg cttgccgggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcg agaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgccgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagtacgacgtgctggacaa gcccagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcagaaagaatccccag aggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctc gg</p>
<p>104878 CAR4 Completa- aa</p>	<p>34</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpsetlslctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdsknqvsklssvtaadta vyyca<hyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatl< h=""> lspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrllhs</hyyyggsyamdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseivmtqspatl<></p>
<p>giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqggntlpytfgggtkleiktppaprptpaptias qpplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr klllyifkqpfmrvpvtqteedgcscrffpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynelqkdkmaeysei qmkgerrrqkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>		
<p>CAR5</p>		
<p>Dominio scFv de CAR5</p>	<p>5</p>	<p>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrllhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqggntlpytfgggtkleikgggs gggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlslctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyysslksrvtiskdsknqvsklssvtaadtavyyca hyyyggsyamdywgqgtlvtvss</p>

ES 2 734 549 T3

<p>99789 CAR5 scFv soluble - nt</p>	<p>65</p>	<p>atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccocggcg agagggcaaccctttcatgacaggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccaggccaggtcctcgcctgctgatctaccacaccagccgct ccacagcggatccccgccagatttccgggagcgggtctggaaccgactacacce tcaccatctcttctctgcagcccaggatttcgccgtctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtcaaggtaccaagctggaaatcaagggaggcgg aggatcaggcgggtggcgaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctg acttgtaccgtgtccgggtgtgagcctcccgactacggagtctcttgattcgcca gcctccggggaagggctcttgaatggattgggggtgattggggatcagagactact actactcttcatcacttaagtacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgccgctgacaccgccgtgactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac</p>
<p>99789 CAR5 scFv soluble - aa</p>	<p>77</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLHAARP</u>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselssl tctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyssslksrvtiskdskn qvs1klssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss<u>hhhhhhh</u></p>
<p>104879 CAR5 completa - nt</p>	<p>89</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgcagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacce tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg</p>

		<p>aacaccctgcctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggaggaggaagcggcggaggcgggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagaca gccaccgggaagggtctggaatggattggagtgatttggggctctgagactactt actactcttcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgtaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccaccaccccggct cctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tggggggcggcgtgcatacccggggctctgacttcgcctgcgatctctacatttggg cccctctggctggtacttgcggggctctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgtaagcgcggcgggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaaactcaatcttggcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatcccgaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg</p>
104879 CAR5 completa - aa	35	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlliyhtsrlhs<u>giparfsgsgsgtdytl</u>tisslqpedfavyfc<u>qgg</u> <u>ntlpyt</u>fgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselssl tctvsgvslp<u>dygvs</u>wirppgkglewig<u>viwgsettyysss</u>lksrvtiskdskn qvsllkssvtaadtavyycak<u>hyyyggsyamdy</u>wgqgglvtvsssttpprptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapay kqqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
CAR6		
Dominio scFv de CAR6	6	<p>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikgggsg gggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselsslctvsgvslpdygvswirpp gkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdsknqvsllkssvtaadtavyycak hyyyggsyamdywgqgglvtvss</p>
99790 CAR6 scFv soluble -nt	66	<p>atggccctcccagtgaccgctctgctgctgcctctcgcacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgtcatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcg</p>

		<p>agagggcaaccctttcatgcaggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatacagcagaagccagggcaggtcctcgctgctgatctaccacaccagccgct ccacagcggatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacacc tcaccatctctctctgcagcccgaggatttgcgctctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtaaggtaccaagctggaaatcaagggagggc aggatcagggcggggcgaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctg acttgtaccgtgtccgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttgattcgcca gcctccggggaagggctctgaatggattgggggtatttggggatcagagactact actaccagtcacttaagctgtcatctgtgaccgcccgtgacaccgcccgtactattg tgccaaacattactattacggagggcttatgctatggactactggggacagggga ccctgggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac</p>
<p>99790 CAR6 scFv soluble -aa</p>	<p>78</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfsgsgsgtdytlitisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselsl tctvsgvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdskn qvsllkssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvss<u>hhhhhhh</u></p>
<p>104880 CAR6 completa - nt</p>	<p>90</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaattgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggtc ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaaggg aacaccctgccctacaccttgagcagggcaccaagctcgagattaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagcggaggcggaggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttgatcagaca gccaccggggaagggctctggaatggattggagtgatttggggctctgagactact actaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctgggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccgggtc cctaccatcgctcccagcctctgtccctgctcggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggcgtgcataaccggggctcttgacttcgctgcgatctacatttggg cccctctggctgggtacttgcggggctcctgctgctttcactcgtgatcactcttac tgaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcagatgctccagcctac</p>
		<p>aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcgagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcgca gaaagaatccccaaagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaagccacgcagcg actgtaccaggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg</p>

ES 2 734 549 T3

<p>104880 CAR6 completa - aa</p>	<p>36</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc<u>rasqdiskylnw</u> yqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgtdytlitisslqpedfavycqgg <u>ntlpyt</u>fgqgkkleikggsgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsk qvsklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgggtlvtvssttppaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaagavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeegcelrvkfsrsadapay kqqgnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p>CAR7</p>		
<p>Dominio scFv de CAR7</p>	<p>7</p>	<p>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgset tyysssksrvtiskdnskqvsklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgg gtlvtvssggsgggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlslspgeratlscrasqd iskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgtdytlitisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgkkleik</p>
<p>100796 CAR7 scFv soluble -nt</p>	<p>67</p>	<p>atggcactgctgtcactgcctcctctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggcccaagtccagctgcaagagtcaggaccggactggatgaaccgctctgaga ctctctcactgactgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctccgggaaagggttgatggattgggtgtcatctgggggttc tgaaaccacctactactcatctccctgaagtccagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgtgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg ggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcgggtggagggtctggagggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcgagattgtgatgactcagtc ccagccaccctttctcttccaccggcgagagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtacctcaactggtatcagcaaaaaccgggagcggccctc gcctcctgatctaccatacctcagccttcactctggtatccccgctcggttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgagtgatattctgccagcagggaataacccttccttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccaccat</p>
<p>100796 CAR7 scFv soluble -aa</p>	<p>79</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs</p>
		<p>wirpppgkglewigviwgsettyysssksrvtiskdnskqvsklssvtaadta vyycahyyyggsyamdywgggtlvtvssggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfs gsgsgtdytlitisslqpedfavycqqgntlpytfgqgkkleik<u>hhhhhhh</u></p>

<p>104881 CAR7 completa - nt</p>	<p>91</p>	<p>atggctctgcccgtagaccgactcctcctgccactggctctgctgcttcaagccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tgattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcgagtgatttggggtag cgaaaccacttactattcatcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggctcctacgccatggactactg ggccagggaaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggtaggaggtggctccggaggtggcggaaagcgaatcgtgatgaccagagc cctgcaaccctgtccctttctccggggaacgggctaccctttcttctgctgggcac acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggccccta ggcttcttatctaccacacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgctttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgacctctcatctctccagcccagga cttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacacctcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgcc ccgacctcgcctctcagccgctttccctgctccggagggcatgtagaccgcagc tggtggggccgtgcataccggggctcttgacttcgcctgcatatctacatttggg cccctctggctggtagcttgcggggctcctgctgctttcactcgtgatcactcttac tgtaacgcggctcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcctgagggc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgcccgttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcgca gaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgc aggccctgccgcctcgg</p>
<p>104881 CAR7 completa - aa</p>	<p>37</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyysslksrvtiskdsknqvsllkssvtaadta vyyca<hyvyggsyamdy< h="">wgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfcggntlpytfgqgkkleiktppaprpptpa ptiasqplsrpeacrpaagavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapay kqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmae ayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</hyvyggsyamdy<></p>
<p>CAR8</p>		
<p>Dominio scFv de CAR8</p>	<p>8</p>	<p>qvqlqesgpglvkpssetlslctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyyqsslksrvtiskdsknqvsllkssvtaadtavyycahyvyggsyamdywgq gtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqd iskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytltisslqpedfa vyfcqqgntlpytfgqgkkleik</p>

<p>100798 CAR8 scFv soluble - nt</p>	<p>68</p>	<p>atggcactgctgtcactgcctcctgctgcctctggccctccttctgcatgccgc caggccccaagtccagctgcaagagtccaggaccggactggtgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaccgtcagcggcggtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctcccggaaagggttgaatggattggtgtcatctggggttc tgaaaccacactactaccagcttccctgaagtccagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgtgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcggtggagggtctggagggtggag gatccggtggtggtgggtcaggcggaggaggagcagagattgtgatgactcagtca ccagccacccttctctttcaccggcgagagagcaaccctgagctgtagaccag ccaggacatttctaagtaacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcagccttactctggtatccccgctcggttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgccagcagggaataacccttcttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaatcaagcaccatcaccatcatcatcaccac</p>
<p>100798 CAR8 scFv soluble - aa</p>	<p>80</p>	<p><u>MALPVTALLPLALLLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpselslctctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvsklssvtaadta vyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqs patlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrllhsgiparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkcleik<u>hhhhhhh</u></p>
<p>104882 CAR8 Completa - nt</p>	<p>92</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgcgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcaggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccggaaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactatcaatcttccctgaagtccgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgccgctgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg gggccagggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcgggtggagggtggtcgggaggcgggtgggtcagaaatcgtgatgaccagagc cctgcaaccctgtcccttctcccgggaaacgggctacccttcttgtcgggcatc acaagatatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccta</p>
		<p>ggcttcttatctaccacacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgcttagc gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggga cttcgcggtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgcc ccgaccatcgctctcagccgcttccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggcgtgcatacccgggtcttgacttcgctgcgatctacatttggg cccctctggtggtacttgcgggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttac tgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttgggtcgagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcgca gaaagaatccccaaagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcatatgc aggccctgccgcctcgg</p>

<p>104882 CAR8 Completa - aa</p>	<p>38</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPqvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadta vyyca<hu>hyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsgggsgggsgggseivmtqs patlslspgeratlsc<u>rasqdiskyln</u>wyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfc<u>qggntlpyt</u>fgqgkkleiktttpprptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapay kqqgnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmae ayseiqmkqerrrrqkqhdqlyqqlstatkdtvdalhmqalppr</hu></p>
<p>CAR9</p>		
<p>Dominio scFv de CAR9</p>	<p>9</p>	<p>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrhsg giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkkleikggggs ggggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsltctvsgvslpdygvswirqpp gkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslklssvtaadtavyyca hyyyggsyamdywgqgtlvtvss</p>
<p>99789 CAR9 scFv soluble - nt</p>	<p>69</p>	<p>atggccctcccagtgaccgctctgctgctgctctcgcacttcttctccatgccgc tcggcctgagatcgatgacccaaagccccgctaccctgtccctgtcaccggcg agagggcaacccttcatgcagggccagccaggacatttctaagtacctcaactgg tatcagcagaagccagggcaggctcctcgctgctgatctaccacaccagccgct ccacagcggatccccgccagattttccgggagcgggtctggaaccgactacacc tcaccatctcttctctgcagcccaggatttcgctgctctatttctgccagcagggg aatactctgccgtacaccttcggtaaggtaccaagctggaaatcaagggagggcgg aggatcaggcgggtggcggaaagcggaggaggtggctccggaggaggaggttcccaag tgcagcttcaagaatcaggaccggacttgtgaagccatcagaaacctctccctg acttgtaccgtgtcgggtgtgagcctccccgactacggagtctcttgattcgcca gcctccggggaagggtcttgaatggattgggggtgatttggggatcagagactactt actacaattcatcacttaagtacgggtcaccatcagcaaagataatagcaagaac caagtgtcacttaagctgtcatctgtgaccgcccgtgacaccgccgtgtactattg tgccaaacattactattacggagggtcttatgctatggactactggggacagggga ccctggtgactgtctctagccatcaccatcaccaccatcatcac</p>
<p>99789 CAR9 scFv soluble - aa</p>	<p>81</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u>eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgkkleikgggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpssetlsl tctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsk qvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvss<hu>hhhhhhh</hu></p>

<p>105974 CAR9 completa - nt</p>	<p>93</p>	<p>atggccctccctgtcaccgcccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccc tcggccccgaaattgtgatgaccagtcaccgcccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccagggtcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcaactacagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaagg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtagggaagcggaggcgggtgggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgcttggatcagaca gccaccggggaagggctggaatggattggagtatttggggctctgagactactt actacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgcccgtgactattg cgtaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactaccccagcaccgaggccaccaccccggct cctaccatcgcctcccagcctctgtccctcgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tggggggcgcgtgcatacccggggcttctgacttcgcctgcgatctacatttggg cccctctggctggtacttgcggggctcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcggagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcagagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgctcgg</p>
<p>105974 CAR9 completa - aa</p>	<p>39</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPeivmtqspatlslspgeratlsc<u>rasqdiskyl</u>nw yqqkpgqaprlliy<u>htsrllhs</u>giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfc<u>ggg</u> <u>ntlpyt</u>fgqgkkleikggggsgggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpsetlsl tctvsgvslp<u>dygvs</u>wirpppgkglewig<u>viwgsettyynsslks</u>rvtiskdskn qvsllkssvtaadtavyyca<u>hyyyggsyamy</u>wgqgltvtvssttppaprpptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvlllslvitly ckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpееееggcelrvkfsrsadapay kqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqdkmae ayseigmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
<p>CAR10</p>		
<p>Dominio scFv de CAR10</p>	<p>10</p>	<p>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirpppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdsknqvsllkssvtaadtavyyca<u>hyyyggsyamy</u>wgq gtlvtvsggggsgggsgggsgggsgggseivmtqspatlslspgeratlscrasq iskylnwqqkpgqaprlliyhtsrllhsqiparfsgsgsgtdytltisslqpedfa vyfcggntlpytfgqgkkleik</p>

ES 2 734 549 T3

<p>100796 CAR10 scFv soluble -nt</p>	<p>70</p>	<p>atggcactgcctgtcactgccctcctgctgcctctggcctccttctgcatgcgc caggcccccaagtcacagctgcaagagtcaggaccggactggatgaagccgtctgaga ctctctcactgacttgtaccgtcagcggcgtgtccctccccgactacggagtgtca tggatccgccaacctccccggaaagggcttgaatggattgggtgtcatctggggttc tgaaccacctactacaactcttccctgaagtcacagggtgaccatcagcaaggata attccaagaaccaggtcagccttaagctgtcatctgtgaccgctgctgacaccgcc gtgtattactgcgccaagcactactattacggaggaagctacgctatggactattg gggacagggcactctcgtgactgtgagcagcggcgggtggagggtctggaggtggag gatccgggtgggtgggtcaggcggaggaggagcagagattgtgatgactcagtca ccagccaccctttctcttccaccggcgagagcaaccctgagctgtagagccag ccaggacatttctaagtaacctcaactggtatcagcaaaaaccggggcaggccctc gcctcctgatctaccatacctcacgccttcaactctggtatccccgctcggttagc ggatcaggatctggtaccgactacactctgaccatttccagcctgcagccagaaga tttcgcagtgtatttctgccagcagggcaatacccttcttacaccttcggtcagg gaaccaagctcgaaatcaagcaccatcaccatcatcaccaccat</p>
<p>100796 CAR10 scFv soluble -aa</p>	<p>82</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpselsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdsknqvsllkssvtaada vyycahyyyggsyamdywgggtlvtvssggggsgggsgggsggggseivmtqs patlslspgeratlsctasqdiskylnwyyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfs gsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkcleik<u>hhhhhhh</u></p>

<p>105975 CAR10 completa - nt</p>	<p>94</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgc tcggcccgaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagccccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggt coattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatcttctgtcagcaagg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggaggaggaagcggaggcggaggagccagg tccaactccaagaaagcggaccgggtcttgtgaagccatcagaaactctttcactg acttgtactgtgagcggagtgtctctccccgattacgggggtgtcttggatcagaca gccaccggggaagggctctggaatggattggagtatttggggctctgagactactt actacaactcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaat caggtgtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattg cgctaagcattactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggta ctctggtcaccgtgtccagcaccactacccagcaccgaggccaccacccccggct cctaccatcgctcccagcctctgtccctcgctccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggcctgcataaccgggggtcttgacttcgctcgcgatctacatttggg ccctctggctggacttgcgggggtcctgctgctttcactcgtgatcactctttac tgaagcgcggctcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggtcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcgagagaggagta cgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgca gaaagaatccccagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagatttggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg</p>
<p>105975 CAR10 completa - aa</p>	<p>40</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLS<u>CRASQDISKYL</u>NW YQQKPGQAPRLLIY<u>HTSRLHS</u>GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFC<u>QQG</u> <u>NTPYTF</u>GGQTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLP<u>DYGV</u>SWIRQPPGKLEWIG<u>VIWGSETTYNSSLKS</u>RVTISKDNSKN QVSLKLSVTAADTAVYYCAK<u>HYYYGGSYAMDY</u>WGQGLTVTVSSTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>
<p>CAR11</p>		
<p>Dominio scFv de CAR11</p>	<p>11</p>	<p>eivmtqspatls slspgeratls crasqdiskylnwyqqkpgqaprllyhtsrllhs giparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgkcleikggggs ggggsggggsqvlqesgpglvkpssetls lctctvsgvslpdygvswirppgkgle wigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvs lklssvtaadtavyycahyyyy gsyamywgqglvtvss</p>

<p>103101 CAR11 scFv soluble - nt</p>	<p>71</p>	<p>Atggccctccctgtaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgcgc tcggcccgaatgtgatgaccagtcacccgccactcttagcctttcaccggtg agcgcgcaacctgtcttcgagagcctcccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagcccggacaggctcctcgcttctgatctaccacaccagccggt ccattctggaatccctgccaggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgccctacacctttggacagggcaccaagctcgagattaaaggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcgggtggaggaagccaggtccaactccaagaa gcccagccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttccactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctcccattacggggtgtcttgatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtatttggggctctgagactactactacaattcatccc tcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgctgtactattgcgctaaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggtactctggtcaccgtgt ccagccaccaccatcatcaccatcaccat</p>
<p>103101 CAR11 scFv soluble - aa</p>	<p>83</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHARP</u> eivmtqspatlslsperatlscrasqdiskylnw yqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisllqpedfavyfcqqg ntlpytfgqgtkleikggggsgggsgggsgvqlqesgpglvkpselstctvs gvslpdygvswirppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnskqvslk lssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvsshhhhhhh</p>
<p>105976 CAR11 completa - nt</p>	<p>95</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcaagcgc tcgccacaagtccagcttcaagaatcagggcctggctggtagaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaaggactggagtggatcggagtatttgggtag cgaaaccacttactataaactcttccctgaagtcacgggtcaccatttcaaagata actcaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccccgctgacaccgcc gtgtattactgtccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg ggccaggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggagtagcggaggaggcg ggagcgggtggaggtggctccggaggtggcgggaagcgaatcgtgatgccagagc cctgcaaccctgtcccttctcccggggaacgggctacccttctgtcgggcatc acaagatctcaaaatacctcaattggtatcaacagaagccgggacagggcccta ggctcttactatccacacctctcgctgcatagcgggattcccgcacgcttagc</p>
		<p>gggtctggaagcgggaccgactacactctgaccatctcatctctccagcccaggga cttcgccgtctacttctgccagcagggtaacaccctgccgtacaccttcggccagg gcaccaagcttgagatcaaaaccactactcccgtccaaggccaccaccctgcc ccgaccatcgctctcagccgcttccctcgctccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccgggtcttgacttcgctcgcgatctacatttggg cccctctgggtggtacttgcggggtcctgctgcttctcactcgtgatcactcttac tgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcc tgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggagg aaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctac aagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctcgagagaggagta cgactgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatgggcccgaagccgcgca gaaagaatccccagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaa gcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaagccacgacgg actgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgc aggccctgccgcctcgg</p>

<p>105976 CAR11 completa - aa</p>	<p>41</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLP<u>PDYGVS</u> WIRQPPGKGLEWIGV<u>VIWGSETTYYNSSLKSR</u>VTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTA VYYCAK<u>HYYYGGSYAMDY</u>WGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQS PATLSLSPGERATLS<u>CRASQDISKYL</u>NWYQQKPGQAPRLLIY<u>HTSRLHS</u>GIPARFS GSGSGTDYTLTISSSLQPEDFAVYFC<u>QOGNTLPYT</u>FGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY KQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR</p>
<p>CAR12</p>		
<p>Dominio scFv de CAR12</p>	<p>12</p>	<p>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgset tyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycahyyyggsyamdywgq gtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatlsispgeratls<u>crasqdiskyl</u> nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcq qntlpvtfgqgtkleik</p>
<p>103104 CAR12 scFv soluble - nt</p>	<p>72</p>	<p>atggctctgcccgtgaccgcactcctcctgccactggctctgctgcttcacgccgc tcgcccacaagtccagcttcaagaatcaggcctggtctggtgaagccatctgaga ctctgtccctcacttgaccgtgagcggagtgtccctcccagactacggagtgagc tggattagacagcctcccgaaaggactggagtggatcggagtgatttgggtag cgaaaccacttactataactcttccctgaagtacgggtcaccatttcaaaggata actcaaagaatcaagtgagcctcaagctctcatcagtcaccgcccgtgacaccgcc gtgtattactgtgccaagcattactactatggagggtcctacgccatggactactg</p>
		<p>gggcccaggaactctggtcactgtgtcatctggtggaggaggtagcggaggaggcg ggagcggagggtggtccgaaatcgtgatgaccagagccctgcaaccctgtcc ctttctcccgggaacgggtaccctttcttctgctgggcatcacaagatatctcaa atacctcaattggtatcaacagaagccgggacaggccctaggcttcttacc acacctctgcctgcatagcgggattcccgcacgcttagcgggtctggaagcggg accgactacactctgacctctcatctctccagcccaggacttgcgcgttactt ctgccagcagggtaacaccctgocgtacaccttcggccaggccaccaagcttgaga tcaaacatcaccaccatcatcaccatcac</p>
<p>103104 CAR12 scFv soluble - aa</p>	<p>84</p>	<p><u>MALPVTALLLPLALLLHAARP</u>qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvs wirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadta vyycahyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsgggsggggseivmtqspatls ispgeratls<u>crasqdiskyl</u>nwyqqkpgqaprlliyhtsrhsgiparfsgsgsg tdytltisslqpedfavyfcqntlpvtfgqgtkleik<u>hhhhhhh</u></p>

<p>105977 CAR12 completa - nt</p>	<p>96</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccaacgcgc tcggccccgaaattgtgatgaccagtcaccgccactcttagcctttcaccgggtg agcgcgcaaccctgtcttgagagcctccaagacatctcaaaataccttaattgg tatcaacagaagccccggacaggtcctcgccttctgatctaccacaccagccggct ccattctggaatccctgccaggtcagcggtagcggatctgggaccgactacacc tcaactatcagctcactgcagccagaggacttcgctgtctatttctgtcagcaagg aacaccctgccctacaccttggacagggcaccaagctcgagattaaagggtggagg tggcagcggaggaggtgggtccggcggtagggaagccaggtccaactccaagaaa gcgaccgggtcttgtgaagccatcagaaactcttctactgacttgtactgtgagc ggagtgtctctccccgattacgggtgtcttggatcagacagccaccggggaagg tctggaatggattggagtgatttggggtctgagactactactacaactcatccc tcaagtacgcgtcaccatctcaaggacaactctaagaatcaggtgtcactgaaa ctgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgtactattgcgctaagcattacta ttatggcgggagctacgcaatggattactgggacaggtactctggtcaccgtgt ccagcaccactaccccagcaccgaggccaccacccccggctcctaccatcgctcc cagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgctgcgatctacatttgggccctctggctgga cttgccgggtcctgctgcttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcgg aagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactca agaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaac tgccggtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaac cagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacia gaggagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccag agggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaagggccacgacggactgtaccagggact cagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttccatgcaggccctgccgctc gg</p>
<p>105977 CAR12 completa - aa</p>	<p>42</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNW YQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQG NTLPYTFGQGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGLVTVSSTTTPAPRPPPTAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR</p>
<p>CTL019</p>		

ES 2 734 549 T3

<p>CTL019-scFV soluble-etiqueta de His - nt</p>	<p>97</p>	<p>atggccctgcccgtcaccgctctgctgctgccccttgctctgcttcttcatgcagc aaggccggacatccagatgacccaaaccacctcatccctctctgctctcttggag acagggtgaccatttcttctgctgcccagccaggacatcagcaagtatctgaactgg tatcagcagaagccggacggaaccgtgaagctcctgatctaccatacctctcgct gcatagcggcgtgccctcacgcttctctggaagcggatcaggaaccgattattctc tactatttcaaactcttgagcaggaagatattgccacctatttctgccagcagggt aataccctgccctacaccttcggaggaggaccaagctcgaatcaccggtggagg aggcagcggcgtggagggtctggtggagggtggttctgaggtgaagctgcaagaat caggccctggacttgtggccccttcacagtcctgagcgtgacttgcaccgtgtcc ggagtctccctgccgactacggagtgtcatggatcagacaacctccacggaaagg actggaatggctcgggtgtcatctggggtagcgaactacttactacaattcagccc tcaaagcaggctgactattatcaaggacaacagcaagtccaagtctttcttaag atgaactcactccagactgacgacaccgcaatctactattgtgctaagcactacta ctacggaggatcctacgctatggattactgggacaaggtacttccgtcactgtct cttcacaccatcatcaccatcaccatcac</p>
<p>CTL019-scFV soluble-etiqueta de His - aa</p>	<p>98</p>	<p><u>MALPVTALLPLALLHAARP</u>diqmtqtslsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvklliyhtsrhsgvpsrfsrgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitggggsgggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirgpprkglewlgviwgsettyynsalksrhtiikdnsksqvlk mnsiqtddtaiyycahyyyggsyamdywgggt.svtvss<u>hhhhhhh</u></p>
<p>CTL019 completa - nt</p>	<p>99</p>	<p>atggccttaccagtgaccgccttgctcctgcccgtggccttgctgctccacgccgc caggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgctctctgggag</p>

		<p>acagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtgaggcagtggtctggaacagattattctctaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtaaacgcttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcacaggtggcgtggctcgggcggtggtgggtcgggtggcggcgatctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattaccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggctctggagtggtgggagtaatatgggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaacattatta ctacggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccgaccaccaacaccggcgccaccatcgctgcagccccctgtccctgcgccagagggcgtgccggccagcggggggcgagtgca cagagggggctggacttcgctgtgatctacatctgggcgcccttgccggga cttgtgggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcaga aagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactca agaggaagatggctgtagctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtgaac tgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcagggccagaac cagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggaac gagacgtggccggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctcagg aagcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagatt gggatgaaaggcagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccaggtct cagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggcctgccccctc gc</p>
CTL019 completa - aa	58	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPdiqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvkllyhtsrllhsgvpsrfsrgsgtdysltisnleqediatyfcqqg ntlpytfgggtkleitgggsgggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirpprkglewlgviwgsettyynsalksrlltiikdnsksqvlk mnsdqtdtaiyycahyyyggyamdywgqgtsvtvsttppaprpptpaptias qplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgr klllyifkqpfmrpvqttqeedgcsrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqn qlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeysei gmkgerrrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr</p>
CTL019 dominio de scFV	59	<p>diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnw yqqkpdgtvkllyhtsrllhsgvpsrfsrgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitgggsgggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvs gvslpdygvswirpprkglewlgviwgsettyynsalksrlltiikdnsksqvlkmnsdqtdtaiyycahyyyggyamdywgqgtsvtvss</p>

[0375] Las secuencias de secuencias de CDR humanizadas de los dominios de scFv se muestran en la Tabla 4 para los dominios variables de cadena pesada y en la Tabla 5 para los dominios variables de cadena ligera. "ID" representa la respectiva SEQ ID NO para cada CDR.

Tabla 4. CDRs del dominio variable de cadena pesada (Kabat)

Candidato	FW	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
CART19 murina		GVSLPDYGVS	19	VIWGSETTYNSALKS	20	HYYYGGSYAMDY	24
CART19 humanizada a	VH4	GVSLPDYGVS	19	VIWGSETTYSSSLKS	21	HYYYGGSYAMDY	24
CART19 humanizada b	VH4	GVSLPDYGVS	19	VIWGSETTYQSSLKS	22	HYYYGGSYAMDY	
CART19 humanizada c	VH4	GVSLPDYGVS	19	VIWGSETTYNSSLKS	23	HYYYGGSYAMDY	24

Tabla 5. CDRs del dominio variable de cadena ligera

5

Candidato	FW	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
CART19 murina		RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
CART19 humanizada a	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
CART19 humanizada b	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQGNTLPYT	27
CART19 humanizada c	VK3	RASQDISKYLN	25	HTSRLHS	26	QQTLPYT	27

[0376] La Tabla 6 es una clave de identificación que correlaciona los nombres numéricos de las construcciones de CD19 con la orientación específica de las cadenas ligeras y pesadas del scFv, el número de unidades de enlazador (es decir, (G4S)₃ (SEQ ID NO: 107) o (G4S)₄ (SEQ ID NO: 106)), que separa las cadenas pesadas y ligeras, y las secuencias de aminoácidos distinguibles en la CDR2 de cadena pesada.

10

Tabla 6: Designaciones de CD19 CAR

Clon ID/CAR#	Alt. Clon ID	Orientación de cadena	Enlazadores	Sitio de mutación de CDR2 pesada	SEQ ID NO
104875 (CAR1)	C2136	L2H	3x	YSSSL	28
104876 (CAR2)	C2137	L2H	3x	YQSSL	29
104877 (CAR3)	C2138	H2L	3x	YSSSL	28
104878 (CAR4)	C2139	H2L	3x	YQSSL	29
104879 (CAR5)	C2140	L2H	4x	YSSSL	28
104880 (CAR6)	C2141	L2H	4x	YQSSL	29
104881 (CAR7)	C2142	H2L	4x	YSSSL	28
104882 (CAR8)	C2143	H2L	4x	YQSSL	29
105974 (CAR9)	C2144	L2H	4x	YNSSL	30
105975 (CAR10)	C2145	H2L	4x	YNSSL	30
105976 (CAR11)	C2146	L2H	3x	YNSSL	30
105977 (CAR12)	C2147	H2L	3x	YNSSL	30
CTL019	muCART19	L2H	3x	YNSAL	57

[0377] Los fragmentos scFv de CAR fueron clonados en vectores lentivirales para crear una construcción de CAR de longitud completa en un solo marco de codificación, y usando el promotor de EF1 alfa para la expresión (SEQ ID NO: 100).

15

[0378] El promotor EF1 alfa

20

5 CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGG
 CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTT
 CCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCA
 10 GAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCCTTTACGGGTTATGGCCCTTTCGTGCCTTGAAT
 TACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCT
 TGCGCTTAAGGAGCCCTTCGCTCGTGTGAGTTGAGGCTGGCCGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCT
 GGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGAC
 15 GCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGATAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCG
 GGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCG
 GACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGC
 GGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCA
 20 AAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAG
 CCGTGCCTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTAC
 GTCGCTTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTAIGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGG
 25 CCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGATCTTGGTTCAATTCTCAAGCCTC
 AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCGTA (SEQ ID NO: 100).

Análisis de las construcciones de CAR humanizadas se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 4.

Ejemplo 4: Análisis de las construcciones de CD19 humanizadas en CART

[0379] Para evaluar la viabilidad de reconocimiento de CD19 a través de una tecnología de CAR, los fragmentos variables de cadena única para un anticuerpo anti-CD19 se clonan en un vector de expresión de CAR lentiviral con la cadena CD3zeta y la molécula coestimuladora de 4-1BB en cuatro configuraciones diferentes y la construcción óptima se selecciona basándose en la cantidad y calidad de la respuesta de células T efectoras de las células T transducidas con CD19 CAR ("CART19" o "células T CART19") en respuesta a las dianas de CD19+. Las respuestas de células T efectoras incluyen, pero no se limitan a, la expansión celular, la proliferación, la duplicación, la producción de citoquinas y la destrucción de células diana o la actividad citolítica (desgranulación).

Materiales y procedimientos

Generación de células T CART19 humanizadas redirigidas

[0380] Los vectores de transferencia lentiviral CART19 humanizados se utilizan para producir el material genómico empaquetado en partículas lentivirales pseudotipadas VSVG. El ADN del vector de transferencia lentiviral se mezcla con los tres componentes de empaquetamiento de VSVg, gag/pol y rev en combinación con el reactivo de lipofectamina para transfectarlos juntos en células 293T. Después de 24 y 48 horas, se recogió el medio, se filtró y se concentró por ultracentrifugación. La preparación viral resultante se almacena a -80°C. El número de unidades de transducción se determina mediante titulación en las células SupT1. Las células T CART19 redirigidas se producen mediante la activación de las células T sin tratar frescas mediante el acoplamiento con micropartículas de CD3x28 durante 24 horas y luego añadiendo el número pertinente de unidades transductoras para obtener el porcentaje deseado de células T transducidas. Se permite que estas células T modificadas se expandan hasta que reposan y bajan en tamaño momento en el que son crioconservadas para su posterior análisis. El número y tamaños de células se miden usando un Coulter Multisizer III. Antes de la crioconservación, se determinan el porcentaje de células transducidas (que expresan CART19 en la superficie celular) y su intensidad de fluorescencia relativa de esa expresión mediante análisis de citometría de flujo en un LSRII. A partir de las representaciones en histograma, puede examinarse los niveles de expresión relativos de los CAR mediante la comparación del porcentaje transducido con su intensidad fluorescente relativa.

Evaluación de la actividad citolítica, las capacidades de proliferación y secreción de citoquinas de células T redirigidas CART19 humanizadas.

[0381] Para evaluar las capacidades funcionales de las células T CAR19 humanizados para matar, proliferar y secretar citoquinas, las células se descongelan y se dejaron recuperar durante la noche. Además de el CART19 humanizado, el murino CART19 se utilizó con fines comparativos mientras SS1-BBz se utilizó como la orientación

no-CAR expresado para el fondo CAR efecto/T célula. El (GS) CART19 "control" estándar de oro se utilizó en todos los ensayos para comparar la variación del ensayo. Es importante destacar que, el GS CART19 son células producidas en el grado de investigación (es decir, no grado clínico) condiciones de fabricación, e incluyen la adición de IL-2 al cultivo de crecimiento. Este impacto probable la viabilidad general y la funcionalidad de estas células y no deben evaluarse como una comparación directa con la producción de calidad para investigación de las otras poblaciones de células T transducidas. La matanza de células T se dirige hacia K562, una línea celular de leucemia mielógena crónica que expresan o no expresan CD19 o PT14, las células B aisladas a partir de pacientes con LLC. Para este ensayo de citotoxicidad basado en el flujo, las células diana se tiñen con CSFE para cuantificar su presencia. Las células diana se tiñeron para la expresión CD19 para confirmar los niveles antígenos diana similares. Las actividades citolítica de las células CAR19 T se miden a una titulación de proporciones de efector: célula diana de 10: 1, 3: 1, 1: 1, 0,3: 1 y 0: 1 donde efectores se definieron como las células T que expresan el anti-CD19 receptor quimérico. Los ensayos se iniciaron mediante la mezcla de un número apropiado de células T con un número constante de células diana. Después de 16 h, se eliminó el volumen total de cada mezcla y cada pocillo se lavó combinando apropiadamente. Las células T se tiñeron para CD2 y todas las células teñidas con 7AAD marcador en vivo/muerto. Después del lavado final, las células sedimentadas se resuspenden en un volumen específico con un número predeterminado de contar bolas. Datos de tinción de células se recogieron por flujo LSRII citometría y se analizaron con el software FloJo usando micropartículas para cuantificar los resultados.

[0382] Para la medición de la proliferación celular y la producción de citoquinas de las células T CAR19 humanizadas, las células se descongelan y se dejaron recuperar durante la noche. Además del CART19 humanizado, el murino CART19 se utilizó con fines comparativos mientras SS1-BBz se utilizó como la segmentación no CAR expresado para el fondo CAR efecto celular/T. El (GS) CART19 "control" estándar de oro se utilizó en todos los ensayos para comparar la variación del ensayo. Las células T fueron dirigidas bien hacia K562, una línea celular de leucemia mielógena crónica que expresan o no expresan CD19 o PT14, las células B aisladas de pacientes con LLC. Además, los granos CD3x28 se utilizaron para evaluar el potencial de las células T para responder a las señales endógenas inmunológicas. Para analizar la proliferación, las células T se tiñeron con CSFE. La proliferación es la dilución de la mancha CSFE reflejando la separación de las marcas de los padres ahora en dos células hijas. Las pruebas de ensayo solamente un efector: diana de 1: 1 y 1: 0, donde se definieron efectores como las células T que expresan el anti-CD 19 receptor quimérico. El ensayo se realiza por duplicado y 24 horas después de la mezcla de las células, el 50% de los medios de comunicación se elimina/reemplazado para el análisis de citoquinas mediante el panel de Luminex 10-plex de detección de citocinas humanas. Después de 5 días, las células T se tiñeron para la expresión del CAR, ya sea como células phenotyped CD4 o CD8 y se tiñeron para vivo/muerto de 7AAD. Después del lavado final, las células sedimentadas se resuspenden en un volumen específico con un número predeterminado de contar bolas BD. Datos de tinción de células se recogieron por flujo LSRII citometría y se analizaron con el software FloJo usando micropartículas para cuantificar los resultados. Recuentos de células totales fueron determinados por el número de células contadas en relación con un número específico de micropartículas multiplicado por la fracción de micropartículas aún para ser contadas.

[0383] Para evaluar el potencial de las células CART19 humanizadas que funcionan de manera similar a las CART19 murinas actualmente satisfactorias, se quiso evaluar in vitro su capacidad para matar células diana, para proliferar en respuesta al antígeno específico y para mostrar signos de persistencia. Mediante el empaquetamiento de cada una de las construcciones lentivirales CART19 humanizadas y su titulación en las células SupT1, fuimos capaces de determinar que la cantidad de virus para normalizar transducciones fue de alrededor de 50%. Esto permite comparaciones más directas de la actividad comenzando con sitios de integración promedio similares por célula.

[0384] Las células T CAR19 terapéuticas se generan partiendo de la sangre de un donante con aféresis normal cuyas células T sin tratar se obtienen por selección negativa para las células T, linfocitos CD4+ y CD8+. Estas células son activadas por micropartículas CD3x28 en 10% de RPMI a 37°C, 5% de CO₂.

[0385] Después de 24 horas, las células T maduran y se añade la cantidad normalizada de virus. Las células T comienzan a dividirse en un patrón de crecimiento logarítmico que se controla midiendo los recuentos de células por ml y tamaño celular. A medida que las células T comienzan a reposar, el crecimiento logarítmico disminuye y se reduce el tamaño de las células. La combinación de la tasa de desaceleración del crecimiento y el tamaño de las células T que se acerca a -300 fl determina el estado de las células T para ser criopreservadas o reestimuladas.

[0386] Hay una tendencia muy similar de las células T al reposo tal como se ve por tamaño. El patrón casi solapante entre las células CART humanizadas con la CART19 murina actual y la población UTD indica que no hay efecto inusual de la CAR19 humanizada en la expansión de las células T normales después de la activación. Como control, se utiliza SS1-BBz para definir la actividad de CAR independiente antígeno no deseado. El perfil de expansión en el número de células totales muestra que las diferencias en los números reales en las expansiones individuales son probablemente debidas principalmente al diferente número de células de partida. Al normalizar el número de células T de partida, se observa un grupo apretado para todas las células CART19. Además, se detecta el efecto no deseado de la activación CAR independiente de antígeno en una línea descendente y fuera del grupo.

[0387] Se determinó el nivel de expresión en la superficie de cada uno de estos CAR19 células que expresan. Los

virus se titularon normalizado para la transducción muestran niveles de expresión comparable que correlacionan con la eficacia de transducción, las células ciento transducidas. Algunos CARs tenían sus títulos extrapolados de los embalajes anteriores, y aunque sus porcentajes transducidas son más bajos, su IMF también se reducen como se esperaba. Los resultados indican que no hay ningún efecto negativo detectable de el CAR19 humanizado en la capacidad de las células para expandir normalmente cuando se compara con la UTD y las células T murinas CAR19.

[0388] Se analiza la capacidad de las células CART19 humanizados para discernir selectivamente un epítipo específico de la superficie celular expresado en células y destruirlas. K562 células de tipo salvaje no expresan CD19, pero pueden ser transducidas para expresar CD19. La comparación de estas curvas Matar, titulado la cantidad de células efectoras muestra que aquellas células que expresan CD19 son destruidos. Redirigida células T del mismo donante y modificados con células CART19 humanizadas o células CART19 murinos clínicas actuales indican que no hay diferencia en su capacidad de matar. Las curvas de matanza muestran que una capacidad de matar muy similar se encuentra entre las células CART19 humanizados dirigidos células CD19 + CLL de paciente 14. Curiosamente, hay una disminución en la actividad citolítica en general, en particular GS CART19, lo que sugiere que estas células pueden poseer propiedades inhibitoras específicas. El nivel similar de CD19 expresado en las células diana indica el nivel de expresión no es la razón para las diferencias en la destrucción de células.

[0389] La propiedad necesaria de las células CART19 humanizados a proliferar después de ver las células diana se encuentra en todas las construcciones después de haber sido estimuladas por micropartículas de CD3x28 de control y las dianas que expresan CD19. El reconocimiento de las células de CLL PT14 parece indicar una tasa de proliferación ligeramente mayor con scFv con una orientación de cadena ligera a pesada sin sesgo observado cuando se tiene una unión 3x o 4x GGGGS (SEQ ID NOS 107 y 106, respectivamente). Los resultados proliferativos reflejan el número total de células acumuladas durante los 5 días, lo que indica que las CART19 humanizadas, 2146, 2144, 2136, 2141 y 2137 conducen a una señal más proliferativa a las células T. Sorprendentemente, esto se detectó en las células CART19 humanizadas dirigidas células de CLL PT14.

[0390] En general, las construcciones de CART19 humanizadas presentan características muy similares a CART19 murina actual en la actividad citolítica, la respuesta proliferativa y la secreción de citoquinas a dianas específicas de antígeno. El potencial de las células CART19 humanizadas, (2146, 2144, 2136, 2141 y 2137), para conducir una señal más proliferativa a las células T tras la activación de la diana parecería ser un beneficio adicional de estas nuevas construcciones para mejorar potencialmente la respuesta terapéutica.

Resultados

[0391] Utilizando ensayos de desgranulación y de producción de citoquinas, se demuestra que las células T CART19 modificadas se dirigen específicamente a células CD19+.

[0392] Se analizaron células ND317 transducidas con construcciones CD19CAR humanizadas (también conocidas como "huCART19") de la invención. Hubo una similitud estrecha de tamaño de las células T durante sus expansiones después de la activación de CD3x28 y la transducción con los candidatos de CART19 humanizadas relativos a CART19 murina y células T no modificadas (UTD).

[0393] Los experimentos mostraron poca diferencia en el número de células T que se acumularon durante sus expansiones después de la activación de CD3x28 y la transducción con los distintos candidatos de CART19 humanizadas en relación a CART19 murina y células T no modificadas (UTD).

[0394] Las expresiones en la superficie celular de CART19 humanizada son comparables y su nivel de expresión muy similar a CART19 murina. La superposición de histogramas que representan el patrón de tinción de la expresión en la superficie celular de cada célula T transducida con CART19 humanizada y la intensidad media de fluorescencia (MFI) calculada a partir de estos perfiles se correlaciona bien con el porcentaje de células transducidas.

[0395] Además, las CART19 humanizadas tienen actividades citotóxicas específicas similares en el reconocimiento de células diana que expresan CD19 y comparable a CART19 murina. Las representaciones de ensayos de destrucción basados en flujo de 16 horas utilizando titulación de relación efector a diana (E:T) con células CART19 humanizadas efectoras que reconocen CSFE se marcaron con K562cc (Fig. 1A controles de CD19 que no expresan), K562.CD19 (figura 1B, células K562 transducidas para expresar CD19) o PT14 (Fig. 1C, células B de paciente con CLL). Las actividades citolíticas de todas las células CART19 humanizadas son similares y comparables con CART19 murina. Las diferencias en la actividad citolítica entre diferentes dianas son similares y comparable, lo que indica que la actividad de CART19 murina se conserva en la forma humanizada del CART 19.

[0396] Las superposiciones de histogramas de células CART19 humanizadas marcadas con CFSE 6 días después de mezclarse con las células diana muestran su capacidad de proliferación (Fig. 5). La respuesta proliferativa liberada de CAR19 es una respuesta necesaria después del acoplamiento con y destrucción de células diana para desarrollar una respuesta clínica positiva. La dilución de la tinción CSFE con SS1-BBz, un indicador de división de las células hijas que se diluyen de la tinción de células parentales, es un resultado de las células T en agitación que mantienen divisiones en un mecanismo independiente de reconocimiento.

[0397] La capacidad global de las poblaciones de células para proliferar se evalúa con los granos CD3x28 que imita el compromiso endógeno del TCR y la co-estimulador CD28. Los datos indican cada población de células tiene un potencial de proliferación comparable. Todas las células CART19 humanizados y murinos proliferan fuertemente y comparable tras el acoplamiento con células K562 que expresan CD19. Células CART19 humanizados también respondieron bien a las células B obtenidas de un paciente con CLL, aunque algunos parecen responder a un poco menos. Como se muestra en la figura. 2A y 2B, las células CART19 humanizados 2136, 2137, 2140, 2141, 2144 y 2146 puede ser visto que tienen una proliferación ligeramente más robusta como lo demuestra la mayor dilución de la tinción CSFE. Todas Estas construcciones tienen la misma orientación de la cadena variable del ligero a pesado, lo que indica que esta es la orientación de elección. Una mirada más cercana a los cambios de aminoácidos en el sitio CDR2 pesada (Tabla 1) revela que cada una de las tres variaciones YSSSL, YQSSL y YNSSL (SEQ ID NOS: 28, 29 y 30, respectivamente) están representados en las construcciones que parecían tener las proliferaciones más robustas después de ver los objetivos. Además, estas construcciones observadas tienen tanto el enlazador G4S que contiene 3 copias de la subunidad (3G4S) (SEQ ID NO: 107) y el enlazador G4S que contiene 4 copias de la subunidad (4G4S) (SEQ ID NO: 106), indicando el tamaño enlazador no influyó en la función.

[0398] A partir de las expansiones proliferativas descrito anteriormente, el número total de células después de 5 días después de compromiso tumor se determina. Las células muestran una disminución en el número de los que fueron inicialmente cabeza de serie, lo que indica la activación es necesaria para mantener la supervivencia. Un control de la activación endógena se analizó para mostrar que el recuento total de células al final de 6 días era similar. Células CART19 humanizados dirigidos células K562 que expresan CD19 muestran que las dos células CART19 murinos ambos terminan con el número de células más altas, con 2146 ligeramente por encima de todas las otras construcciones con valores similares. Los números de células totales también se analizaron 6 días después de la exposición a las células B de paciente 14 (PT14), y de manera interesante muestra que el CART19 humanizado previamente seleccionado a cabo construye 2146, 2144, 2136, 2141 y 2137, todos los cuales tienen la luz para la cadena pesada orientación y representan las tres amino variaciones de ácido YSSSL, YQSSL y YNSSL (SEQ ID NOS: 28, 29 y 30, respectivamente), dieron como resultado números de células totales más altas, superiores a los CART19s murinos. Esta diferenciación inesperada entre los diversos clones anti-CD 19CAR humanizado puede traducir a una mejor eficacia clínica de las células de CART transducidas con estas construcciones.

[0399] Se analizaron los niveles de base de citoquinas producidas a partir de células CART19 humanizadas después de la exposición a las células K562 de control que no expresan CD19. Se analizaron los sobrenadantes de las 24 horas mediante un panel Luminex de 30-plex. El potencial perfil de citoquinas a partir de la estimulación del sistema inmune endógeno con las micropartículas de CD3x28 indica que cada una de las poblaciones de células tiene un perfil de citoquinas comparable.

[0400] Los datos también muestran que la CART19 humanizada y CART19 murina producen perfiles de citoquinas similares a niveles similares al responder a las mismas dianas. El perfil de citoquinas fue menor pero similar cuando se reconocen las células diana PT14.

Ejemplo 5: Tratamiento con células CART CD19 humanizadas en un modelo ALL in vivo.

[0401] Las células ALL humanas primarias pueden ser cultivadas en ratones inmunocomprometidos sin tener que cultivarlas in vitro. Estos ratones se pueden utilizar para probar la eficacia de las células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) en un modelo que representa la población de pacientes que se encuentran en la clínica. El modelo usado aquí, HALLX5447, se pasó dos veces en ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}//3rg^{Tf1Wj}/SZJ (NSG), antes de su uso en los estudios que evalúan la eficacia de las células T CAR.

[0402] Las células T CD19 CAR murinas han demostrado previamente que reconocen y matan células de leucemia en un modelo de ratón NSG de ALL humana primaria. El scFv CD19 (fragmento variable Fc de cadena única) ha sido humanizado y el presente ejemplo compara la capacidad de las células T que expresan un CD19 CAR humanizado (CAR 2) para eliminar las células tumorales de ALL in vivo con la de células T CD19 CAR murinas. Aquí, la eficacia de estas células ha sido comparada directamente en ratones con ALL humana primaria establecida, tal como se ensayó mediante análisis de FACS de la sangre periférica de células CD19+ humanas. Después de un implante de $1,5 \times 10^6$ células ALL primarias por vía intravenosa, se logró una carga de enfermedad de 2,5-4% células CD19+ en la sangre mediante la implantación post-tumor de 2 semanas. Este porcentaje de CD19 es del total de células en la sangre de los ratones. 100% de las células humanas en los ratones antes del tratamiento con células T CAR son células tumorales. Porcentajes superiores al 2% de células CD19+ humanas en la sangre periférica se consideran que son una enfermedad ALL humana establecida en este modelo. Los ratones con leucemia se trataron con células T CAR una vez que la leucemia se establece en los ratones, aproximadamente dos a tres semanas después de la implantación del tumor. Los ratones en cada grupo fueron tratados con 5×10^6 células T totales humanas. Las eficiencias de transducción de las células T humanas donantes con el lentivirus que expresa CAR fueron entre 40-60%. Después del tratamiento con las células T, los ratones sangraron semanalmente para el análisis del porcentaje de células CD19+ humanas en la sangre como un biomarcador para progresión de la enfermedad.

Materiales y procedimientos:

[0403] **Células ALL humanas primarias:** Las células primarias no se cultivaron in vitro antes de la implantación. Estas células fueron recogidas de un paciente con ALL y después se transfirieron en ratones para el establecimiento y la expansión. Después de que las células tumorales se expandieron en los ratones, la médula ósea y los esplenocitos se recogieron y se congelaron de forma viable en lotes separados para la re-implantación. Las células se congelaron en 90% de DMSO y 10% de FBS a una concentración mínima de 5×10^6 células por mililitro. Para la re-implantación, se descongelaron las células de ALL congeladas y luego se inyectaron por vía intravenosa en ratones NSG, a fin de generar ratones con ALL que serán utilizados para comparar la eficacia antitumoral de las células T CD19 CAR humanizadas y células T CD19 CAR murinas.

[0404] **Ratones:** Ratones NSG de 6 semanas de edad (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{Tf1Wjl}/SZJ) se recibieron del Laboratorio Jackson (Stock número 005557). Los animales se dejaron aclimatar a las instalaciones de animales Novartis NIBRI durante al menos 3 días antes de la experimentación. Los animales fueron tratados de acuerdo con las normas y directrices de Novartis ACUC.

[0405] **Implantación del tumor:** Células de ALL humanas primarias pasadas en serie in vivo, modelo HALLX5447, se descongelaron en un baño de agua a 37°C. Las células después se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml y se lavaron dos veces con PBS estéril frío. Las células ALL primarias se contaron a continuación y se resuspendieron a una concentración de 15×10^6 células por mililitro de PBS. Las células se colocaron en hielo e inmediatamente (en una hora) se implantaron en ratones. Las células ALL fueron inyectadas intravenosamente a través de la vena de la cola en un volumen de 100 μ l, para un total de $1,5 \times 10^6$ células por ratón.

[0406] **Dosificación de células T CAR:** A los ratones se les administró 5×10^6 células T 16 días después de la implantación del tumor. Las células se descongelaron parcialmente en un baño de agua a 37 grados celsius y a continuación se descongelaron completamente mediante la adición de 1 ml de PBS estéril frío al tubo que contiene las células. Las células descongeladas se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y se ajustaron a un volumen final de 10 ml con PBS. Las células se lavaron dos veces a 1000 rpm durante 10 minutos cada vez y después se contaron en un hemocitómetro. Las células T se resuspendieron a continuación a una concentración de 50×10^6 células por ml de PBS frío y se mantuvieron en hielo hasta que se dosificaron los ratones. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa a través de la vena de la cola con 100 μ l de las células T CAR para una dosis de 5×10^6 células T por ratón. Cinco ratones por grupo fueron tratados con 100 μ l de PBS solo (PBS), células T no transducidas (simulación), células T CD19 CAR murinas (muCTL019), o células T CD19 CAR humanizadas (huCTL019). Las células T no transducidas, células T muCTL019 y células T huCTL019 fueron todas preparadas a partir del mismo donante humano en paralelo.

[0407] **Monitorización en animales:** El estado de salud de los ratones se controló diariamente, incluyendo medidas del peso corporal dos veces por semana. El porcentaje de cambio en el peso corporal se calculó como $(BW_{\text{actual}} - BW_{\text{inicial}}) / (BW_{\text{inicial}}) \times 100\%$. La carga tumoral se controló semanalmente mediante análisis FACS de la sangre periférica. Los ratones se sangraron semanalmente a través de la vena de la cola en tubos recubiertos con EDTA que se mantuvieron en hielo. 10-20 μ l de la sangre se sembró a partir de los tubos en placas de 96 pocillos en hielo. Los glóbulos rojos se lisaron con tampón de lisis de glóbulos rojos ACK (Life Technologies, número de catálogo A10492-01) y después se lavaron dos veces con PBS frío. Las células se incubaron con una mezcla de bloqueo de Fc de bloque Fc de humano y de ratón (Miltenyi Biotec, números de catálogo 130-059-901 y 130-092-575) durante 30 minutos y después se incubaron con un anticuerpo anti-CD19 humano durante 30 minutos. Las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 2% durante 20 minutos, se lavaron y se almacenaron en PBS + FBS al 2% durante la noche antes de su análisis en un Canto BD o Fortessa, seguido por un análisis posterior usando el software de análisis de FACS FlowJo. Se analizaron las células para determinar el porcentaje de células CD19⁺ humanas en la sangre de ratones NSG que llevan tumor de ALL HALLX5447 humano. Los porcentajes de CD19 en la sangre se presentan como la media + error estándar de la media (SEM).

[0408] Los valores del porcentaje de tratamiento/control (T/C) se calcularon utilizando la siguiente fórmula:

$$\% T/C = 100 \times \Delta T / \Delta C \text{ si } \Delta T \geq 0;$$

$$\% \text{ Regresión} = 100 \times \Delta T / T_{\text{inicial}} \text{ si } \Delta T < 0;$$

donde T = porcentaje promedio de CD19 de sangre periférica del grupo tratado con el fármaco en el día final del estudio; T_{inicial} = porcentaje de CD19 de sangre periférica del grupo tratado con el fármaco en el día inicial de la dosificación; ΔT = porcentaje promedio de CD19 de sangre periférica del grupo tratado con el fármaco en el día final del estudio - porcentaje promedio de CD19 de sangre periférica del grupo tratado con fármaco en el día inicial de la dosificación; C = porcentaje promedio de CD19 de sangre periférica del grupo de control en el día final del estudio; y ΔC = porcentaje promedio de CD19 de sangre periférica del grupo de control en el día final del estudio - porcentaje promedio de CD19 de sangre periférica del grupo de control en el día inicial de la dosificación.

[0409] Los valores T/C en el intervalo de 100% a 42% se interpretará que tiene una actividad antitumoral nula o mínima; los valores T/C que son $\leq 42\%$ y $> 10\%$ se interpreta que tienen actividad antitumoral o inhibición del crecimiento tumoral. Valores T/C $\leq 10\%$ o valores de regresión $\geq -10\%$ se interpretan que es estasis tumoral. Valores

de regresión < -10% son reportados como regresión.

Resultados:

5 **[0410]** La actividad anti-tumor de células T CD19 CAR murinas y humanizadas se evaluaron y compararon directamente en un modelo principal de ALL humano. Después de la implantación del tumor en el día 0, los ratones se asignaron al azar en grupos de tratamiento y se trataron con 5×10^6 células T por vía intravenosa en el día 16. La carga de la enfermedad ALL y la salud animal se monitorizaron hasta que los animales alcanzaron el punto final. Los ratones de todos los grupos fueron sacrificados en el día 65 post-implantación del tumor cuando la carga de enfermedad en los grupos de control estaba por encima del 80% de células CD19⁺ humanas en la sangre periférica.

15 **[0411]** Se observó una clara diferencia en la carga de enfermedad entre los grupos de control y los grupos tratados con células T CD19 CAR murinas o humanizadas con $P < 0,01$ desde el día 24 después de la implantación del tumor, y continuando hasta el final del estudio en día 65. Las células T CD19 CAR murinas y humanas demuestran una capacidad similar para controlar el crecimiento de células tumorales de ALL HALLX5447 en ratones NSG. Ambos grupos mostraron un nivel de enfermedad de la sangre periférica máximo de 12-15% de células CD19⁺ en el día 21 después del implante de HALLX5447. 42 días después de la implantación de células tumorales, no hubo células CD19⁺ humanas detectables en el grupo huCTL019, mientras que el porcentaje de células CD19⁺ humanas en el grupo muCTL019 se redujo a alrededor del 1%. Las células T CAR CD 19 murinas y humanizados dieron como resultado una capacidad comparable para controlar la expansión de células ALL humanas primarias en este modelo ($P > 0,05$). El % de valores T/C para el grupo de células T transducidas de forma simulada fue del 94,40%, lo que demuestra que las células T transducidas simuladas no tenían actividad antitumoral. El porcentaje de regresión del grupo muCTL019 fue -89,75% y del grupo huCTL019 fue -90,46%, lo que demuestra que estos dos tratamientos fueron capaces de provocar una regresión del modelo de tumor HALLX5447. Los porcentajes de células CD19⁺ humanas de sangre periférica como una medida de la carga de la enfermedad en estos ratones se muestran en la figura. 7. El grupo de tratamiento con PBS, que no recibió ninguna células T, demostró la cinética de crecimiento tumoral de ALL primaria de línea base en ratones NSG implantados por vía intravenosa. El grupo de tratamiento simulado recibió células T no transducidas que se sometieron al mismo proceso de expansión in vitro que las células T CAR. Estas células sirven como un control de células T para mostrar la respuesta no específica de las células T en este modelo de tumor. Los grupos de tratamiento de células T transducidas con PBS y simuladas demostraron la progresión tumoral continua durante todo el experimento. Las células T CD19 CAR murinas y humanizadas controlan la progresión de la enfermedad dentro de una semana de las inyecciones de 5×10^6 de células T y demuestran una capacidad similar para mantener el control de la enfermedad en el transcurso de este estudio 65 días.

35 **[0412]** La actividad antitumoral de células T transducidas con CAR CD19 murinas y humanizadas se evaluó en un estudio de eficacia en ratones NSG que llevan un modelo de ALL humano primario, HALLX5447. Este estudio demostró que tanto las células T CD19 CAR murinas como humanizadas (muCTL019 y huCTL019) son capaces de montar una respuesta anti-tumoral en un modelo primario de ALL humana. Además, esta respuesta, como se ensayó por la carga de enfermedad de sangre periférica es la misma para las células muCTL019 y huCTL019. Las células T CAR CD19 murinas y humanizadas controlan el crecimiento de ALL primaria en una semana de los ratones dosificados con las células T. Inicialmente, después del tratamiento, la carga de la enfermedad siguió aumentando antes de disminuir hasta niveles prácticamente indetectables. Un tratamiento ya sea con células T CAR murinas o humanizadas resultó en una respuesta antitumoral sostenida en el curso de la progresión de la enfermedad de 65 días en ratones tratados con el control. Las células T CD19 CAR humanizadas demostraron una capacidad similar para montar una respuesta tumoral anti-CD 19 eficaz y controlar la carga de la enfermedad ALL tal como se ha visto con las células T CAR CD 19 murinas.

Ejemplo 6: Células T CAR CD19 para usar en el tratamiento de mieloma múltiple.

50 **[0413]** A pesar de los regímenes actuales de quimioterapia, terapias dirigidas, y autotrasplante de células madre, el mieloma se considera una enfermedad incurable. El presente ejemplo describe el tratamiento de mieloma múltiple (MM) con células T autólogas dirigidas a CD19 con un receptor quimérico antígeno (lentivirus/CD19: 41BB: CD3zeta; también conocidos como "CART19" o CTL019). Este ejemplo demuestra que las terapias con CAR dirigidas a CD19 tienen el potencial para establecer remisiones duraderas profundas a largo plazo basadas en el reconocimiento de células madre y/o tumorales de mieloma que expresan niveles de CD19 muy bajos (indetectable por la mayoría de los procedimientos).

60 **[0414]** En el tratamiento de un paciente con leucemia de células plasmáticas secundaria agresiva, se encontró que CART19 administrado dos días después de un trasplante de células madre autólogas de rescate dio lugar a una rápida eliminación de la leucemia de células plasmáticas y una muy buena respuesta parcial en un paciente que había progresado a través de múltiples líneas de quimioterapia. Este paciente era dependiente de transfusión durante meses antes del tratamiento; a los dos meses después del tratamiento, recuperó su recuento en sangre (con recuentos de plaquetas en el rango normal y el recuento de glóbulos blancos) y requirió transfusiones desde que fue dada de alta del hospital de su tratamiento.

65

[0415] Dado que las células de mieloma no expresan CD19 de forma natural, el hallazgo de que el tratamiento con CART19 indujo una respuesta rápida y significativa del tumor en este tumor fue sorprendente. Sin desear estar ligado por una teoría particular, se razonó que CART19 podría ser utilizada para tratar el mieloma porque: (1) mientras que las células de mieloma se cree tradicionalmente que son negativas para la expresión de CD19 por citometría de flujo, hay datos que indican que las células de mieloma pueden expresar niveles muy bajos de CD19, de tal manera que la expresión es detectable por el ARN pero no por citometría de flujo o inmunohistoquímica; y (2) el concepto de reconocimiento de la célula B clonotípica, que se piensa que es la célula madre cancerosa que da lugar a mieloma múltiple, y es particularmente resistente a la quimioterapia. Existe una relación clonal entre las células B y las células tumorales de mieloma, pero la terapia del mieloma tradicional está dirigida a las células plasmáticas malignas en lugar de células B. CART19 para el tratamiento de mieloma, por tanto, se dirige a una población de células diferente de la mayoría de las terapias de mieloma.

[0416] En nuestra experiencia de un solo paciente, el paciente tenía células plasmáticas circulantes, y hemos sido capaces de probar sus células tumorales para la expresión de CD19. Aproximadamente el 1-2% de sus células tumorales expresaron el antígeno CD19. (Fig. 8). De este modo, se razonó que CART19 puede tener un efecto directo en una población muy pequeña de sus células tumorales; una respuesta parcial muy buena, aunque no se hubiera previsto en base al reconocimiento de sólo una muy pequeña población de células CD19+ tumorales.

[0417] En este ejemplo, se administró CART19 después del rescate del trasplante de células madre autólogas después de melfalán a dosis alta. Aunque ésta es una terapia estándar en el mieloma, no es curativa. Además, este paciente había sido sometido previamente a trasplantes en tándem de células madre autólogas y recayó de forma temprana (<6 meses) después del trasplante. Sin desear estar ligado por una teoría particular, el uso de células CART19 como se describe en el presente ejemplo puede tener un mecanismo que no se solapa en el tratamiento de mieloma cuando se combina con un trasplante de células madre autólogas de rescate.

[0418] Diez pacientes con mieloma múltiple adicionales serán tratados con CART19 en un ensayo de fase I.

Justificación de la dosis y Riesgos/Beneficios

[0419] Hemos elegido utilizar dosificación plana a través de la vía de administración intravenosa para este protocolo. El objetivo principal de este protocolo era poner a prueba la seguridad y la viabilidad de la administración de células de CART-19 para pacientes con mieloma múltiple. Las toxicidades primarias que fueron previstos son la liberación de citoquinas (1) cuando los CARs se encuentran con su sustituto antígeno CD 19 en células B malignas o normales; (2) el agotamiento de las células B normales, similar a la terapia con rituximab; (3) de la piel sensible a esteroides y síndromes gastrointestinales se asemejan a la enfermedad de injerto contra huésped como se ha visto anteriormente cuando se expande/células T autólogas costimulated se han acoplado con ASCT para MM. Una preocupación teórica era si la transformación o la proliferación incontrolada de las células Carro -19 T podrían ocurrir en respuesta a niveles elevados de CD 19. Esto era menos una preocupación en esta solicitud en comparación con otro estudio de pacientes con LLC, como la carga de la B- clonotypic se espera que las células de MM a ser mucho más baja que la carga de las células B malignas en los pacientes con LLC refractarios tratados en ese estudio.

Justificación de la dosis

[0420] Con los 3 primeros pacientes, hemos observado la actividad clínica en dosis que varían de $1,4 \times 10^7$ a $1,1 \times 10^9$ células CART-19. Esta observación demuestra, al menos en los primeros 3 pacientes tratados, que no existe una relación dosis-respuesta obvia. Se observó una respuesta completa en pacientes administrados con dos veces de diferencia log de la dosis. Por lo tanto, a diferencia de los fármacos estándar que se metabolizan, las células T CAR pueden tener una amplia gama de respuesta de dosis. Esto es más probable debido a que las células T CAR son capaces de proliferar extensamente en los pacientes. Por lo tanto, establecimos un intervalo de dosis de $1-5 \times 10^8$ células CART-19 para infusión. En este estudio de un solo paciente ofrecen sobre una base de uso compasivo, el paciente se ofreció hasta 5×10^8 células CART19, sin límite de dosis más baja. Para el ensayo de diez pacientes, los pacientes serán administrados con $1-5 \times 10^7$ de células CART-19.

Diseño general

[0421] Este fue el estudio de un solo paciente que se ofrece sobre una base de uso compasivo; que fue modelado después de un estudio de fase I para determinar si la infusión de células T autólogas transducidas para expresar CART-19 es segura. Los objetivos primarios del estudio fueron determinar la seguridad, tolerabilidad y el potencial injerto de células T CART-19 en pacientes que experimentan ASCT de rescate tras recidiva precoz tras la primera ASCT. El protocolo consiste en un estudio piloto abierto.

[0422] En la entrada los sujetos se someterán a una biopsia de médula ósea y de laboratorio de rutina y la evaluación de imágenes de su MM. Los sujetos elegibles serán sometidos a aféresis de estado estacionario para obtener grandes cantidades de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para la fabricación de CART-19. Las células T se purificaron a partir de las PBMC, transducidas con TCR ζ /41BB vector lentiviral, expandido in vitro y luego congelado para la administración futuro. El número de pacientes que tienen colecciones de células T

inadecuados, expansión o de fabricación en comparación con el número de pacientes que tienen células T fabricados con éxito será registrado; viabilidad de la fabricación de productos que no se espera que sea problemático en esta población de pacientes.

5 **[0423]** Los sujetos generalmente habrán tenido células madre de sangre periférica adecuados restantes almacenados de la movilización/colección realizado en preparación para su primera ASCT para llevar a cabo dos ASCT adicional. Los que no se someterá a un segundo procedimiento de movilización/colección, ya sea antes o después de su aféresis de estado estable con un régimen de acuerdo con la preferencia del médico tratante. Aproximadamente dos semanas después de la leucaféresis inicial, los sujetos serán admitidos al hospital y recibir melfalán de dosis alta (día -2), seguido por infusión de células madre autólogas dos días más tarde (día 0), y todos los sujetos recibirán infusión de carrito- 19 células cuatro días más tarde (día 2). Hasta 10 pacientes serán inscritos.

15 **[0424]** Todos los sujetos tendrán análisis de sangre para evaluar la seguridad, y el injerto y la persistencia de las células CART-19 a intervalos regulares a través de semana 4 del estudio. En el día 42 y el día 100, los sujetos se someterán a aspirados de médula ósea/biopsias para evaluar la médula ósea carga de células de plasma y el tráfico de células de CART-19 a la médula ósea. Una evaluación de respuesta formal se hará en el día 100 de acuerdo con el Grupo de Trabajo Internacional del Mieloma (IMWG) criteria136, y TTP será objeto de seguimiento según la práctica clínica habitual para los pacientes con mieloma múltiple. El principal resultado de eficacia medidos en este estudio será una comparación de la PTT del TACM inicial de un paciente con PTT después de que el TACM en este estudio.

20 **[0425]** A medida que la variable principal de este estudio es la seguridad y la viabilidad de la infusión de CART - 19 células con TACM, el estudio empleará una regla de detención temprana. Brevemente, si menos de 2, eventos adversos inesperados graves se producen entre los primeros cinco sujetos tratados, el estudio entonces devengará cinco sujetos adicionales hacia una inscripción objetivo de 10. Observaremos sujetos tratados durante 40 días después de CART-19 de infusión (es decir, a través de la primera evaluación de la respuesta oficial en el día 42) antes de inscribir un tema posterior hasta cinco sujetos se han inscrito y por lo observado, para el tratamiento del segundo grupo de cinco pacientes, no se requerirá ningún periodo de espera entre los sujetos.

30 **[0426]** Después de los 6 meses de seguimiento intensivo, los sujetos serán evaluados al menos cada tres meses durante dos años con una historia clínica, el examen físico y análisis de sangre. Después de esta evaluación, los sujetos entrarán en un estudio de vuelco para el seguimiento anual por teléfono y un cuestionario para un máximo de trece años adicionales para evaluar el diagnóstico de problemas de salud a largo plazo, como el desarrollo de nuevos tumores malignos.

Criterios de valoración primario del estudio

40 **[0427]** Este ensayo piloto está diseñado para poner a prueba la seguridad y la viabilidad de las células T autólogas transducidas con el CD19 TCR ζ /41BB en pacientes sometidos a ASCT de rescate para MM siguiente recaída temprana después de la primera ASCT.

Las variables de seguridad y factibilidad principales incluyen:

45 **[0428]** La aparición de acontecimientos adversos relacionados con el estudio, definidos como NCJ CTC 2: grado 3 signos/síntomas, toxicidades de laboratorio y sucesos clínicos que son posiblemente, probablemente o definitivamente relacionados con el tratamiento del estudio en cualquier momento de la infusión hasta la semana 24. Este incluirá toxicidad en perfusión y cualquier toxicidad posiblemente relacionado con la Carro -19 células incluyendo, pero no limitado a:

50 a. Fiebres
b. Rash
c. Neutropenia, trombocitopenia, anemia, aplasia de médula
d. La disfunción hepática
55 e. Infiltrados pulmonares u otra toxicidad pulmonar
f. Síndromes GVHD como que afectan el tracto gastrointestinal o la piel.

[0429] Factibilidad para la fabricación de células CART 19 procedentes de productos de aféresis de pacientes. Se determinó el número de productos fabricados que no cumplen criterios de liberación para la eficiencia de la transducción de vector, la pureza de las células T, la viabilidad, la esterilidad y la contaminación tumor.

60 **[0430]** La profundidad y duración de la respuesta después de un trasplante autólogo de células madre con CART19 se compararán con la profundidad y duración de la respuesta que cada paciente alcanzó inicialmente después de un trasplante autólogo de células madre estándar.

65 Selección de sujetos y extracción

Criterios de inclusión

5 [0431] Los sujetos deben haber sufrido un TACM previa para MM y han progresado dentro de los 365 días de la infusión de células madre. Los sujetos que se han sometido a dos ASCTs anteriores como parte de un régimen de consolidación tándem TACM planificada son elegibles. La progresión se definió según los criterios IMWG para la enfermedad progresiva o, para los pacientes que alcanzaron CR o SCR después TACM inicial, los criterios para la recaída de CR (Durie et al Leukemia 2006; 20 (9): 1467-1473). NB: No hay ningún requisito de que los pacientes deben inscribirse dentro de los 365 días de ASCT antes, y los pacientes pueden ser tratados con otros agentes, incluyendo agentes experimentales, siguientes recaída/progresión después de ASCT previa antes de la inscripción en este estudio.

[0432] Los sujetos deben haber firmado un consentimiento informado por escrito.

15 [0433] Los sujetos deben tener una función vital órgano adecuado para recibir melfalán de dosis alta según se define por los siguientes criterios, medida dentro de las 12 semanas antes de la fecha de la infusión de melfalán :. a. Senun creatinina $\leq 2,5$ o aclaramiento de creatinina estimado ≥ 30 ml/min y no dependiente de diálisis. segundo. SGOT ≤ 3 x el límite superior de la bilirrubina $\leq 2,0$ mg/dl normal y total (excepto para pacientes en los que la hiperbilirrubinemia se atribuye a síndrome de Gilbert). do. Fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) $\geq 45\%$ o, si la FEVI es $<45\%$, una evaluación formal por un cardiólogo identificación de deterioro de la función cardiovascular no clínicamente significativa. FEVI evaluación debe haber sido realizado dentro de seis semanas de inscripción. re. Función pulmonar adecuada con FEV1, FVC, TLC, DLCO (después del ajuste apropiado para el volumen pulmonar y la concentración de hemoglobina) $\geq 40\%$ de los valores previstos. Pruebas de función pulmonar se debe haber realizado el plazo de seis semanas de inscripción.

25 [0434] Los sujetos deben tener un estado funcional ECOG de 0-2, a menos que un estado de mayor rendimiento se debe únicamente al dolor en los huesos.

Criterios de exclusión:

30 Los sujetos no deben

[0435] tener una infección activa y no controlada.

35 [0436] Tener una infección activa por hepatitis B, hepatitis C o VIH.

[0437] Cualquier trastorno médico no controlado que impida la participación como se indica.

Régimen de tratamiento

40 [0438] La terapia para la recaída/mieloma múltiple progresiva

[0439] Los pacientes pueden recibir, antes de la inscripción, la terapia para la recaída de mieloma múltiple/progresiva de acuerdo con la preferencia de sus médicos tratantes. La terapia puede continuar con la inscripción.

45 [0440] Los pacientes deben detener toda terapia para dos semanas antes de la aféresis y para dos semanas antes de melfalán de dosis alta. Si se espera que más de dos semanas a transcurrir entre aféresis y dosis altas de melfalán, los pacientes pueden reanudar la terapia después de aféresis según el criterio de sus médicos tratantes.

50 Altas dosis de melfalán (día -2)

[0441] Los pacientes serán admitidos en el hospital el día -3 o -2 y se someterá a examen por los ensayos médicos y de laboratorio de rutina que asisten, que incluirán parámetros de supervisión para el síndrome de lisis tumoral, antes del comienzo del protocolo de tratamiento. La sangre para pruebas de MM monitoreo de laboratorio (SPEP, inmunoglobulinas cuantitativas, y el análisis de la cadena ligera libre de suero), se elaborará antes de la iniciación de la terapia si tales pruebas no se habían elaborado dentro de los 7 días de la admisión.

60 [0442] La terapia de dosis alta constará de melfalán en una dosis de 200 mg/m^2 administrado por vía intravenosa durante aproximadamente 20 minutos en el día -2. La dosis de melfalán se reducirá a 140 mg/m^2 para los pacientes > 70 años de edad o para los pacientes de cualquier edad quienes, según el criterio del médico tratante, pueden no tolerar una dosis de 200 mg/m^2 . Todos los pacientes recibir profilaxis estándar anti-emético, que puede incluir dexametasona, y la profilaxis con antibióticos estándar.

Reinfusión de células madre (día 0)

65 [0443] La infusión de células madre tendrá lugar el día 0, al menos 18 horas después de la administración de la

melfalán de dosis alta. Células de popa sería infundieron por vía intravenosa durante aproximadamente 20-60 minutos siguientes premedicación de acuerdo con la práctica institucional estándar. Al menos 2×10^6 células CD34 + progenitoras/kg de peso corporal debe infundirse. Además, al menos 1×10^6 células CD34 + progenitoras/kg de peso corporal debe estar disponible como un producto de células madre de respaldo para ser infundido en el caso de injerto retardada o fallo tardío del injerto. G-CSF se debe administrar SQ comenzando el día 5, dosifica de acuerdo con la práctica institucional estándar. Otras medidas de soporte como soporte transfusional se llevarán a cabo de conformidad con las directrices institucionales estándar.

Infusión de células CART19 (día +2)

[0444] se le dará una dosis única de CART-19 células T transducidas que consta de hasta 5×10^7 células CART-19. No existe una dosis mínima aceptable para la infusión de las células transducidas con el vector de CD19 TCR ζ 4-1BB en este protocolo de un solo paciente. Las células CART-19 serán proporcionadas como una dosis única por la rápida infusión i.v. en el día 2 después de la infusión de células madre.

Mantenimiento de lenalidomida

[0445] Los sujetos que recibieron y toleraron lenalidomida de mantenimiento después de su primera ASCT volvieron a iniciar la terapia de mantenimiento con lenalidomida aproximadamente el día + 100, asumiendo que no hay contraindicaciones en el juicio del médico tratante.

Preparación y Administración del fármaco del estudio

[0446] Las células T CART 19 se preparan en el CVPF y no se liberan del CVPF hasta que se cumplan los criterios de liberación aprobados por la FDA para las células infundidas (por ejemplo, dosis de células, la pureza de células, la esterilidad, el número promedio de copias de los vectores/células, etc.). Tras su liberación, las células llevan a la cabecera para la administración.

[0447] Descongelación celular. Las células congeladas serán transportadas en hielo seco a la cabecera del sujeto. Las células serán descongelaron a la cabecera del paciente usando un baño de agua mantenido a 36°C a 38°C. La bolsa se masajea suavemente hasta que las células simplemente han descongelado. No debe haber grumos congelados que quedan en el recipiente. Si el producto de células CART-19 parece tener un daño o la bolsa que tiene una fuga, o de lo contrario parece estar comprometido, no debe ser infundido y debe ser devuelto a la CVPF como se especifica a continuación.

[0448] La premedicación. Los efectos secundarios después de infusiones de células T incluyen fiebre transitoria, escalofríos y/o náuseas; ver Cruz et al. para su revisión (Cytotherapy 2010; 12 (6): 743-749). Se recomienda que el sujeto ser pre-medicado con clorhidrato de acetaminofeno y difenhidramina antes de la infusión de CART-19 células. Estos medicamentos pueden repetirse cada seis horas, según sea necesario. Un curso de la medicación anti-inflamatorio no esteroideo puede ser prescrito si el paciente sigue teniendo fiebre no se alivia con acetaminofeno. Se recomienda que los pacientes no reciben corticosteroides sistémicos, tales como la hidrocortisona, prednisona, metilprednisolona o dexametasona en cualquier momento, excepto en el caso de una emergencia que amenaza la vida, ya que esto puede tener un efecto adverso sobre las células T. Si se requieren corticosteroides para una reacción en infusión aguda, una dosis inicial de hidrocortisona se recomienda 100 mg.

[0449] reacción febril. En el caso improbable de que el sujeto desarrolla sepsis o bacteriemia sistémica después de la infusión de células CAR T, cultivos apropiados y manejo médico debe ser iniciado. Si se sospecha un producto de células T CAR-19 contaminada, el producto puede ser analizado de nuevo para la esterilidad usando muestras archivadas que se almacenan en la CVPF.

[0450] Administración. La infusión se llevará a cabo en una habitación aislada en Rhoads, utilizando precauciones para los pacientes inmunodeprimidos. Las células T transducidas pueden administrar por infusión intravenosa rápida a una velocidad de flujo de aproximadamente 10 ml a 20 ml por minuto a través de un látex de calibre 18 libre de tipo Y sangre de conjunto con una llave de paso de 3 vías. La duración de la infusión será de aproximadamente 2-20 minutos. Cada bolsa de infusión será estar provisto de una etiqueta que contenga lo siguiente: "SÓLO PARA USO AUTÓLOGO." Además, la etiqueta tendrá al menos dos identificadores únicos, como las iniciales del sujeto, fecha de nacimiento y número de estudio. Antes de la infusión, dos individuos verificar independientemente toda esta información en presencia del sujeto y así confirmar que la información se corresponde correctamente al participante.

[0451] Los equipos médicos de emergencia (es decir, la carretilla de emergencia) estarán disponibles durante la infusión en caso de que el sujeto tiene una respuesta alérgica, o crisis hipotensiva severa, o cualquier otra reacción a la infusión. Los signos vitales (temperatura, tasa de respiración, pulso y presión sanguínea) serán tomadas antes y después de la infusión, a continuación, cada 15 minutos durante al menos una hora y hasta que estos signos son satisfactorios y estable. Se le pedirá al objeto de no dejar hasta que el médico considera que es seguro para él o ella lo haga.

Invasado

5 [0452] La infusión se compone de una sola dosis de $1-5 \times 10^8$ células T transducidas con CART, con una dosis mínima aceptable de 1×10^7 células CART-19 para infusión. Cada bolsa contiene una parte alícuota (volumen dependiente de la dosis) de cryomeia que contiene los siguientes reactivos infusibles grado (% v/v): 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% de dextrosa (5%), 0,45% de NaCl, hasta 7,5% de DMSO, 1% de dextrano 40, 5% de albúmina de suero humano.

Aféresis

10 [0453] Se lleva a cabo un procedimiento de aféresis de gran volumen (12-15 litros o 4-6 volúmenes de sangre) en el centro de aféresis. PBMC se obtienen para CART-19 durante este procedimiento. A partir de una sola leucaféresis, la intención es recoger al menos 50×10^9 glóbulos blancos de la sangre para la fabricación de células CART-19 T. Leucocitos de sangre de referencia para los requisitos de revisión retrospectiva de la FDA y de investigación
15 también se obtienen y criopreservados. Se espera que el producto celular para estar listo para la liberación aproximadamente 2-4 semanas más tarde. La citometría de flujo cuantificación de linfocitos subconjunto, incluyendo CD19 y la determinación de células CD20 B. Base de evaluación se hace para el anticuerpo humano anti-VSV-G y anti-murino (HAMA). Si un sujeto ha tenido anteriormente una colección de aféresis adecuada de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación en la Célula Clínica y de las Instalaciones de Producción de Vacunas, estas células
20 pueden ser utilizadas como fuente de células para la fabricación de CART-19. El uso de un producto de aféresis peraltada evitaría el gasto, tiempo y riesgo para que el sujeto sufra una colección de aféresis adicional.

Quimioterapia citorreductora

25 [0454] La quimioterapia de linfoagotamiento será melfalán en dosis altas como se describe en el presente documento.

Infusión de CART-19

30 [0455] La infusión se iniciará el día + 2 después de la reinfusión de células madre.

[0456] En el día + 2 antes de la primera infusión, los pacientes tendrán un CBC con diferencial, y la evaluación del recuento de CD3, CD4 y CD8, ya que la quimioterapia se administra en parte para inducir linfopenia.

35 [0457] La primera dosis se administra usando una dosis única. Las células se descongelaron a la cabecera del paciente. Las células descongeladas se darán en tan rápida una velocidad de infusión según la tolerancia tal que la duración de la infusión será de aproximadamente 10-15 minutos. Con el fin de facilitar la mezcla, las células serán administradas simultáneamente usando un adaptador Y. Los sujetos se infunden y premedican como se describe en el presente documento. Los signos vitales de los sujetos serán evaluados y oximetría de pulso realiza antes de la dosificación, al final de la infusión, y cada 15 minutos a partir de entonces durante 1 hora y hasta que estos son estables y satisfactorios. Se obtiene una muestra de sangre para la determinación de un nivel de línea de base de CART-19 cualquier momento antes de la primera infusión y de 20 minutos a 4 horas después de cada infusión (y enviado a TCSL).

45 [0458] Los pacientes con efectos tóxicos relacionados con las dosis altas de melfalán tendrán su programa de infusión retrasado hasta que estas toxicidades se hayan resuelto. Las toxicidades específicas que justifiquen el retraso de infusiones de células T incluyen: 1) pulmonar: necesidad de oxígeno suplementario para mantener la saturación mayor que 95% o presencia de anomalías radiográficas en radiografía de tórax que son progresivos; 2) Cardíaca: Nueva arritmia cardíaca no controlada con el tratamiento médico 3) La hipotensión que requiere vasopresores. 4) infección activa: cultivos de sangre positivos para bacterias, hongos o virus dentro de las 48 horas de infusión de células T.

Tratamiento de la toxicidad

55 [0459] La proliferación de células T incontrolada. La toxicidad asociada con infusiones de células T alogénicas o autólogas se ha tratado con un tratamiento de inmunosupresión farmacológica. La toxicidad asociada a cuerpos T ha sido reportada por responder a los corticosteroides sistémicos. Si se produce la proliferación de células T no controlada (grado 3 o 4 de toxicidad relacionada con células CART-19), los sujetos pueden ser tratados con corticosteroides. Los sujetos serán tratados con metilprednisolona en pulsos (2 mg/kg i.v. dividida q8 hr x 2 días), seguida de una reducción rápida.

65 [0460] Además, en base a las observaciones de los sujetos tratados en otro protocolo, existe cierta preocupación para el síndrome de activación de macrófagos (MAS), aunque se espera que la carga tumoral de CD19+ sea mucho menor en los pacientes con mieloma que en pacientes con CLL. El tratamiento y el momento de tratamiento de esta toxicidad será a discreción del médico del paciente y el investigador del estudio. El tratamiento sugerido podría incluir: si el sujeto tiene una fiebre superior a 101°F que dura más de 2 días consecutivos y no hay evidencia de

infección (cultivos de sangre negativos, CXR o de otra fuente), puede considerarse tocilizumab 4 mg/kg. La adición de los corticosteroides y la terapia anti-TNF pueden ser considerados a discreción del médico.

5 **[0461]** Depleción de células B. Es posible que se detecte la depleción de células B e hipogammaglobulinemia. Esto es común con terapias dirigidas anti-CD20. En el caso de hipogammaglobulinemia clínicamente significativa (es decir, infecciones sistémicas), a los sujetos se les dará inmunoglobulina intravenosa (IVIG) mediante pautas de dosificación clínicas establecidos para restaurar los niveles normales de los niveles de inmunoglobulina en suero, como se ha hecho con Rituximab.

10 **[0462]** Fracaso del injerto primario. El fracaso del injerto primario (es decir, no-injerto) puede ser más común después de la segunda ASCT en comparación con la primera ASCT. Los criterios de elegibilidad estipulan que suficientes células madre deben estar disponibles para la reinfusión de rescate a la discreción del médico tratante en caso de fracaso del injerto primario.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

[0463]

20 **<110> NOVARTIS AG RUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA**

<120> TRATAMIENTO DEL CÁNCER UTILIZANDO RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO ANTI-CD19 HUMANIZADO

25 **<130> N2067-7002WO**

<140>
<141>

30 **<150> 61/838,537**
<151> 2013-06-24

<150> 61/802,629
<151> 2013-03-16

35 **<160> 121**

<170> PatentIn version 3.5

40 **<210> 1**
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 **<220>**
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

50 **<400> 1**
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

55 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

60 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

ES 2 734 549 T3

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
 115 120 125
 15 Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 130 135 140
 20 Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
 145 150 155 160
 25 Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser
 165 170 175
 30 Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser
 180 185 190
 35 Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr
 195 200 205
 40 Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
 210 215 220
 45 Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser
 50 <210> 2
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 60 <400> 2
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 65 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

ES 2 734 549 T3

	50		55		60														
5	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro			
	65					70					75					80			
10	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr			
					85					90					95				
15	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser			
				100					105					110					
20	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu			
			115					120					125						
25	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys			
		130					135					140							
30	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg			
	145					150					155					160			
35	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser			
				165						170					175				
40	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser			
				180					185					190					
45	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr			
			195					200					205						
50	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly			
		210					215					220							
55	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val			
	225					230					235					240			
60	Ser	Ser																	
65	<210>	3																	
	<211>	242																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Secuencia artificial																	
	<220>																		
	<221>	fuelle																	
	<223>	/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"																	
65	<400>	3																	
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu			
	1			5						10				15					
65	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr			
				20					25					30					

ES 2 734 549 T3

5 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

10 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys
 50 55 60

15 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80

20 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

25 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

35 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala
 130 135 140

40 Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
 145 150 155 160

45 Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175

50 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
 180 185 190

55 Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
 195 200 205

60 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln
 210 215 220

65 Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240

70 Ile Lys

60 <210> 4
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 734 549 T3

<400> 4
 1 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 5
 5 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 10 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 15 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys
 20 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 25 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 30 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 35 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 40 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala
 45 Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
 50 Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 55 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
 60 Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
 65 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln
 Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 Ile Lys
 <210> 5
 <211> 247
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 5

10 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

15 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

20 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

30 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

40 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
115 120 125

50 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
130 135 140

55 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
145 150 155 160

60 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

65 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser
180 185 190

70 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
195 200 205

75 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
210 215 220

80 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

5 <210> 6
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15 <400> 6
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

25 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

30 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

40 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
115 120 125

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
130 135 140

50 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
145 150 155 160

55 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

60 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
180 185 190

65 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
195 200 205

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
210 215 220

5 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

10 <210> 7
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

25 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

30 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

35 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys
 50 55 60

40 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80

45 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

50 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

55 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

60 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
 130 135 140

65 Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 145 150 155 160

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
 165 170 175

70 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
 180 185 190

Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 5 Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 210 215 220
 10 Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
 225 230 235 240
 15 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 245
 <210> 8
 <211> 247
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 25 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 8
 30 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 35 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 40 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 45 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys
 50 55 60
 50 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80
 55 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 60 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 65 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 70 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
 130 135 140
 75 Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 145 150 155 160

ES 2 734 549 T3

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
 165 170 175
 5 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
 180 185 190
 10 Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 15 Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 210 215 220
 Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
 225 230 235 240
 20 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 245
 25 <210> 9
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 35 <400> 9
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 40 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 45 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 50 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 60 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 65 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 115 120 125
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr

ES 2 734 549 T3

130 135 140

5 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
145 150 155 160

10 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

15 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser
180 185 190

20 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
195 200 205

25 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
210 215 220

30 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

35 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 10
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

45 <400> 10
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

50 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

55 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

60 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys
50 55 60

65 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

65 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

5 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

10 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
130 135 140

15 Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
145 150 155 160

20 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
165 170 175

25 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
180 185 190

30 Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
195 200 205

35 Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
210 215 220

40 Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
225 230 235 240

45 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

50 <210> 11
<211> 242
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

60 <400> 11
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

65 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

70 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

ES 2 734 549 T3

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
 115 120 125
 15 Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 130 135 140
 20 Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
 145 150 155 160
 25 Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser
 165 170 175
 30 Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser
 180 185 190
 35 Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr
 195 200 205
 40 Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
 210 215 220
 45 Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser
 50 <210> 12
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 60 <400> 12
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 65 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ES 2 734 549 T3

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys
50 55 60

5 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

10 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

15 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

20 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala
130 135 140

25 Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
145 150 155 160

30 Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
165 170 175

35 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly
180 185 190

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
195 200 205

40 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln
210 215 220

45 Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
225 230 235 240

50 Ile Lys

55 <210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

65 <400> 13
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

5 <210> 14
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15 <400> 14
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

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

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

30 <210> 15
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

40 <400> 15
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

45 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

50 <210> 16
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

60 <400> 16
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15

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

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

<210> 17
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 10
 <400> 17
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
 1 5 10 15
 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 20
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 25
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 30
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 35
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 40
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110
 45
 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 55
 <400> 18
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 60
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 70
 <400> 19
 Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser
 1 5 10

5 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

10

<400> 20
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

15

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

25

<400> 21
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

30

<210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

40

<400> 22
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

45

<210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

55

<400> 23
 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

60

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 24
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

20 <400> 25
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
1 5 10

25 <210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

35 <400> 26
His Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

40 <210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

50 <400> 27
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

55 <210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

65 <400> 28
Tyr Ser Ser Ser Leu
1 5

<210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 10
 <400> 29
 Tyr Gln Ser Ser Leu
 1 5
 15
 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 25
 <400> 30
 Tyr Asn Ser Ser Leu
 1 5
 30
 <210> 31
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 40
 <400> 31
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 45
 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 50
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 55
 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 60
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 65
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 70
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110

ES 2 734 549 T3

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 5
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln
 130 135 140
 10 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 145 150 155 160
 15 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175
 20 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190
 25 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser
 195 200 205
 30 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220
 35 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240
 40 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 45 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270
 50 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285
 55 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300
 60 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320
 65 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335
 70 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350
 75 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365
 80 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400
 5 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 405 410 415
 10 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430
 15 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445
 20 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460
 25 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480
 30 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485
 35 <210> 32
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 45 <400> 32
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 50 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 55 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 60 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 65 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 70 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 75 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110

ES 2 734 549 T3

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 5 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 130 135 140
 10 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 145 150 155 160
 15 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175
 20 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190
 25 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
 195 200 205
 30 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220
 35 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240
 40 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 45 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270
 50 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285
 55 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300
 60 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320
 65 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335
 70 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350
 75 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365
 80 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380

ES 2 734 549 T3

Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400
 5 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 405 410 415
 10 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425
 15 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445
 20 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460
 25 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485
 30 <210> 33
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 40 <400> 33
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 45 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30
 50 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
 35 40 45
 55 Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 60 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 65 Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys
 85 90 95
 70 Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met

ES 2 734 549 T3

	115						120										125
5	Asp	Tyr 130	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr 135	Leu	Val	Thr	Val	Ser 140	Ser	Gly	Gly	Gly	
10	Gly 145	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly 150	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly 155	Ser	Glu	Ile	Val	Met 160	
15	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala 165	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser 170	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala 175	Thr	
20	Leu	Ser	Cys	Arg 180	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile 185	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn 190	Trp	Tyr	
25	Gln	Gln	Lys 195	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro 200	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr 205	His	Thr	Ser	
30	Arg	Leu 210	His	Ser	Gly	Ile	Pro 215	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly 220	Ser	Gly	Ser	Gly	
35	Thr 225	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr 230	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln 235	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala 240	
40	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln 245	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu 250	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly 255	Gln	
45	Gly	Thr	Lys	Leu 260	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr 265	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg 270	Pro	Pro	
50	Thr	Pro	Ala 275	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser 280	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu 285	Arg	Pro	Glu	
55	Ala	Cys 290	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly 295	Gly	Ala	Val	His	Thr 300	Arg	Gly	Leu	Asp	
60	Phe 305	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr 310	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu 315	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly 320	
65	Val	Leu	Leu	Leu	Ser 325	Leu	Val	Ile	Thr	Leu 330	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly 335	Arg	
70	Lys	Lys	Leu	Leu 340	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln 345	Pro	Phe	Met	Arg	Pro 350	Val	Gln	
75	Thr	Thr	Gln 355	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys 360	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro 365	Glu	Glu	Glu	
80	Glu	Gly 370	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg 375	Val	Lys	Phe	Ser	Arg 380	Ser	Ala	Asp	Ala	
85	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	

ES 2 734 549 T3

5 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 10 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
 145 150 155 160
 15 Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 165 170 175
 20 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
 180 185 190
 25 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
 195 200 205
 30 Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 35 Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 225 230 235 240
 40 Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
 245 250 255
 45 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270
 50 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285
 55 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300
 60 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320
 65 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335
 70 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350
 75 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365
 80 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380
 85 Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400

ES 2 734 549 T3

5 Gly Arg Arg Glu Glu₄₀₅ Tyr Asp Val Leu Asp₄₁₀ Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 10 Pro Glu Met Gly₄₂₀ Gly Lys Pro Arg Arg₄₂₅ Lys Asn Pro Gln Glu₄₃₀ Gly Leu
 15 Tyr Asn Glu₄₃₅ Leu Gln Lys Asp Lys₄₄₀ Met Ala Glu Ala Tyr₄₄₅ Ser Glu Ile
 20 Gly Met₄₅₀ Lys Gly Glu Arg Arg₄₅₅ Arg Gly Lys Gly His₄₆₀ Asp Gly Leu Tyr
 25 Gln Gly Leu Ser Thr Ala₄₇₀ Thr Lys Asp Thr Tyr₄₇₅ Asp Ala Leu His Met₄₈₀
 30 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 <210> 35
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"
 35 <400> 35
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 40 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 45 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 50 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55
 55 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 60 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 65 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 65 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

ES 2 734 549 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 5 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 145 150 155 160
 10 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser
 165 170 175
 15 Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
 180 185 190
 20 Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser
 195 200 205
 25 Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
 210 215 220
 30 Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 35 Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp
 245 250 255
 40 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 45 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285
 50 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 55 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 60 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335
 65 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 70 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 75 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 80 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415
 5 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430
 10 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 15 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 20 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480
 25 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490
 30 <210> 36
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 35 <400> 36
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 40 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 45 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 50 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 55 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 60 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 65 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 70 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

ES 2 734 549 T3

	130		135		140												
5	Gly 145	Gly	Gly	Ser	Gln	Val 150	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser 155	Gly	Pro	Gly	Leu	Val 160	
10	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr 165	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys 170	Thr	Val	Ser	Gly	Val 175	Ser	
15	Leu	Pro	Asp	Tyr 180	Gly	Val	Ser	Trp	Ile 185	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly 190	Lys	Gly	
20	Leu	Glu	Trp 195	Ile	Gly	Val	Ile	Trp 200	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr 205	Tyr	Tyr	Gln	
25	Ser	Ser 210	Leu	Lys	Ser	Arg	Val 215	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp 220	Asn	Ser	Lys	Asn	
30	Gln 225	Val	Ser	Leu	Lys	Leu 230	Ser	Ser	Val	Thr	Ala 235	Ala	Asp	Thr	Ala	Val 240	
35	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys 245	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly 250	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met 255	Asp	
40	Tyr	Trp	Gly	Gln 260	Gly	Thr	Leu	Val	Thr 265	Val	Ser	Ser	Thr	Thr 270	Thr	Pro	
45	Ala	Pro	Arg 275	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala 280	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser 285	Gln	Pro	Leu	
50	Ser	Leu 290	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys 295	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly 300	Gly	Ala	Val	His	
55	Thr 305	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe 310	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr 315	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu 320	
60	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly 325	Val	Leu	Leu	Leu	Ser 330	Leu	Val	Ile	Thr	Leu 335	Tyr	
65	Cys	Lys	Arg	Gly 340	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu 345	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln 350	Pro	Phe	
70	Met	Arg	Pro 355	Val	Gln	Thr	Thr	Gln 360	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys 365	Ser	Cys	Arg	
75	Phe	Pro 370	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly 375	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg 380	Val	Lys	Phe	Ser	
80	Arg 385	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro 390	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly 395	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr 400	
85	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	

ES 2 734 549 T3

				405						410							415
5	Arg	Arg	Gly	Arg 420	Asp	Pro	Glu	Met	Gly 425	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg 430	Lys	Asn	
	Pro	Gln	Glu 435	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu 440	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys 445	Met	Ala	Glu	
10																	
	Ala	Tyr 450	Ser	Glu	Ile	Gly	Met 455	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg 460	Arg	Gly	Lys	Gly	
15																	
	His 465	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln 470	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala 475	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr 480	
20																	
	Asp	Ala	Leu	His	Met 485	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg 490						
25																	
	<210>	37															
	<211>	491															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
30																	
	<220>																
	<221>	fuelle															
	<223>	/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"															
35																	
	<400>	37															
	Met	Ala	Leu	Pro	Val 5	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu 10	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu 15		
40																	
	His	Ala	Ala	Arg 20	Pro	Gln	Val	Gln	Leu 25	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro 30	Gly	Leu	
45																	
	Val	Lys	Pro 35	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser 40	Leu	Thr	Cys	Thr	Val 45	Ser	Gly	Val	
50																	
	Ser	Leu 50	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val 55	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln 60	Pro	Pro	Gly	Lys	
55																	
	Gly 65	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly 70	Val	Ile	Trp	Gly	Ser 75	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr 80	
60																	
	Ser	Ser	Ser	Leu	Lys 85	Ser	Arg	Val	Thr	Ile 90	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser 95	Lys	
65																	
	Asn	Gln	Val	Ser 100	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser 105	Val	Thr	Ala	Ala	Asp 110	Thr	Ala	
70																	
	Val	Tyr	Tyr 115	Cys	Ala	Lys	His	Tyr 120	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser 125	Tyr	Ala	Met	
75																	
	Asp	Tyr 130	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr 135	Leu	Val	Thr	Val	Ser 140	Ser	Gly	Gly	Gly	

ES 2 734 549 T3

5 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 165 170 175
 10 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys
 180 185 190
 15 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 195 200 205
 20 Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 210 215 220
 25 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 225 230 235 240
 30 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 35 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 40 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285
 45 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 50 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 55 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335
 60 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 65 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415

5 Arg Arg Gly Arg₄₂₀ Asp Pro Glu Met Gly₄₂₅ Gly Lys Pro Arg Arg₄₃₀ Lys Asn
 Pro Gln Glu₄₃₅ Gly Leu Tyr Asn Glu₄₄₀ Leu Gln Lys Asp Lys₄₄₅ Met Ala Glu
 10 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met₄₅₅ Lys Gly Glu Arg Arg₄₆₀ Arg Gly Lys Gly
 15 His Asp Gly Leu Tyr Gln₄₇₀ Gly Leu Ser Thr Ala₄₇₅ Thr Lys Asp Thr Tyr₄₈₀
 20 Asp Ala Leu His Met₄₈₅ Gln Ala Leu Pro Pro Arg₄₉₀
 25 <210> 38
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 38
 35 Met Ala Leu Pro Val₅ Thr Ala Leu Leu Leu₁₀ Pro Leu Ala Leu Leu₁₅
 His Ala Ala Arg₂₀ Pro Gln Val Gln₂₅ Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 40 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser₄₀ Leu Thr Cys Thr Val₄₅ Ser Gly Val
 45 Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val₅₅ Ser Trp Ile Arg Gln₆₀ Pro Pro Gly Lys
 50 Gly Leu Glu Trp Ile Gly₇₀ Val Ile Trp Gly Ser₇₅ Glu Thr Thr Tyr Tyr₈₀
 55 Gln Ser Ser Leu Lys₈₅ Ser Arg Val Thr Ile₉₀ Ser Lys Asp Asn Ser Lys
 60 Asn Gln Val Ser₁₀₀ Leu Lys Leu Ser Ser₁₀₅ Val Thr Ala Ala Asp₁₁₀ Thr Ala
 Val Tyr Tyr₁₁₅ Cys Ala Lys His Tyr₁₂₀ Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
 65 Asp Tyr₁₃₀ Trp Gly Gln Gly Thr₁₃₅ Leu Val Thr Val Ser₁₄₀ Ser Gly Gly Gly

ES 2 734 549 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 5 Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 165 170 175
 10 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys
 180 185 190
 15 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 195 200 205
 20 Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 210 215 220
 25 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 225 230 235 240
 30 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 35 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 40 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285
 45 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 50 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 55 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335
 60 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 65 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 70 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 75 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400
 80 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430
 5 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 10 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 15 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480
 20 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490
 25 <210> 39
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 35 <400> 39
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 40 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 45 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 50 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 55 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 60 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 65 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 70 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 75 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

ES 2 734 549 T3

Gly 145 Gly Gly Ser Gln Val 150 Gln Leu Gln Glu Ser 155 Gly Pro Gly Leu Val 160
 5 Lys Pro Ser Glu Thr 165 Leu Ser Leu Thr Cys 170 Thr Val Ser Gly Val 175 Ser
 10 Leu Pro Asp Tyr 180 Gly Val Ser Trp Ile 185 Arg Gln Pro Pro Gly 190 Lys Gly
 15 Leu Glu Trp 195 Ile Gly Val Ile Trp 200 Gly Ser Glu Thr Thr 205 Tyr Tyr Asn
 20 Ser Ser 210 Leu Lys Ser Arg Val 215 Thr Ile Ser Lys Asp 220 Asn Ser Lys Asn
 25 Gln Val Ser Leu Lys Leu 230 Ser Ser Val Thr Ala 235 Ala Asp Thr Ala Val 240
 30 Tyr Tyr Cys Ala Lys 245 His Tyr Tyr Tyr Gly 250 Gly Ser Tyr Ala Met 255 Asp
 35 Tyr Trp Gly Gln 260 Gly Thr Leu Val Thr 265 Val Ser Ser Thr Thr 270 Thr Pro
 40 Ala Pro Arg 275 Pro Pro Thr Pro Ala 280 Pro Thr Ile Ala Ser 285 Gln Pro Leu
 45 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys 295 Arg Pro Ala Ala Gly 300 Gly Ala Val His
 50 Thr Arg Gly Leu Asp Phe 310 Ala Cys Asp Ile Tyr 315 Ile Trp Ala Pro Leu 320
 55 Ala Gly Thr Cys Gly 325 Val Leu Leu Leu Ser 330 Leu Val Ile Thr Leu 335 Tyr
 60 Cys Lys Arg Gly 340 Arg Lys Lys Leu Leu 345 Tyr Ile Phe Lys Gln 350 Pro Phe
 65 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln 360 Glu Glu Asp Gly 365 Cys Ser Cys Arg
 70 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly 375 Gly Cys Glu Leu Arg 380 Val Lys Phe Ser
 75 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly 395 Gln Asn Gln Leu Tyr 400
 80 Asn Glu Leu Asn Leu 405 Gly Arg Arg Glu Glu 410 Tyr Asp Val Leu Asp 415 Lys

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430
 5 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 10 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 15 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480
 20 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490
 25 <210> 40
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 35 <400> 40
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 40 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 45 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 50 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 55 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 60 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 65 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 70 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 75 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 80 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

ES 2 734 549 T3

	145				150					155				160		
5	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr 165	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys 170	Thr	Val	Ser	Gly	Val 175	Ser
10	Leu	Pro	Asp	Tyr 180	Gly	Val	Ser	Trp	Ile 185	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly 190	Lys	Gly
15	Leu	Glu	Trp 195	Ile	Gly	Val	Ile	Trp 200	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr 205	Tyr	Tyr	Asn
20	Ser	Ser 210	Leu	Lys	Ser	Arg	Val 215	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp 220	Asn	Ser	Lys	Asn
25	Gln 225	Val	Ser	Leu	Lys	Leu 230	Ser	Ser	Val	Thr	Ala 235	Ala	Asp	Thr	Ala	Val 240
30	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys 245	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly 250	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met 255	Asp
35	Tyr	Trp	Gly	Gln 260	Gly	Thr	Leu	Val	Thr 265	Val	Ser	Ser	Thr	Thr 270	Thr	Pro
40	Ala	Pro	Arg 275	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala 280	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser 285	Gln	Pro	Leu
45	Ser	Leu 290	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys 295	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly 300	Gly	Ala	Val	His
50	Thr 305	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe 310	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr 315	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu 320
55	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly 325	Val	Leu	Leu	Leu	Ser 330	Leu	Val	Ile	Thr	Leu 335	Tyr
60	Cys	Lys	Arg	Gly 340	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu 345	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln 350	Pro	Phe
65	Met	Arg	Pro 355	Val	Gln	Thr	Thr	Gln 360	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys 365	Ser	Cys	Arg
70	Phe 370	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly 375	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg 380	Val	Lys	Phe	Ser
75	Arg 385	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro 390	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly 395	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr 400
80	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu 405	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu 410	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp 415	Lys
85	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn

ES 2 734 549 T3

		420						425							430	
5	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu
			435					440					445			
10	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly
		450					455					460				
15	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr
	465					470					475					480
20	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg					
					485					490						
25	<210>	41														
	<211>	491														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
30	<220>															
	<221>	fuelle														
	<223>	/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"														
35	<400>	41														
	Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
	1				5					10					15	
40	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu
				20					25					30		
45	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val
			35					40					45			
50	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
	50						55					60				
55	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr
	65					70					75					80
60	Asn	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys
					85					90					95	
65	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala
				100					105					110		
70	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met
			115					120					125			
75	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
	130						135					140				
80	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	145					150					155					160

ES 2 734 549 T3

5 Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 165 170 175
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys
 180 185 190
 10 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 195 200 205
 15 Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 210 215 220
 20 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 225 230 235 240
 25 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 30 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285
 35 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 40 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 45 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 340 345 350
 50 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 355 360 365
 55 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 370 375 380
 60 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400
 65 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430

5 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
435 440 445

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
450 455 460

10 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
465 470 475 480

15 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

20 <210> 42
<211> 486
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

30 <400> 42
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

35 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
20 25 30

40 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
35 40 45

45 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
65 70 75 80

50 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
85 90 95

55 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
100 105 110

60 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

65 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
145 150 155 160

ES 2 734 549 T3

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175
 5 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190
 10 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser
 195 200 205
 15 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220
 20 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240
 25 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 30 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270
 35 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285
 40 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300
 45 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320
 50 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335
 55 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350
 60 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365
 65 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380
 Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 405 410 415
 65 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430

ES 2 734 549 T3

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445
 5
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460
 10
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480
 15
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 43
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 44
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
 60 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctgaggaagg cctgtacaat 180
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
 65 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctca gtacagccac caaggacacc 300
 tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

ES 2 734 549 T3

5 <210> 45
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 45
 10 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 15 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25
 20 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 25 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 30 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 35 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 40 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 45 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 50 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 55 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 60 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 65 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 70 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 75 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 80 Leu Ser Leu Gly Lys Met
 225 230

<210> 46
 <211> 690
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 46
 gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgccttgccc ccgagttcct gggcggaccc 60
 agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag 120
 10
 gtgacctgtg tgggtggtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac 180
 gtggacggcg tggaggtgca caacgccaaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240
 15
 acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300
 tacaagtgta aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360
 gccaagggcc agcctcggga gccccagggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg 420
 20
 accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggtt tctaccccag cgacatcgcc 480
 gtggagtggg agagcaacgg ccagcccagag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 540
 25
 gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 600
 gagggcaacg tcttttagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcaaacca ctacaccag 660
 30
 aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 690

<210> 47
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35
 <400> 47
 Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
 40 1 5 10 15
 Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 45 20 25 30
 Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 50 35 40 45
 Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 55 50 55 60
 Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
 60 65 70 75 80
 Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
 65 85 90 95
 Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
 70 100 105 110
 Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
 75 115 120 125

ES 2 734 549 T3

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
 130 135 140
 5 Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
 145 150 155 160
 10 Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
 165 170 175
 15 Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
 180 185 190
 20 Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
 195 200 205
 25 Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
 210 215 220
 30 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 35 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
 245 250 255
 40 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
 260 265 270
 45 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
 275 280

<210> 48
 <211> 847
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 aggtggccc aaagtcccaa ggcccaggca tctagtgttc ctactgcaca gcccaggca 60
 50 gaaggcagcc tagccaaagc tactactgca cctgccacta cgcgcaatac tggccgtggc 120
 ggggaggaga agaaaaagga gaaagagaaa gaagaacagg aagagagggg gaccaagacc 180
 cctgaatgtc catccatac ccagccgctg ggcgtctatc tcttgactcc cgcagtacag 240
 55 gacttgtggc ttagagataa ggccaccttt acatgtttcg tcgtgggctc tgacctgaag 300
 gatgcccatt tgacttggga ggttgccgga aaggtaccca cagggggggg tgaggaaggg 360
 60 ttgctggagc gccattccaa tggctctcag agccagcact caagactcac cttccgaga 420
 tccctgtgga acgccgggac ctctgtcaca tgtactctaa atcatcctag cctgccccca 480
 cagcgtctga tggcccttag agagccagcc gccaggcac cagttaagct tagcctgaat 540
 65 ctgctcgcca gtagtgatcc cccagaggcc gccagctggc tcttatgcga agtgtccggc 600
 tttagcccgc ccaacatctt gctcatgtgg ctggaggacc agcgagaagt gaacaccagc 660

ggcttcgctc cagcccggcc cccaccccag ccgggttcta ccacattctg ggcctggagt 720
 5 gtcttaaggg tcccagcacc acctagcccc cagccagcca catacacctg tgttggtgcc 780
 catgaagata gcaggaccct gctaaatgct tctaggagtc tggaggtttc ctacgtgact 840
 gaccatt 847
 10 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 20 <400> 49
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 25 <210> 50
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
 sintético"
 35 <400> 50
 ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc 30
 40 <210> 51
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 50 <400> 51
 Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
 1 5 10 15
 55 Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
 20 25 30
 60 Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
 35 40 45
 65 <210> 52
 <211> 123
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

5
 <400> 52
 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc cgcgccccc 60
 gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
 10 tcc 123

<210> 53
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)..(30)
 <223> /sustituir=" "

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(30)
 <223> /nota="Residuos variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(30)
 <223> /nota="Esta secuencia puede comprender 1-6 unidades de repetición "Gly Gly Gly Gly Ser"

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(30)
 <223> /nota="Véase la memoria tal como se presenta para la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

40

<400> 53
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 50 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 55 20 25 30

<210> 54
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

65

<400> 54

atggcctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga 60
ccc 63

5
<210> 55
<211> 135
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

15
<400> 55
accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgcca ccatcgctc gcagcccctg 60
tcctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gggggggctg 120
20
gacttcgctt gtgat 135

25
<210> 56
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35
<400> 56
atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggtcc ttctcctgctc actggtatc 60
accctttact gc 72

40
<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

50
<400> 57
Tyr Asn Ser Ala Leu
1 5

55
<210> 58
<211> 486
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

65
<400> 58
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 734 549 T3

5 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 10 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 50 55 60
 15 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 20 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90
 25 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 30 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
 115 120 125
 35 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 130 135 140
 40 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
 145 150 155 160
 45 Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175
 50 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
 180 185 190
 55 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 195 200 205
 60 Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
 210 215
 65 Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 70 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro
 260 265 270
 75 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu
 275 280 285

ES 2 734 549 T3

5 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp
 290 295 300

10 Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly
 305 310 315 320

15 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg
 325 330 335

20 Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln
 340 345 350

25 Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365

30 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 370 375 380

35 Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 385 390 395 400

40 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 405 410 415

45 Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430

50 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445

55 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460

60 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480

65 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

65 <210> 59
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

65 <400> 59
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

ES 2 734 549 T3

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 5
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 10
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 15
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 20
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 25
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu
 115 120 125
 30
 Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys
 130 135 140
 35
 Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
 145 150 155 160
 40
 Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser
 165 170 175
 45
 Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile
 180 185 190
 50
 Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln
 195 200 205
 55
 Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
 210 215 220
 60
 Ser Ser
 65
 <210> 60
 <211> 126
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

5 <400> 60
 aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
 10 gaactg 126

<210> 61
 <211> 813
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 20 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

25 <400> 61
 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca 120
 30 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180
 cccggacagg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300
 35 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
 cagggcacca agctcgagat taaagggtgga ggtggcagcg gaggagggtg gtccggcggt 420
 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480
 40 ctttactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacgggggt gtcttggatc 540
 agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600
 45 tactactctt catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660
 gtgtactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720
 cactactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtag tctggtcacc 780
 50 gtgtccagcc accaccatca tcaccatcac cat 813

<210> 62
 <211> 813
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 60 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

65 <400> 62
 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca 120

accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180
 5 cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcaactatcag ctcaactgcag 300
 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
 10 cagggcacca agctcgagat taaagggtgga ggtggcagcg gaggagggtg gtccggcggt 420
 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480
 ctttcaactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttggatc 540
 15 agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600
 tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660
 20 gtgtcaactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720
 cactactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtag tctggtcacc 780
 25 gtgtccagcc accacatca tcacatcac cat 813

 <210> 63
 <211> 813
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
 35 sintético"

 <400> 63
 40 atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60
 ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctgggtga agccatctga gactctgtcc 120
 ctcaacttga ccgtgagcgg agtggtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
 45 cctcccggaa agggactgga gtggatcggg gtgatttggg gtagcgaac cacttactat 240
 tcatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
 ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
 50 tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
 tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480
 55 acccagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgtcgg 540
 gcatcacaag atatctcaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggccct 600
 60 aggcttctta tctaccacac ctctcgcctg catagcggga tccccgacg ctttagcggg 660
 tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720
 gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780
 65 gagatcaaac atcaccacca tcatcaccat cac 813

 <210> 64

<211> 813
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

10 <400> 64
 atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg cactggctc tgctgctca cgccgctcgc 60
 ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120
 15 ctcaacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
 cctcccggaa agggactgga gtggatcggg gtgatttggg gtagcgaac cacttactat 240
 20 caatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
 ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
 tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
 25 tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480
 acccagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgtcgg 540
 30 gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggcccct 600
 aggcttctta tctaccacac ctctgcctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg 660
 tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720
 35 gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780
 gagatcaaac atcaccacca tcatcaccat cac 813

40 <210> 65
 <211> 828
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

50 <400> 65
 atggccctcc cagtgaccgc tctgctgctg cctctcgcac ttcttctcca tgccgctcgg 60
 cctgagatcg tcatgaccca aagccccgct accctgtccc tgtcaccgg cgagagggca 120
 55 accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180
 ccagggcagg ctctctgcct gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggatcccc 240
 60 gccagatttt ccgggagcgg gtctggaacc gactacacc tcaccatctc ttctctgcag 300
 cccgaggatt tcgccgtcta tttctgccag caggggaata ctctgccgta caccttcggt 360
 caaggtacca agctggaaat caagggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420
 65 ggtggctccg gaggaggagg ttcccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480
 aagccatcag aaaccctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540

5 ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggctctg aatggattgg ggtgatttgg 600
 ggatcagaga ctacttacta ctcttcatca cttaagtcac gggtcacat cagcaaagat 660
 aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcatctgtga ccgccgctga caccgccgtg 720
 tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggctctatg ctatggacta ctggggacag 780
 10 gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

15 <210> 66
 <211> 828
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

25 <400> 66
 atggccctcc cagtgaccgc tctgctgctg cctctcgac ttcttctcca tgccgctcgg 60
 cctgagatcg tcatgaccca aagccccgct accctgtccc tgcacccgg cgagagggca 120
 accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180
 30 ccagggcagg ctctctgcct gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggatcccc 240
 gccagatttt ccgggagcgg gtctggaacc gactacacc tcaccatctc ttctctgcag 300
 cccgaggatt tcgccgtcta tttctgccag caggggaata ctctgccgta caccttcggt 360
 35 caaggtacca agctggaaat caagggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420
 ggtggctccg gaggaggagg ttccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480
 40 aagccatcag aaaccctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540
 ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggctctg aatggattgg ggtgatttgg 600
 45 ggatcagaga ctacttacta ccagtcatca cttaagtcac gggtcacat cagcaaagat 660
 aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcatctgtga ccgccgctga caccgccgtg 720
 tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggctctatg ctatggacta ctggggacag 780
 50 gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

55 <210> 67
 <211> 828
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

65 <400> 67
 atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg 60
 cccaagtcc agctgcaaga gtcaggaccc ggactggtga agccgtctga gactctctca 120
 ctgacttcta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gactgtcatg gatccgcaa 180

	cctcccggga aagggcttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac	240
5	tcactcttccc tgaagtccag ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc	300
	cttaagctgt catctgtgac cgctgctgac accgccgtgt attactgctc caagcactac	360
	tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc	420
10	agcggcggtg gagggctctgg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg	480
	agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcaccgg cgagagagca	540
15	accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcaaaaa	600
	ccggggcagg cccctcgcct cctgatctac catacctcac gccttctc tggtatcccc	660
	gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag	720
20	ccagaagatt tcgcagtgta tttctgccag cagggcaata cccttcctta caccttcggt	780
	cagggaaacca agctcgaaat caagcaccat caccatcatc accacat	828
25	<210> 68 <211> 828 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"	
35	<400> 68 atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg	60
40	ccccaaagtcc agctgcaaga gtcaggaccg ggactggtga agccgtctga gactctctca	120
	ctgacttgta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgcatg gatccgcca	180
	cctcccggga aagggcttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac	240
45	cagtcttccc tgaagtccag ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc	300
	cttaagctgt catctgtgac cgctgctgac accgccgtgt attactgctc caagcactac	360
	tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc	420
50	agcggcggtg gagggctctgg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggaggg	480
	agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcaccgg cgagagagca	540
55	accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcaaaaa	600
	ccggggcagg cccctcgcct cctgatctac catacctcac gccttctc tggtatcccc	660
	gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag	720
60	ccagaagatt tcgcagtgta tttctgccag cagggcaata cccttcctta caccttcggt	780
	cagggaaacca agctcgaaat caagcaccat caccatcatc atcaccac	828
65	<210> 69 <211> 828 <212> ADN	

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 69

10 atggcctcc cagtgaccgc tctgctgctg cctctcgcac ttcttctcca tgccgctcgg 60
 cctgagatcg tcatgacca aagccccgct accctgtccc tgtcaccg cgagagggca 120
 accctttcat gcagggccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcagaag 180
 15 ccagggcagg ctctctgcct gctgatctac cacaccagcc gcctccacag cggtatcccc 240
 gccagatfff ccgggagcgg gtctggaacc gactacacc tcaccatctc ttctctgcag 300
 20 cccgaggatt tcgccgtcta tttctgccag caggggaata ctctgccgta caccttcggt 360
 caaggtacca agctggaaat caagggaggc ggaggatcag gcggtggcgg aagcggagga 420
 ggtggctccg gaggaggagg ttcccaagtg cagcttcaag aatcaggacc cggacttgtg 480
 25 aagccatcag aaaccctctc cctgacttgt accgtgtccg gtgtgagcct ccccgactac 540
 ggagtctctt ggattcgcca gcctccgggg aagggcttg aatggattgg ggtgatttgg 600
 30 ggatcagaga ctacttacta caattcatca cttaagtcac gggtcacat cagcaaagat 660
 aatagcaaga accaagtgtc acttaagctg tcatctgtga ccgccgctga caccgccgtg 720
 tactattgtg ccaaacatta ctattacgga gggcttatg ctatggacta ctggggacag 780
 35 gggaccctgg tgactgtctc tagccatcac catcaccacc atcatcac 828

<210> 70

<211> 828

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

45 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 70

50 atggcactgc ctgtcactgc cctcctgctg cctctggccc tccttctgca tgccgccagg 60
 cccaagtcc agctgcaaga gtcaggacc ggactggtga agccgtctga gactctctca 120
 55 ctgacttcta ccgtcagcgg cgtgtccctc cccgactacg gagtgtcatg gatccgcaa 180
 cctcccggga aagggcttga atggattggt gtcactctggg gttctgaaac cacctactac 240
 aactcttccc tgaagtccag ggtgaccatc agcaaggata attccaagaa ccaggtcagc 300
 60 cttaagctgt catctgtgac cgctgtgac accgccgtgt attactgagc caagcactac 360
 tattacggag gaagctacgc tatggactat tggggacagg gcactctcgt gactgtgagc 420
 65 agcggcggtg gagggctctg aggtggagga tccggtggtg gtgggtcagg cggaggagg 480
 agcgagattg tgatgactca gtcaccagcc accctttctc tttcaccg cgagagagca 540

accctgagct gtagagccag ccaggacatt tctaagtacc tcaactggta tcagcaaaaa 600
 ccggggcagg cccctcgct cctgatctac catacctcac gccttcactc tggtatcccc 660
 5 gctcggttta gcggatcagg atctggtacc gactacactc tgaccatttc cagcctgcag 720
 ccagaagatt tcgcagtgt tttctgccag cagggcaata cccttcctta caccttcggt 780
 10 cagggaaacca agctcgaaat caagcacat caccatcatc accacat 828

 <210> 71
 <211> 813
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
 20 sintético"

 <400> 71
 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 25 cccgaaattg tgatgaccac gtcaccgcc actcttagcc tttcaccggt tgagcgcgca 120
 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180
 30 cccggacagg ctctcgctt tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300
 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
 35 cagggcacca agctcgagat taaagggtga ggtggcagcg gaggagggtg gtccggcggg 420
 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480
 ctttactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacgggggt gtcttgatc 540
 40 agacagccac cggggaagg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600
 tactacaatt catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660
 45 gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720
 cttactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780
 50 gtgtccagcc accacatca tcaccatcac cat 813

 <210> 72
 <211> 813
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
 60 sintético"

 <400> 72
 atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60
 65 ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120
 ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180

cctcccggaa agggactgga gtggatcggg gtgatttggg gtagcgaac cacttactat 240
 aactcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
 5 ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
 tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
 tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480
 10 acccagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttgtcgg 540
 gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggcccct 600
 15 aggcttctta tctaccacac ctctcgctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg 660
 tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720
 gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780
 20 gagatcaaac atcaccacca tcatcaccat cac 813

<210> 73
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 73
 35 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 40 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 45 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 50 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 55 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 60 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 65 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 70 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 75 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 130 135 140

5 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 145 150 155 160

10 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175

15 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190

20 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys Ser
 195 200 205

25 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220

30 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240

35 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255

40 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His
 260 265 270

35 <210> 74
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

45 <400> 74
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

50 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30

55 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45

60 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

65 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80

65 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110

5 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 130 135 140

15 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 145 150 155 160

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175

20 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190

25 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys Ser
 195 200 205

30 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220

35 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240

40 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His
 260 265 270

45 <210> 75
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

55 <400> 75
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

60 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30

65 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
 35 40 45

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

ES 2 734 549 T3

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30
 5 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
 35 40 45
 10 Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 15 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 20 Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys
 85 90
 25 Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 30 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
 115 120 125
 35 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 40 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
 145 150 155 160
 45 Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 165 170 175
 50 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
 180 185 190
 55 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
 195 200 205
 60 Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 65 Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 225 230 235 240
 Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
 245 250 255
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His His His His
 260 265 270
 <210> 77
 <211> 276
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 77

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

ES 2 734 549 T3

Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln
 195 200 205
 5 Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
 210 215 220
 10 Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 225 230 235 240
 15 Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp
 245 250 255
 20 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His
 260 265 270
 His His His His
 275
 25 <210> 79
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 35 <400> 79
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 40 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30
 45 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
 35 40 45
 50 Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 55 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 60 Ser Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys
 85 90 95
 65 Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

Gln Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys
 85 90 95
 5 Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 10 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
 115 120 125
 15 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 20 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 25 Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 165 170 175
 30 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys
 180 185 190
 35 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 195 200 205
 40 Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 210 215 220
 45 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 225 230 235 240
 50 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 55 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His
 260 265 270
 60 His His His His
 275
 <210> 81
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 81
 65 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu

ES 2 734 549 T3

	20		25		30											
5	Ser	Leu	Ser ₃₅	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala ₄₀	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg ₄₅	Ala	Ser	Gln
10	Asp	Ile ₅₀	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asn ₅₅	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys ₆₀	Pro	Gly	Gln	Ala
15	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr ₇₀	His	Thr	Ser	Arg	Leu ₇₅	His	Ser	Gly	Ile	Pro ₈₀
20	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly ₈₅	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr ₉₀	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr ₉₅	Ile
25	Ser	Ser	Leu	Gln ₁₀₀	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala ₁₀₅	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln ₁₁₀	Gln	Gly
30	Asn	Thr	Leu ₁₁₅	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly ₁₂₀	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu ₁₂₅	Glu	Ile	Lys
35	Gly	Gly ₁₃₀	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly ₁₃₅	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly ₁₄₀	Gly	Gly	Ser	Gly
40	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val ₁₅₀	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser ₁₅₅	Gly	Pro	Gly	Leu	Val ₁₆₀
45	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr ₁₆₅	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys ₁₇₀	Thr	Val	Ser	Gly	Val ₁₇₅	Ser
50	Leu	Pro	Asp	Tyr ₁₈₀	Gly	Val	Ser	Trp	Ile ₁₈₅	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly ₁₉₀	Lys	Gly
55	Leu	Glu	Trp ₁₉₅	Ile	Gly	Val	Ile	Trp ₂₀₀	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr ₂₀₅	Tyr	Tyr	Asn
60	Ser	Ser ₂₁₀	Leu	Lys	Ser	Arg	Val ₂₁₅	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp ₂₂₀	Asn	Ser	Lys	Asn
65	Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Leu ₂₃₀	Ser	Ser	Val	Thr	Ala ₂₃₅	Ala	Asp	Thr	Ala	Val ₂₄₀
70	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys ₂₄₅	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly ₂₅₀	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met ₂₅₅	Asp
75	Tyr	Trp	Gly	Gln ₂₆₀	Gly	Thr	Leu	Val	Thr ₂₆₅	Val	Ser	Ser	His	His ₂₇₀	His	His
80	His	His	His ₂₇₅	His												

<210> 82

<211> 276
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 82
 10 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 15 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25
 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
 30 35
 Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 40 45
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
 50 55
 Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys
 60 65
 Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 70 75
 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
 80 85
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 90 95
 Gly ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 100 105
 110 Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 115 120
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys
 125 130
 Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 135 140
 145 Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 150 155
 160 Gly ser Gly ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile ser ser Leu Gln
 165 170
 175 180
 185 190
 195 200
 205 210
 215 220
 225 230
 235 240

ES 2 734 549 T3

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 5 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His
 260 265 270
 10 His His His His
 275
 <210> 83
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 83
 25 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 30 His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 35 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40
 40 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 45 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 50 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 55 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110
 60 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125
 65 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 130 135 140
 70 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr
 145 150 155 160
 75 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190
 5 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser
 195 200 205
 10 Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 210 215 220
 15 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 20 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His
 260 265 270
 25 <210> 84
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 35 <400> 84
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 40 His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu
 20 25 30
 45 Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val
 35 40 45
 50 Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 55 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 60 Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys
 85 90 95
 65 Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met
 115 120 125
 70 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

5 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met
145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
165 170 175

10 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
180 185 190

15 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser
195 200 205

20 Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
210 215 220

25 Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
225 230 235 240

30 Val Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
245 250 255

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His His His His His His His
260 265 270

35 <210> 85
<211> 1458
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
sintético"

45 <400> 85
atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcaccggt tgagcgcgca 120
50 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180
cccggacagg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300
55 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgccta cacctttgga 360
cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggt 420
60 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480
ctttactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacgggt gtcttgatc 540
agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600
65 tactactctt catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660
gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720

ES 2 734 549 T3

cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780
 5 gtgtccagca ccaactacccc agcaccgagg ccaccacccc cggctcctac catcgcctcc 840
 cagcctctgt ccctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900
 cggggctctg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg 960
 10 gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020
 tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
 tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140
 15 agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
 ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggacc agaaatgggc 1260
 20 gggaaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320
 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac 1380
 25 gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440
 caggccctgc cgctcgg 1458

30 <210> 86
 <211> 1458
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

40 <400> 86
 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 cccgaaattg tgatgaccca gtcaccgcc actcttagcc tttcaccgg tgagcgcgca 120
 45 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattgga tcaacagaag 180
 cccggacagg ctctcgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300
 50 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
 cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggt 420
 55 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480
 ctttactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggt gtcttgatc 540
 agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600
 60 tactaccaat catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660
 gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacacc ccgtgtacta ttgcgctaag 720
 65 cattactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtac tctggtcacc 780
 gtgtccagca ccaactacccc agcaccgagg ccaccacccc cggctcctac catcgcctcc 840
 cagcctctgt ccctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900

5 cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg 960
 gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020
 tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
 tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140
 10 agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
 ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggacct agaaatgggc 1260
 gggagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320
 15 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac 1380
 gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcatatg 1440
 20 caggccctgc cgcctcgg 1458

25 <210> 87
 <211> 1458
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

35 <400> 87
 atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60
 ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120
 ctcaattgca ccgtgagcgg agtgctcctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
 40 cctcccggaa agggactgga gtggatcggg gtgatttggg gtagcgaac cacttactat 240
 tcatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
 ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
 45 tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
 tctggtggag gaggtagcgg aggagggcgg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480
 50 acccagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccgggggaac gggctaccct ttcttgtcgg 540
 gcatcacaag atatctcaaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggcccct 600
 aggcttctta tctaccacac ctctcgcctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg 660
 55 tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720
 gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780
 60 gagatcaaaa ccaactactc cgctccaagg ccaccaccc ctgccccgac catcgcctct 840
 cagccgcttt ccctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900
 65 cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg 960
 gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020
 tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080

tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140
 5 agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
 ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260
 gggaaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320
 10 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac 1380
 gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcatatg 1440
 caggccctgc cgcctcgg 1458
 15
 <210> 88
 <211> 1458
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
 25 sintético"

 <400> 88
 atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60
 30 ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120
 ctcaacttga ccgtgagcgg agtgctcctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
 35 cctcccggaa agggactgga gtggatcggg gtgatttggg gtagcgaac cacttactat 240
 caatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
 ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
 40 tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
 tctggtggag gaggtagcgg aggagggcgg agcgggtggag gtggctccga aatcgtgatg 480
 45 acccagagcc ctgcaaccct gtccctttct cccggggaac gggctaccct ttcttctcgg 540
 gcatcacaag atatctcaa atacctcaat tggatcaac agaagccggg acaggcccct 600
 aggcttctta tctaccacac ctctcgcctg catagcggga ttcccgcacg ctttagcggg 660
 50 tctggaagcg ggaccgacta cactctgacc atctcatctc tccagcccga ggacttcgcc 720
 gtctacttct gccagcaggg taacaccctg ccgtacacct tcggccaggg caccaagctt 780
 gagatcaaaa ccaactactc cgctccaagg ccaccaccc ctgccccgac catcgcctct 840
 55 cagccgcttt ccctgcgtcc ggaggcatgt agaccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900
 cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg 960
 60 gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020
 tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
 65 tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140
 agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
 ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggaccc agaaatgggc 1260

5 ggggaagccgc gcagaaagaa tccccaagag ggcctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320
 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac 1380
 gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcacatg 1440
 caggccctgc cgcctcgg 1458
 10 <210> 89
 <211> 1473
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
 sintético"
 20 <400> 89
 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 25 cccgaaattg tgatgacca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca 120
 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180
 cccggacagg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
 30 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacacc tcactatcag ctactgcag 300
 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
 35 cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggt 420
 ggaggaagcg gcggaggcgg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctttgtg 480
 aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac 540
 40 ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggctctgg aatggattgg agtgatttgg 600
 ggctctgaga ctacttacta ctcttcatcc ctcaagtcac gcgtcacat ctcaaaggac 660
 45 aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcatctgtga ccgagccga caccgccgtg 720
 tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag 780
 ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccgct 840
 50 cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900
 ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg 960
 55 gctggtactt gcggggctct gctgctttca ctcttgatca ctctttactg taagcgcggt 1020
 cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa 1080
 gaggaggacg gctgttcatg ccggttcca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcbc 1140
 60 gtgaaattca gccgcagcgc agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200
 aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260
 65 gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag 1320
 ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
 agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440

gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

5 <210> 90
 <211> 1473
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

15 <400> 90
 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 cccgaaattg tgatgacca gtcacccgcc actcttagcc tttcaccggt tgagcgcgca 120
 20 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180
 cccggacagg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
 gccaggttca gcggtagcgg atctgaggacc gactacaccc tctactatcag ctactgcag 300
 25 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caagggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
 cagggcacca agctcgagat taaagggtgga ggtggcagcg gaggagggtg gtccggcggt 420
 30 ggaggaagcg gaggcggagg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctctgtg 480
 aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac 540
 ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggctctg aatggattgg agtgatttgg 600
 35 ggctctgaga ctacttacta ccaatcatcc ctcaagtcac gcgtcacat ctcaaaggac 660
 aactctaaga atcagggtgc actgaaactg tcatctgtga ccgagccga caccgccgtg 720
 40 tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag 780
 ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgccggt 840
 cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt 900
 45 ggggccgtgc ataccggggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg 960
 gctggtactt gcggggctct gctgctttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcggt 1020
 50 cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa 1080
 gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcbc 1140
 gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200
 55 aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260
 gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagaggcct gtacaacgag 1320
 60 ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtagaaagg ggaacgcaga 1380
 agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccacaa ggacacctat 1440
 gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

65 <210> 91
 <211> 1473

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 91

10	atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgctcgc	60
	ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctgggtga agccatctga gactctgtcc	120
	ctcacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag	180
15	cctcccggaa agggactgga gtggatcggg gtgatttggg gtagcgaac cacttactat	240
	tcatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc	300
20	ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac	360
	tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca	420
	tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccgg aggtggcggg	480
25	agcgaatcg tgatgacca gagccctgca accctgtccc tttctcccgg ggaacgggct	540
	accctttctt gtcgggcatc acaagatata tcaaaatacc tcaattggta tcaacagaag	600
30	ccgggacagg cccctaggct tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc	660
	gcacgcttta gcgggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag	720
	cccgaggact tcgccgtcta cttctgccag cagggtaaca ccctgccgta caccttcggc	780
35	cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccgtc caaggccacc caccctgcc	840
	ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt	900
40	ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg	960
	gctggtactt gcggggctct gctgctttca ctcgtgatca ctctttactg taagcgcggt	1020
	cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggctgtgca gactactcaa	1080
45	gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcdc	1140
	gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac	1200
50	aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg	1260
	gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatcccc aagagggcct gtacaacgag	1320
	ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga	1380
55	agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat	1440
	gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg	1473

60 <210> 92
<211> 1473
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 92

5 atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg ccaactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60
 ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120
 10 ctcaacttga ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
 cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaaac cacttactat 240
 caatcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
 15 ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
 tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggt cactgtgtca 420
 tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccgg aggcggtggg 480
 20 tcagaaatcg tgatgacca gagccctgca accctgtccc tttctcccgg ggaacgggct 540
 accctttctt gtcgggcatc acaagatata tcaaataacc tcaattggta tcaacagaag 600
 25 ccgggacagg ccctaggct tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc 660
 gcacgcttta gcgggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag 720
 cccgaggact tcgccgtcta cttctgccag cagggttaaca ccctgccgta caccttcggc 780
 30 cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccgtc caaggccacc caccctgcc 840
 ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgagctggt 900
 35 ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg 960
 gctggtactt gcggggctct gctgctttca ctctgtatca ctctttactg taagcgcggt 1020
 cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa 1080
 40 gaggaggacg gctgttcatg ccggttcca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcgc 1140
 gtgaaattca gccgcagcgc agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200
 45 aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260
 gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatccc aagaggcct gtacaacgag 1320
 ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
 50 agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440
 gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 93

<211> 1473

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 93

atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60

	cccgaaattg tgatgacca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca	120
	accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
5	cccggacagg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240
	gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcactatcag ctactgcag	300
10	ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caagggaaaca ccctgcccta cacctttgga	360
	cagggcacca agctcgagat taaaggtgga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg	420
	ggaggaagcg gaggcggtgg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctctgtg	480
15	aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac	540
	ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggctctgg aatggattgg agtgatttgg	600
20	ggctctgaga ctacttacta caactcatcc ctcaagtcac gcgtcacat ctcaaaggac	660
	aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcatctgtga ccgcagccga caccgccgtg	720
	tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag	780
25	ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgggct	840
	cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggt	900
30	ggggccgtgc atacccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacatttg ggcccctctg	960
	gctgggtactt gcggggctct gctgctttca ctctgtgatca ctctttactg taagcgcggg	1020
	cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa	1080
35	gaggaggacg gctgttcatg ccggttccca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcbc	1140
	gtgaaattca gccgcagcgc agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac	1200
40	aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg	1260
	gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatccc aagagggcct gtacaacgag	1320
	ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga	1380
45	agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat	1440
	gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg	1473
50	<210> 94 <211> 1473 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"	
60	<400> 94 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg	60
	cccgaaattg tgatgacca gtcacccgcc actcttagcc tttcacccgg tgagcgcgca	120
65	accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag	180
	cccggacagg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct	240

gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tcactatcag ctactgcag 300
 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggaaca ccctgcccta cacctttgga 360
 5 cagggcacca agctcgagat taaagggtga ggtggcagcg gaggaggtgg gtccggcggg 420
 ggaggaagcg gaggcggtgg gagccaggtc caactccaag aaagcggacc gggctctgtg 480
 aagccatcag aaactctttc actgacttgt actgtgagcg gagtgtctct ccccgattac 540
 10 ggggtgtctt ggatcagaca gccaccgggg aagggctctgg aatggattgg agtgatttgg 600
 ggctctgaga ctacttacta caactcatcc ctcaagtcac gcgtcacat ctcaaaggac 660
 15 aactctaaga atcaggtgtc actgaaactg tcatctgtga ccgagccga caccgccgtg 720
 tactattgcg ctaagcatta ctattatggc gggagctacg caatggatta ctggggacag 780
 ggtactctgg tcaccgtgtc cagcaccact accccagcac cgaggccacc caccgggct 840
 20 cctaccatcg cctcccagcc tctgtccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggg 900
 ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacattg gggccctctg 960
 25 gctgggtactt gcggggctct gctgctttca ctctgtgatca ctctttactg taagcgcggg 1020
 cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa 1080
 gaggaggacg gctgttcatg ccggttcca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcbc 1140
 30 gtgaaattca gccgcagcg agatgtcca gcctacaagc aggggcagaa ccagctctac 1200
 aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260
 35 gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatccc aagagggcct gtacaacgag 1320
 ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
 agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440
 40 gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

45 <210> 95
 <211> 1473
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

55 <400> 95
 atggctctgc ccgtgaccgc actcctcctg cactggctc tgctgcttca cgccgctcgc 60
 ccacaagtcc agcttcaaga atcagggcct ggtctggtga agccatctga gactctgtcc 120
 60 ctacttgca ccgtgagcgg agtgtccctc ccagactacg gagtgagctg gattagacag 180
 cctcccggaa agggactgga gtggatcgga gtgatttggg gtagcgaac cacttactat 240
 aactcttccc tgaagtcacg ggtcaccatt tcaaaggata actcaaagaa tcaagtgagc 300
 65 ctcaagctct catcagtcac cgccgctgac accgccgtgt attactgtgc caagcattac 360
 tactatggag ggtcctacgc catggactac tggggccagg gaactctggg cactgtgtca 420

tctggtggag gaggtagcgg aggaggcggg agcgggtggag gtggctccgg aggtggcggg 480
 agcgaatcg tgatgaccca gagccctgca accctgtccc tttctcccgg ggaacgggct 540
 5 accctttctt gtcgggcatc acaagatatc tcaaaatacc tcaattggta tcaacagaag 600
 ccgggacagg cccctaggct tcttatctac cacacctctc gcctgcatag cgggattccc 660
 gcacgcttta gcgggtctgg aagcgggacc gactacactc tgaccatctc atctctccag 720
 10 cccgaggact tcgccgtcta cttctgccag cagggttaaca ccctgccgta caccttcggc 780
 cagggcacca agcttgagat caaaaccact actcccgtc caaggccacc caccctgcc 840
 15 ccgaccatcg cctctcagcc gctttccctg cgtccggagg catgtagacc cgcagctggg 900
 ggggccgtgc ataccgggg tcttgacttc gcctgcgata tctacattg gggccctctg 960
 gctggtactt gcggggctct gctgctttca ctcgtgatca ctctttactg taagcgcggg 1020
 20 cggaagaagc tgctgtacat ctttaagcaa cccttcatga ggcctgtgca gactactcaa 1080
 gaggaggacg gctgttcatg ccggttcca gaggaggagg aaggcggctg cgaactgcbc 1140
 25 gtgaaattca gccgcagcgc agatgctcca gcctacaagc aggggagcaa ccagctctac 1200
 aacgaactca atcttggtcg gagagaggag tacgacgtgc tggacaagcg gagaggacgg 1260
 gaccagaaa tgggcgggaa gccgcgcaga aagaatccc aagaggcct gtacaacgag 1320
 30 ctccaaaagg ataagatggc agaagcctat agcgagattg gtatgaaagg ggaacgcaga 1380
 agaggcaaag gccacgacgg actgtaccag ggactcagca ccgccaccaa ggacacctat 1440
 35 gacgctcttc acatgcaggc cctgccgcct cgg 1473

<210> 96
 <211> 1458
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 45 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 96
 atggccctcc ctgtcaccgc cctgctgctt ccgctggctc ttctgctcca cgccgctcgg 60
 50 cccgaaattg tgatgaccca gtcacccgcc actcttagcc tttcaccgg tgagcgcgca 120
 accctgtctt gcagagcctc ccaagacatc tcaaaatacc ttaattggta tcaacagaag 180
 55 cccggacagg ctctctgcct tctgatctac cacaccagcc ggctccattc tggaatccct 240
 gccaggttca gcggtagcgg atctgggacc gactacaccc tctactatcag ctactgcag 300
 ccagaggact tcgctgtcta tttctgtcag caaggggaaca ccctgccta cacctttgga 360
 60 cagggcacca agctcgagat taaagggtga ggtggcagcg gaggagggtg gtccggcggg 420
 ggaggaagcc aggtccaact ccaagaaagc ggaccgggtc ttgtgaagcc atcagaaact 480
 65 ctttactga cttgtactgt gagcggagtg tctctccccg attacggggg gtcttgatc 540
 agacagccac cggggaaggg tctggaatgg attggagtga tttggggctc tgagactact 600

tactacaact catccctcaa gtcacgcgtc accatctcaa aggacaactc taagaatcag 660
 gtgtcactga aactgtcatc tgtgaccgca gccgacaccg ccgtgtacta ttgcgctaag 720
 5 cattaactatt atggcgggag ctacgcaatg gattactggg gacagggtag tctggtcacc 780
 gtgtccagca ccaactacccc agcaccgagg ccacccacccc cggctcctac catcgcctcc 840
 cagcctctgt ccctgcgtcc ggaggcatgt agacccgcag ctggtggggc cgtgcatacc 900
 10 cggggtcttg acttcgcctg cgatatctac atttgggccc ctctggctgg tacttgcggg 960
 gtcctgctgc tttcactcgt gatcactctt tactgtaagc gcggtcggaa gaagctgctg 1020
 15 tacatcttta agcaaccctt catgaggcct gtgcagacta ctcaagagga ggacggctgt 1080
 tcatgccggt tcccagagga ggaggaaggc ggctgcgaac tgcgcgtgaa attcagccgc 1140
 agcgcagatg ctccagccta caagcagggg cagaaccagc tctacaacga actcaatctt 1200
 20 ggtcggagag aggagtacga cgtgctggac aagcggagag gacgggacc agaaatgggc 1260
 ggaagccgc gcagaaagaa tcccgaagag ggctgtaca acgagctcca aaaggataag 1320
 25 atggcagaag cctatagcga gattggtatg aaaggggaac gcagaagagg caaaggccac 1380
 gacggactgt accagggact cagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc tcttcatatg 1440
 30 caggccctgc cgctcgg 1458

<210> 97
 <211> 813
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
 40 sintético"

<400> 97
 atggccctgc ccgtcaccgc tctgctgctg ccccttgctc tgcttcttca tgcagcaagg 60
 45 ccggacatcc agatgaccca aaccacctca tccctctctg cctctcttgg agacagggtg 120
 accatttctt gtcgcgccag ccaggacatc agcaagtatc tgaactggta tcagcagaag 180
 50 ccggacggaa ccgtgaagct cctgatctac catacctctc gcctgcatag cggcgtgccc 240
 tcacgcttct ctggaagcgg atcaggaacc gattattctc tcaactttc aaatcttgag 300
 caggaagata ttgccaccta tttctgccag cagggtaata ccctgccta caccttcgga 360
 55 ggagggacca agctcgaat caccggtgga ggaggcagc gcggtggagg gtctggtgga 420
 ggtggttctg aggtgaagct gcaagaatca ggccctggac ttgtggcccc ttcacagtcc 480
 60 ctgagcgtga cttgcaccgt gtccggagtc tccctgcccg actacggagt gtcattgatc 540
 agacaacctc cacggaaagg actggaatgg ctcggtgtca tctgggtag cgaaactact 600
 tactacaatt cagccctcaa aagcaggctg actattatca aggacaacag caagtcccaa 660
 65 gtctttctta agatgaactc actccagact gacgacaccg caatctacta ttgtgctaag 720
 cactactact acggaggatc ctacgctatg gattactggg gacaaggtac ttccgtcact 780

gtctcttcac accatcatca ccatcaccat cac

813

5 <210> 98
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15 <400> 98
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

20 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 20 25 30

25 Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45

30 Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 50 55 60

35 Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

40 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

45 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110

50 Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
 115 120 125

55 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 130 135 140

60 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
 145 150 155 160

65 Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly
 165 170 175

70 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
 180 185 190

75 Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 195 200 205

80 Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
 210 215 220

ES 2 734 549 T3

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
 225 230 235 240

5 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 245 250 255

10 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser His His His His His His His His
 260 265 270

15 <210> 99
 <211> 1458
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
 sintético"

25 <400> 99
 atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
 ccggacatcc agatgacaca gactacatcc tccctgtctg cctctctggg agacagagtc 120
 accatcagtt gcagggcaag tcaggacatt agtaaataatt taaattggta tcagcagaaa 180
 30 ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac catacatcaa gattacactc aggagtccca 240
 tcaaggttca gtggcagtggt gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300
 35 caagaagata ttgccactta cttttgcca cagggtaata cgcttccgta cacgttcgga 360
 gggggggacca agctggagat cacaggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
 ggcggatctg aggtgaaact gcaggagtca ggacctggcc tgggtggcgcc ctacagagc 480
 40 ctgtccgtca catgcactgt ctcaggggtc tcattaccg actatggtgt aagctggatt 540
 cgccagcctc cacgaaaggg tctggagtgg ctgggagtaa tatgggtag tgaaaccaca 600
 45 tactataatt cagctctcaa atccagactg accatcatca aggacaactc caagagccaa 660
 gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccatttacta ctgtgcaaaa 720
 cattattact acgggtgtag ctatgctatg gactactggg gccaaaggaac ctcagtcacc 780
 50 gtctcctcaa ccacgacgcc agcgcgcgca ccaccaaac cggcgccac catcgcgtcg 840
 cagcccctgt ccctgcgcc agaggcgtgc cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 900
 55 agggggctgg acttcgcctg tgatatctac atctgggctc ccttggccgg gacttgtggg 960
 gtccttctcc tgtcactggt tatcaccctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg 1020
 60 tatatattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1080
 agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg 1140
 agcgcagacg cccccgcgta caagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200
 65 ggacgaagag aggagtacga tgttttgac aagagacgtg gccgggacc tgagatggg 1260
 ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag 1320

atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1380
 gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg 1440
 5 caggccctgc ccctcgc 1458

 <210> 100
 <211> 1184
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
 sintético"

 <400> 100
 20 cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt 60
 tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120
 aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 180
 25 gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacggggt tgccgccaga acacaggtaa 240
 gtgccgtgtg tggttcccg cggcctggcc tctttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300
 gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360
 30 ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagcccctc gcctcgtgct tgagttgagg 420
 cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg gcacctcgc gcctgtctcg 480
 35 ctgctttcga taagtctcta gccatttaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt 540
 tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg 600
 gggccgcggg cggcgacggg gcccggtgct cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc 660
 40 tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720
 tgcctggcct cgcgccgccc tgtatcggcc cgccctgggc ggcaaggctg gccgggtcgg 780
 45 caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat 840
 ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct 900
 50 ttccgtctc agccgtcgt tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc 960
 tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020
 cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080
 55 tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttgatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140
 agacagtgg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgct gtga 1184

 60 <210> 101
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
 sintético"
 65

<400> 101
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60
5 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatggggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
10 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336

15
<210> 102
<211> 230
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25
<400> 102
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15
30
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30
35
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45
40
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60
45
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80
50
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95
55
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110
60
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125
65
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140
70
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160
75
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

5 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 10 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 15 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 20 Leu Ser Leu Gly Lys Met
 225 230
 25 <210> 103
 <211> 690
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"
 30 <400> 103
 gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcct gggcggaccc 60
 agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagccg gacccccgag 120
 35 gtgacctgtg tgggtggtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt caactggtac 180
 gtggacggcg tggaggtgca caacgccaag accaagcccc gggaggagca gttcaatagc 240
 acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 300
 40 tacaagtgta aggtgtccaa caagggcctg cccagcagca tcgagaaaac catcagcaag 360
 gccaagggcc agcctcggga gccccagggtg tacaccctgc cccctagcca agaggagatg 420
 45 accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggt tctaccccag cgacatcgcc 480
 gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 540
 gacagcgacg gcagcttctt cctgtacagc cggctgaccg tggacaagag ccggtggcag 600
 50 gagggaacg tctttagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgacacaacca ctacaccag 660
 aagagcctga gcctgtccct gggcaagatg 690
 55 <210> 104
 <211> 150
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"
 65 <400> 104
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

150

5 <210> 105
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(40)
 <223> /sustituir=" "

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(40)
 <223> /nota=" Residuos variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(40)
 <223> /nota="Esta secuencia puede comprender 1-10 unidades de repetición "Gly Gly Gly Ser"

30 <400> 105
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

35 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

40 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 35 40

45 <210> 106
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

55 <400> 106
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

60 Gly Gly Gly Ser
 20

65 <210> 107
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 107
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

10 <210> 108
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

20 <400> 108
 Gly Gly Gly Ser
 1

25 <210> 109
 <211> 5000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

35 <220>
 <221> > variación
 <222> (51)..(5000)
 <223> /sustituir=" "

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(5000)
 <223> /nota="Las bases variantes proporcionadas en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"

<400> 109
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 50 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240
 55 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
 60 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540
 65 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660

	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	720
5	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	780
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	840
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	900
10	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	960
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1020
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1080
15	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1140
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1200
20	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1260
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1320
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1380
25	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1440
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1500
30	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1560
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1620
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1680
35	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1740
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1800
40	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1860
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1920
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1980
45	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2040
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2100
50	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2160
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2220
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2280
55	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2340
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2400
60	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2460
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2520
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2580
65	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2640
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2700

	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2760
5	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2820
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2880
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2940
10	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3000
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3060
15	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3120
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3180
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3240
20	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3300
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3360
25	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3420
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3480
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3540
30	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3600
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3660
35	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3720
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3780
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3840
40	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3900
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3960
45	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4020
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4080
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4140
50	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4200
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4260
55	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4320
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4380
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4440
60	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4500
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4560
65	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4620
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4680
	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4740

```

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      4800
5  aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      4860
   aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      4920
   aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      4980
10  aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                             5000

<210> 110
<211> 100
15  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
20  <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
    sintético"

<400> 110
25  tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      60
    tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt                                             100

<210> 111
<211> 5000
30  <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
35  <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
    sintético"

40  <220>
    <221> > variación
    <222> (51)..(5000)
    <223> /sustituir=" "

45  <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (51)..(5000)
    <223> /nota="Las bases variantes proporcionados en la secuencia no tienen
50  preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"

<400> 111
    tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      60
    tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      120
55  tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      180
    tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      240
60  tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      300
    tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      360
    tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      420
65  tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      480
    tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      540

```

ES 2 734 549 T3

	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	600
5	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	660
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	720
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	780
10	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	840
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	900
15	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	960
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1020
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1080
20	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1140
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1200
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1260
25	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1320
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1380
30	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1440
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1500
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1560
35	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1620
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1680
40	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1740
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1800
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1860
45	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1920
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1980
50	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2040
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2100
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2160
55	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2220
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2280
60	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2340
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2400
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2460
65	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2520
	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2580


```

5      tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      4680
      tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      4740
      tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      4800
      tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      4860
10     tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      4920
      tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt      4980
      tttttttttt tttttttttt                                5000

<210> 112
<211> 5000
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
25 sintético"

<220>
<221> > variación
30 <222> (101)..(5000)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> MISC_FEATURE
35 <222> (101)..(5000)
<223> /nota="Las bases variantes proporcionadas en la secuencia no tienen
preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"

40 <400> 112
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      60
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      120
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      180
45     aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      240
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      300
50     aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      360
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      420
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      480
55     aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      540
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      600
60     aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      660
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      720
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      780
65     aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      840
      aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      900

```

	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	960
5	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1020
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1080
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1140
10	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1200
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1260
15	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1320
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1380
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1440
20	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1500
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1560
25	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1620
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1680
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1740
30	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1800
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1860
35	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1920
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1980
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2040
40	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2100
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2160
45	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2220
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2280
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2340
50	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2400
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2460
55	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2520
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2580
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2640
60	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2700
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2760
65	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2820
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2880
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2940

	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3000
5	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3060
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3120
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3180
10	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3240
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3300
15	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3360
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3420
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3480
20	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3540
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3600
25	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3660
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3720
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3780
30	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3840
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3900
35	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	3960
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4020
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4080
40	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4140
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4200
45	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4260
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4320
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4380
50	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4440
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4500
55	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4560
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4620
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4680
60	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4740
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4800
65	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4860
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4920
	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	4980

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

5000

5 <210> 113
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

15 <220>
 <221> > variación
 <222> (101)..(400)
 <223> /sustituir=" "

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (101)..(400)
 <223> /nota="Las bases variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes""

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(400)
 <223> /nota="Véase la memoria tal como se present para la descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

35 <400> 113
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
 40 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
 45 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 400

50 <210> 114
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

60 <400> 114
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 65 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

5 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Leu Lys
50 55 60

10 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

15 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

20 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

25 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 115
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

35 <400> 115
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

40 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

45 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

50 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Lys
50 55 60

55 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

60 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

65 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

70 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

75 <210> 116
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 5
 <400> 116
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 10 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20
 15 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 20 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Gln Ser Ser Leu Lys
 50 55 60
 25 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80
 30 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 35 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 40 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 117
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 117
 50 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 55 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 60 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 65 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 70 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10 <210> 118
 <211> 2000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

20 <220>
 <221> > variación
 <222> (51)..(2000)
 <223> /sustituir=" "

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(2000)
 <223> /nota="Las bases variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"

30 <400> 118
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

35 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 120
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240

40 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360

45 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 480
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540

50 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 600
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720

55 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840

60 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 960

65 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1020
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140

5 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380
 10 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
 15 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1620
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1680
 20 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 25 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1860
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1920
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
 30 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2000

35 <210> 119
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 40 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

45 <400> 119
 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30
 50 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45
 55 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60
 60 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80
 65 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95
 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala

ES 2 734 549 T3

	100					105					110					
5	Gln	Ile	Lys 115	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala 120	Glu	Leu	Arg	Val	Thr 125	Glu	Arg	Arg
10	Ala	Glu 130	Val	Pro	Thr	Ala	His 135	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro 140	Arg	Pro	Ala	Gly
15	Gln 145	Phe	Gln	Thr	Leu	Val 150	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala 155	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr 160
20	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile 165	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu 170	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu 175	Ala
25	Cys	Arg	Pro	Ala 180	Ala	Gly	Gly	Ala	Val 185	His	Thr	Arg	Gly	Leu 190	Asp	Phe
30	Ala	Cys	Asp 195	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala 200	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr 205	Cys	Gly	Val
35	Leu 210	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile 215	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys 220	Arg	Gly	Arg	Lys
40	Lys 225	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe 230	Lys	Gln	Pro	Phe	Met 235	Arg	Pro	Val	Gln	Thr 240
45	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp 245	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg 250	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu 255	Glu
50	Gly	Gly	Cys	Glu 260	Leu	Arg	Val	Lys	Phe 265	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp 270	Ala	Pro
55	Ala	Tyr	Lys 275	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln 280	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu 285	Asn	Leu	Gly
60	Arg	Arg 290	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val 295	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg 300	Gly	Arg	Asp	Pro
65	Glu 305	Met	Gly	Gly	Lys	Pro 310	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro 315	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr 320
70	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys 325	Asp	Lys	Met	Ala	Glu 330	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile 335	Gly
75	Met	Lys	Gly	Glu 340	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys 345	Gly	His	Asp	Gly	Leu 350	Tyr	Gln
80	Gly	Leu	Ser 355	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp 360	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu 365	His	Met	Gln
85	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg											

370

5 <210> 120
 <211> 1182
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

15 <400> 120
 atggccctcc ctgtcactgc cctgcttctc ccctcgcac tctgctcca cgccgctaga 60
 ccaccggat ggtttctgga ctctccggat cgcccgtaga atccccaac cttctcaccg 120
 gcactcttgg ttgtgactga gggcgataat gcgacctca cgtgctcgtt ctccaacacc 180
 20 tccgaatcat tcgtgctgaa ctggtaccgc atgagcccgt caaaccagac cgacaagctc 240
 gccgcgtttc cggaagatcg gtcgcaaccg ggacaggatt gtcggttccg cgtgactcaa 300
 25 ctgccgaatg gcagagactt ccacatgagc gtggtccgcg ctaggcgaaa cgactccggg 360
 acctacctgt gcggagccat ctcgctggcg cctaaggccc aatcaaaga gagcttgagg 420
 gccgaactga gaggaccga gcgcagagct gaggtgcaa ctgcacatcc atccccatcg 480
 30 cctcggcctg cggggcagtt tcagaccctg gtcacgacca ctccggcgcc gcgcccaccg 540
 actccggccc caactatcgc gagccagccc ctgtcgtgta ggccggaagc atgccgcctt 600
 35 gccgccggag gtgctgtgca taccgggga ttggacttcg catgcgacat ctacatttgg 660
 gctcctctcg ccggaacttg tggcgtgctc cttctgtccc tggatcac cctgtactgc 720
 aagcggggtc ggaaaagct tctgtacatt ttcaagcagc cttcatgag gcccgtagaa 780
 40 accaccagc aggaggacgg ttgctcctgc cggttccccg aagaggaaga aggaggttgc 840
 gagctgcgcg tgaagttctc ccggagcgcc gacgcccccg cctataagca gggccagaac 900
 45 cagctgtaca acgaactgaa cctgggacgg cgggaagagt acgatgtgct ggacaagcgg 960
 cgcgccggg accccgaaat gggcgggaag cctagaagaa agaaccctca ggaaggcctg 1020
 50 tataacgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctact ccgaaattgg gatgaaggga 1080
 gagcggcgga ggggaaagg gcacgacggc ctgtaccaag gactgtccac cgccaccaag 1140
 gacacatag atgccctgca catgcaggcc cttccccctc gc 1182

55 <210> 121
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

65 <400> 121
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

ES 2 734 549 T3

His Ala Ala Arg Pro Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro
 20 25 30
 5 Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly
 35 40 45
 10 Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe
 50 55 60
 15 Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu
 65 70 75 80
 20 Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe
 85 90 95
 25 Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val
 100 105 110
 30 Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser
 115 120 125
 35 Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg
 130 135 140
 40 Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser
 145 150 155 160
 45 Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Thr Thr Thr Pro Ala
 165 170 175
 50 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 180 185 190
 55 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 195 200 205
 60 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 210 215 220
 65 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 225 230 235 240
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 245 250 255
 70 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 260 265 270
 75 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 275 280 285

ES 2 734 549 T3

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 290 295 300
 5
 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 305 310 315
 10
 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 325 330 335
 15
 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 340 345
 20
 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 355 360
 25
 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 370 375 380
 30
 Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 385 390

REIVINDICACIONES

1. Dominio de unión anti-CD19 humanizado, en el que dicho dominio de unión anti-CD 19 humanizado comprende una secuencia de aminoácidos de un scFv seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.
2. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), en el que el CAR comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que incluye un dominio de unión anti-CD 19 humanizado, según la reivindicación 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular que comprende un dominio estimulador.
3. Molécula de ácido nucleico aislada, según la reivindicación 2, que comprende:
- (i) una secuencia de ácido nucleico de un dominio de unión anti-CD 19 humanizado de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas;
- (ii) un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de CAR de la SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con las mismas; y/o
- (iii) una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, o SEQ ID NO: 96, o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95% de identidad con las mismas.
4. Molécula de ácido nucleico aislada, según la reivindicación 2 o 3, en la que:
- (i) el CAR codificado incluye un dominio transmembrana que comprende un dominio transmembrana de una proteína seleccionada del grupo que consiste en la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 y CD154;
- (ii) el dominio de transmembrana codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15;
- (iii) el dominio transmembrana codificado comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- (iv) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio transmembrana comprende una secuencia de SEQ ID NO: 56, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma; y/o
- (v) el dominio de unión anti-CD19 codificado está conectado al dominio de transmembrana mediante una región bisagra, opcionalmente en el que:
- (a) la región de bisagra codificada comprende SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 102, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas; o
- (b) la secuencia de ácido nucleico que codifica la región bisagra comprende una secuencia de SEQ ID NO: 55, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.
5. Molécula de ácido nucleico aislada, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende además una secuencia que codifica un dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio coestimulador que es un dominio de señalización funcional obtenido a partir de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137), opcionalmente en la que:
- (i) el dominio coestimulador codificado comprende una secuencia de SEQ ID NO: 16;
- (ii) el dominio coestimulador codificado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, o una secuencia con un 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o
- (iii) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador comprende una secuencia de SEQ ID NO: 60, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma.
6. Molécula de ácido nucleico aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que:
- (i) el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización funcional de 4-1BB y/o un dominio de señalización funcional de CD3 zeta;
- (ii) el dominio de señalización intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 y/o la secuencia de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43;
- (iii) el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y/o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43;
- (iv) el dominio de señalización intracelular codificado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 y la secuencia de la SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 43, en el que las secuencias que comprenden el dominio de señalización intracelular se expresan en el mismo marco y como cadena polipeptídica única;

- (v) la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de señalización intracelular comprende una secuencia de SEQ ID NO: 60, o una secuencia con un 95-99% de identidad con la misma, y/o una secuencia de SEQ ID NO: 101 o la SEQ ID NO: 44, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas; y/o
- 5 (vi) dicha molécula de ácido nucleico aislada codifica además una secuencia líder, opcionalmente en el que la secuencia líder comprende la SEQ ID NO: 13, o una secuencia con un 95-99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
7. Molécula de polipéptido aislada codificada por la molécula de ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 2-6.
- 10 8. Molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) aislada que comprende un dominio de unión anti-CD19 humanizado, según la reivindicación 1, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular.
- 15 9. Molécula de CAR aislada, según la reivindicación 8, en la que:
 (i) dicho CAR es un CAR, según cualquiera de las reivindicaciones 2-7; o
 (ii) dicho CAR comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, o una secuencia con un 95-99% de identidad con las mismas.
- 20 10. Vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, opcionalmente en el que:
 (i) el vector se selecciona del grupo que consiste en un ADN, un ARN, un plásmido, un vector de lentivirus, un vector adenoviral o un vector de retrovirus;
 (ii) el vector comprende además un promotor, por ejemplo, un promotor EF-1 o un promotor EF-1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 100;
 (iii) el vector es un vector transcrito in vitro;
 (iv) la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además una cola de poli (A); y/o
 (v) la secuencia de ácido nucleico en el vector comprende además un 3'UTR.
- 25 11. Célula que comprende el vector de la reivindicación 10, opcionalmente en el que la célula es una célula T humana, por ejemplo una célula T CD8+.
- 30 12. Procedimiento de:
 (i) preparar una célula que comprende transducir una célula T con un vector de la reivindicación 10; o
 (ii) generar una población de células modificadas con ARN que comprende introducir un ARN transcrito in vitro o ARN sintético en una célula, en el que el ARN comprende un ácido nucleico que codifica una molécula de CAR, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 35 13. Célula que expresa una molécula de CAR, en el que dicha molécula de CAR es una molécula de CAR, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para usar en:
 (a) un procedimiento para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento administrar al mamífero una cantidad efectiva de la célula que expresa la molécula de CAR, opcionalmente en el que:
 (i) la célula es una célula T autóloga;
 (ii) la célula es una célula T alogénica; y/o
 (iii) la célula se administra a un ser humano; o
 (b) un procedimiento de tratamiento de un mamífero que tiene una enfermedad asociada con la expresión de CD19, comprendiendo dicho procedimiento administrar al mamífero una cantidad eficaz de la célula.
- 40 14. Célula para usar, según la reivindicación 13(b), en la que:
 (i) la enfermedad asociada con la expresión de CD19 se selecciona de una enfermedad proliferativa, tal como un cáncer o tumor maligno o una afección precancerosa, tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia, o es una indicación no relacionada con el cáncer asociada con la expresión de CD19;
 (ii) la enfermedad es un cáncer hematológico seleccionado del grupo que consiste en uno o más de leucemias agudas incluyendo, pero no limitado a, la leucemia linfocítica aguda de células B ("BALL"), leucemia linfocítica aguda de células T ("TALL"), leucemia linfocítica aguda (ALL); una o más leucemias crónicas incluyendo, pero no limitado a, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL); y cánceres hematológicos adicionales o afecciones hematológicas, incluyendo, pero no limitado a, leucemia prolinfocítica de células B, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas, linfoma folicular de células pequeñas o células grandes, afecciones linfoproliferativas malignas, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, mieloma múltiple, mielodisplasia y síndrome mielodisplásico, linfoma no Hodgkin, linfoma plasmablastico, neoplasma de células dendríticas plasmocitoides, macroglobulinemia de Waldenstrom, y "preleucemia", que son una colección diversa de afecciones hematológicas unidas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides; y la enfermedad asociada con la expresión de CD 19 incluye, pero no limitado a, cánceres atípicos y/o no clásicos, malignidades, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas que expresan CD 19; y cualquier combinación de las
- 50
55
60
65

mismas;

(iii) las células que expresan una molécula de CAR se administran en combinación con un agente que aumenta la eficacia de una célula que expresa una molécula de CAR;

5 (iv) las células que expresan una molécula de CAR se administran en combinación con un agente que mejora uno o más efectos secundarios asociados con la administración de una célula que expresa una molécula de CAR; y/o

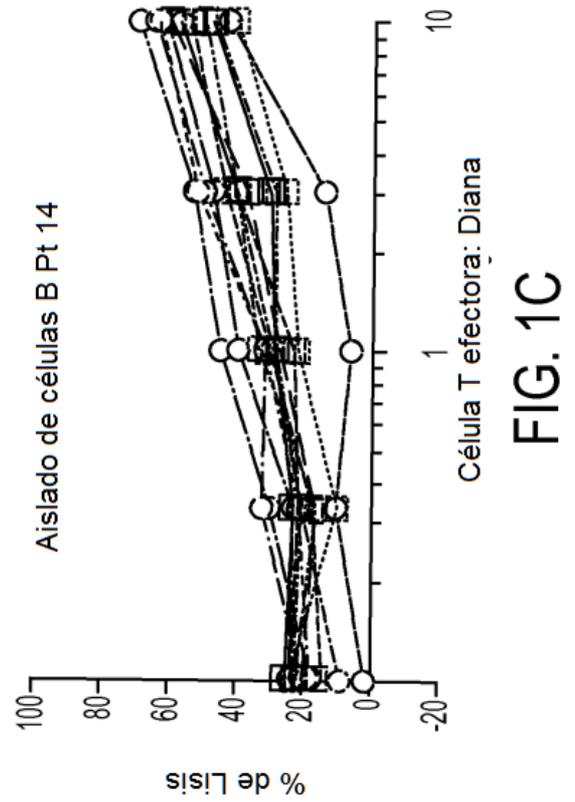
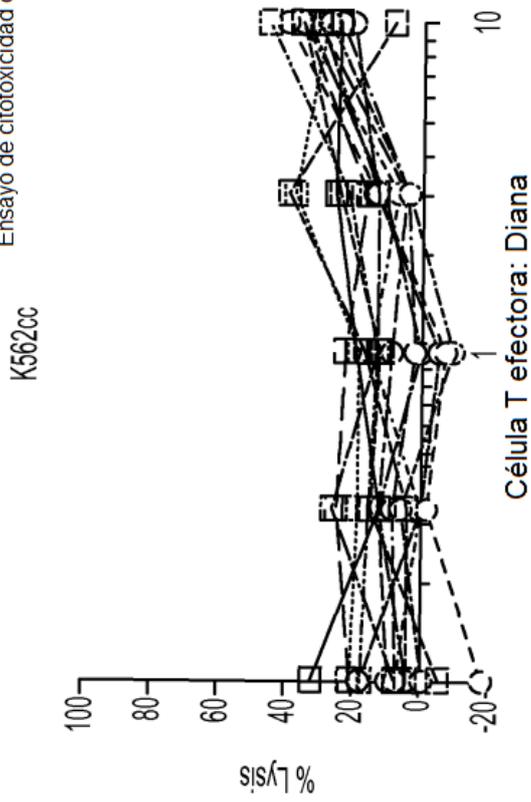
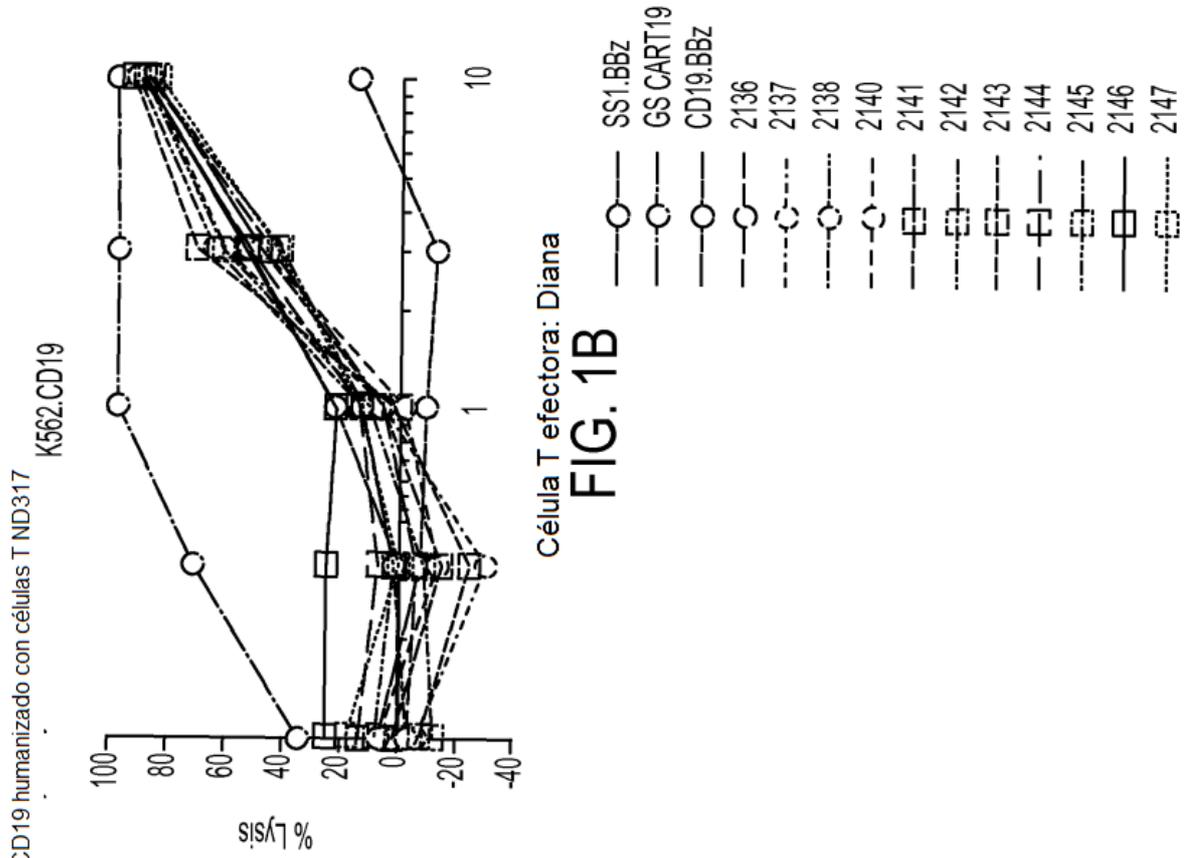
(v) las células que expresan una molécula de CAR se administran en combinación con un agente que trata la enfermedad asociada con la expresión de CD19.

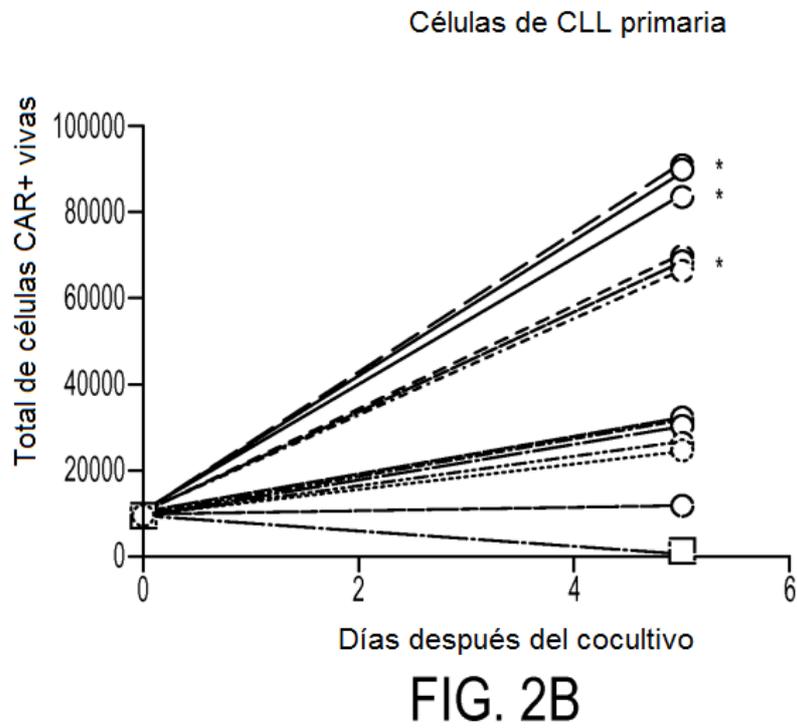
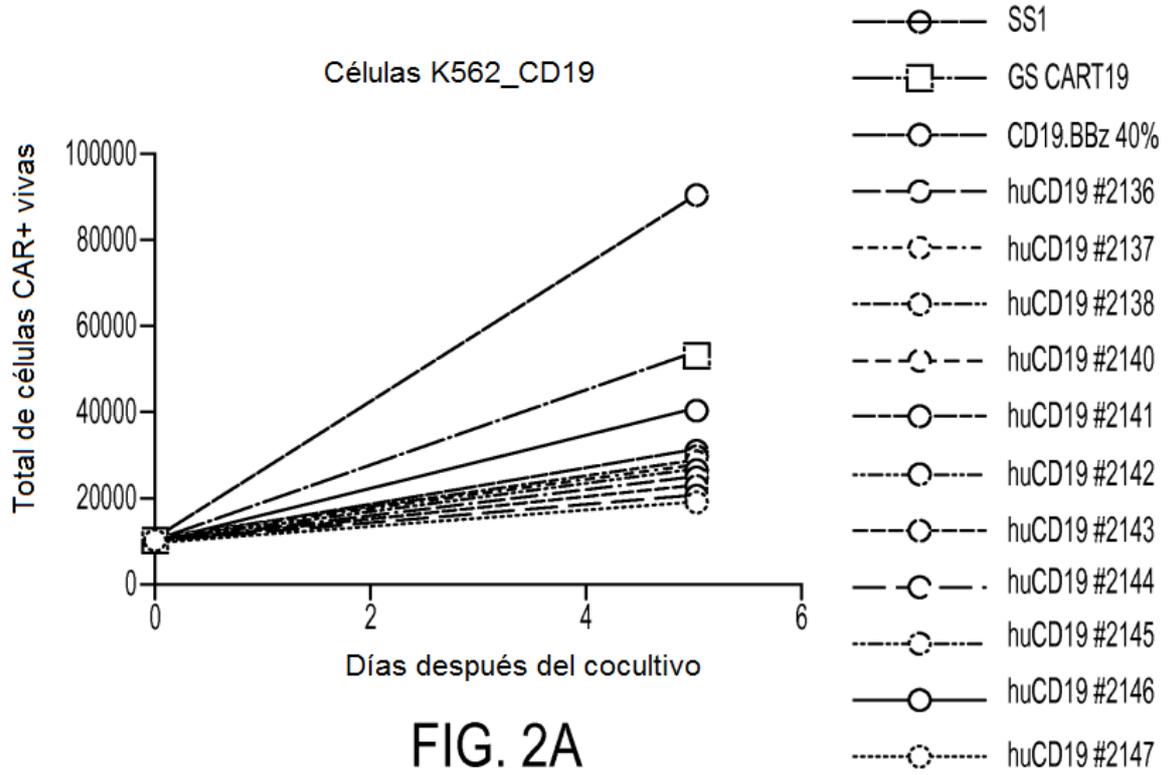
10 15. Dominio de unión anti-CD 19, según la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico aislada, según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, la molécula de polipéptido aislada, según la reivindicación 7, la molécula de CAR aislada, según la reivindicación 8 o 9, el vector de la reivindicación 10, o la célula de la reivindicación 11, para usar en el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión de CD19, o para usar en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, un cáncer hematológico.

15 16. Dominio de unión anti-CD 19, según la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico aislada, según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, la molécula de polipéptido aislada, según la reivindicación 7, la molécula de CAR aislada, según la reivindicación 8 o 9, el vector de la reivindicación 10, o la célula de la reivindicación 11, para usar como un medicamento.

20 17. Célula, según la reivindicación 11, que expresa además una molécula inhibidora que comprende un primer polipéptido que comprende al menos una porción de una molécula inhibidora, asociado con un segundo polipéptido que comprende una señal positiva de un dominio de señalización intracelular, opcionalmente en la que la molécula inhibidora comprende un primer polipéptido que comprende al menos una porción de PD1 y un segundo polipéptido que comprende un dominio coestimulador y un dominio primario de señalización.

25





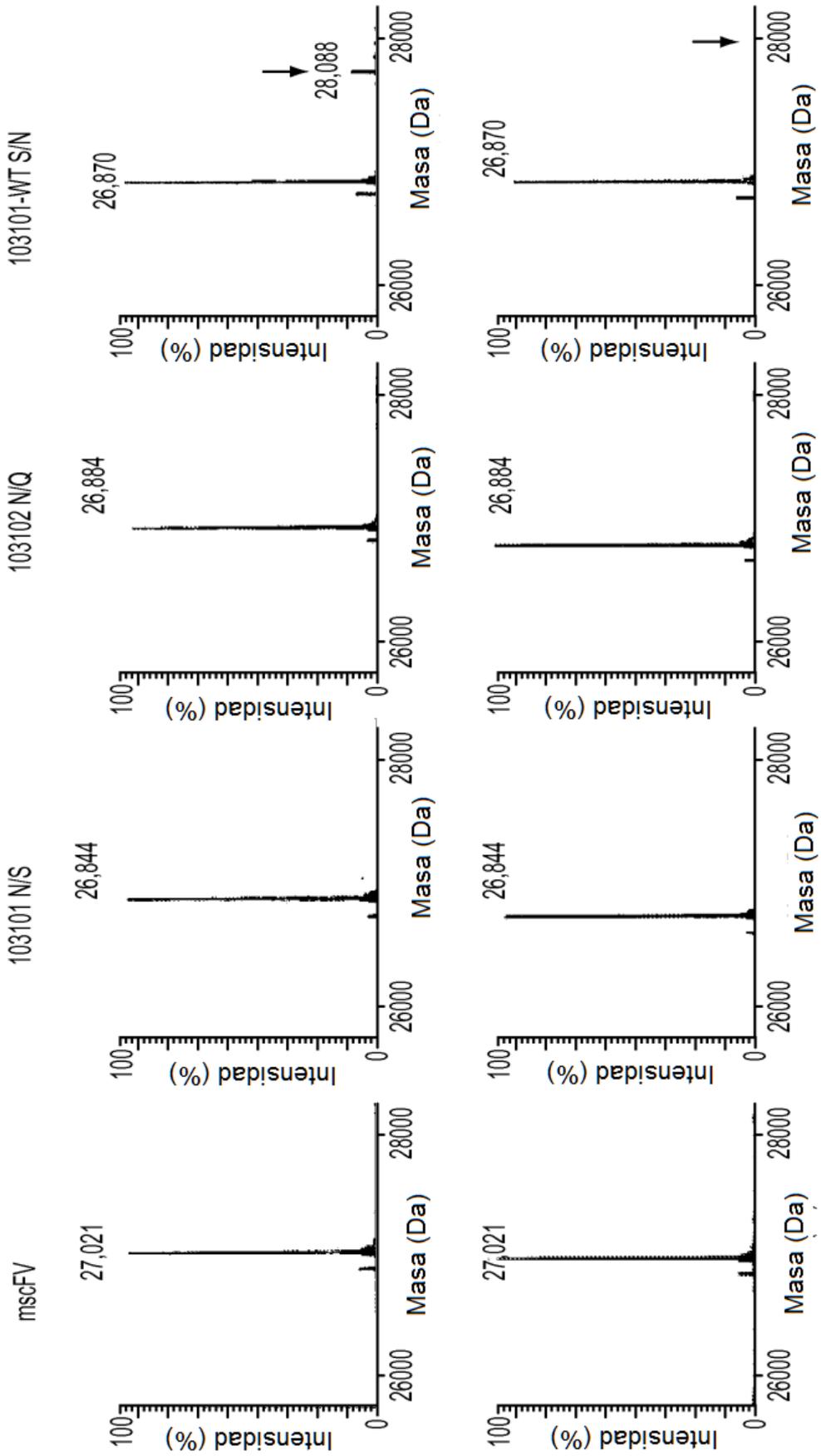


FIG. 3

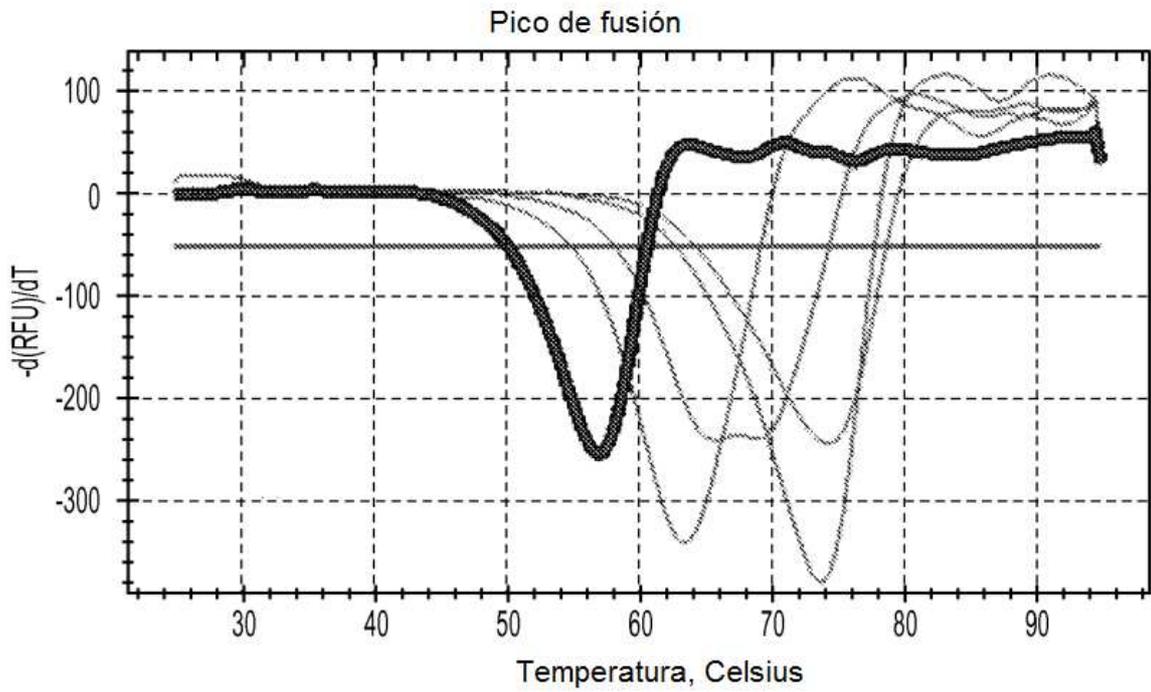
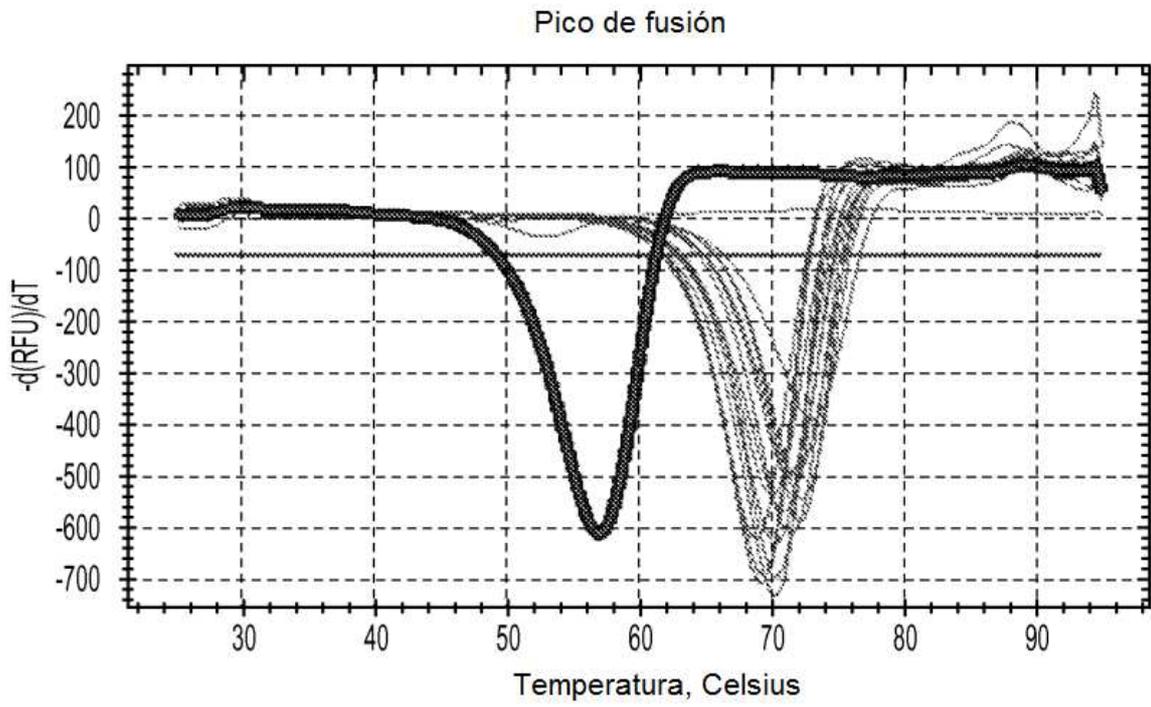


FIG. 4

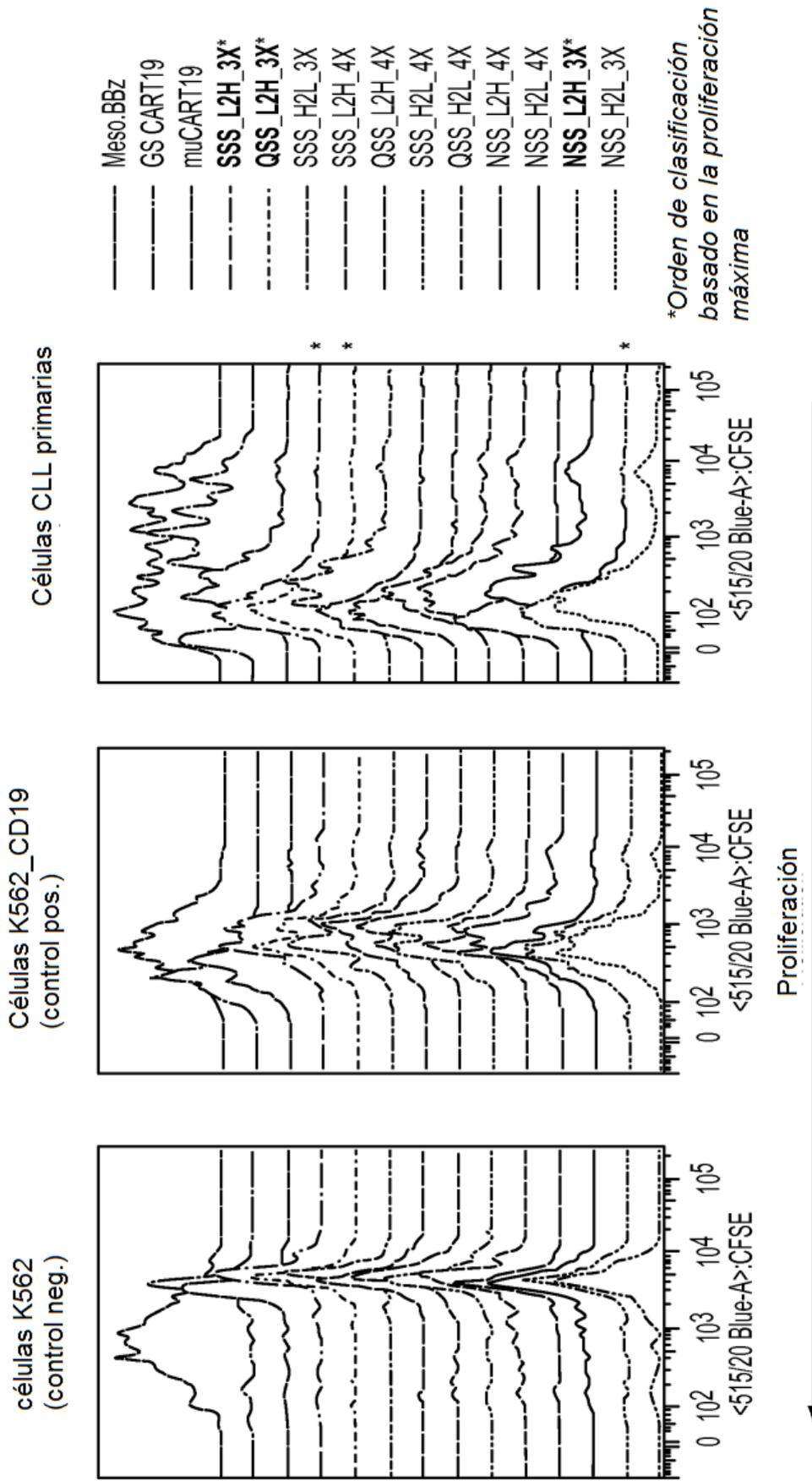


FIG. 5

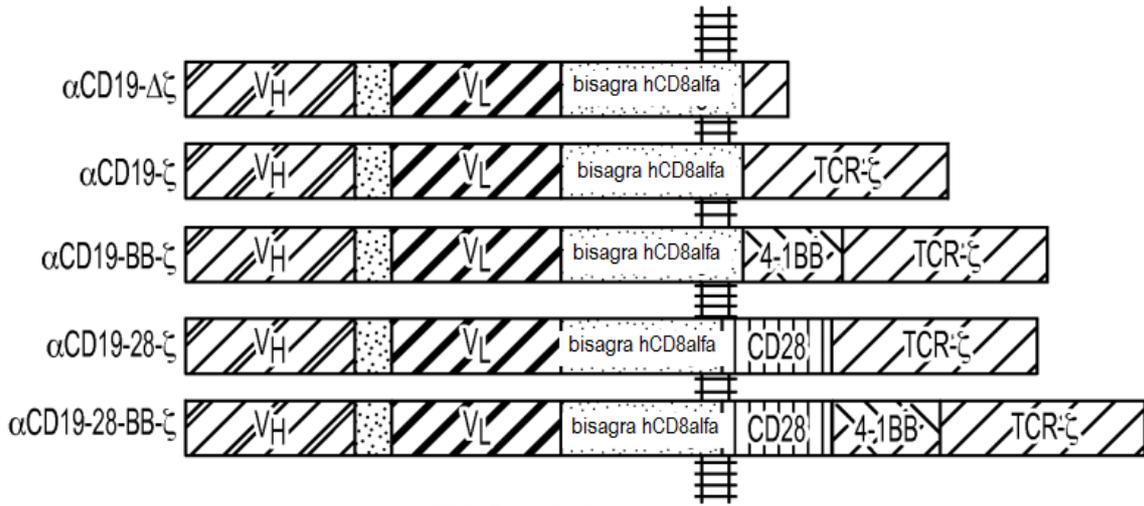


FIG. 6A

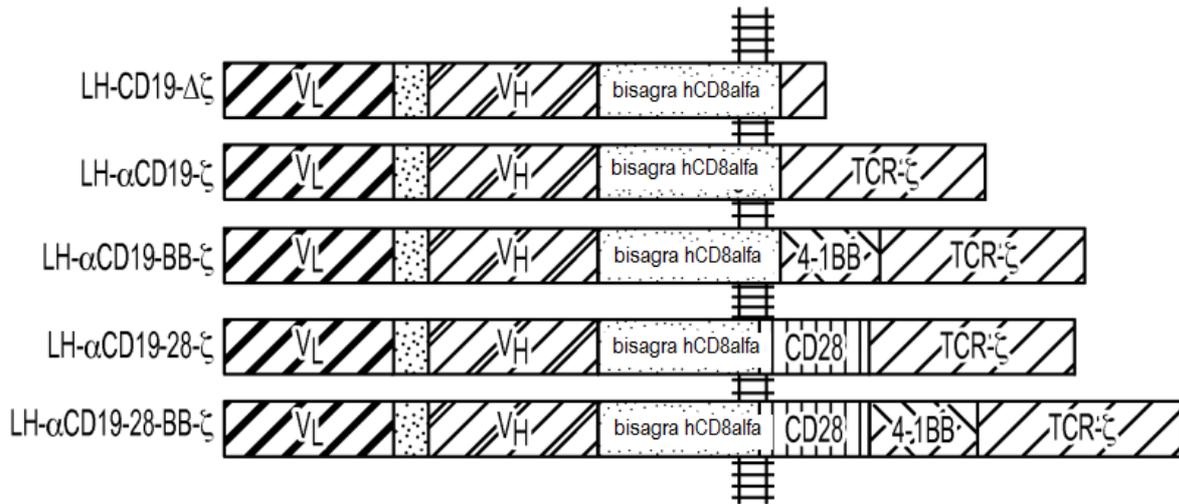


FIG. 6B

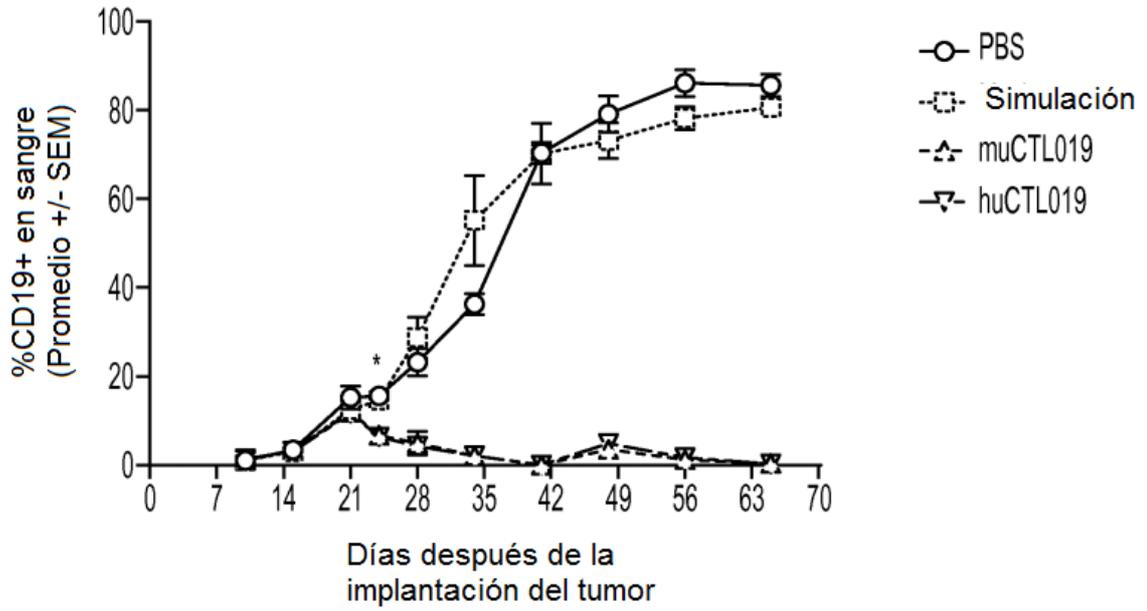
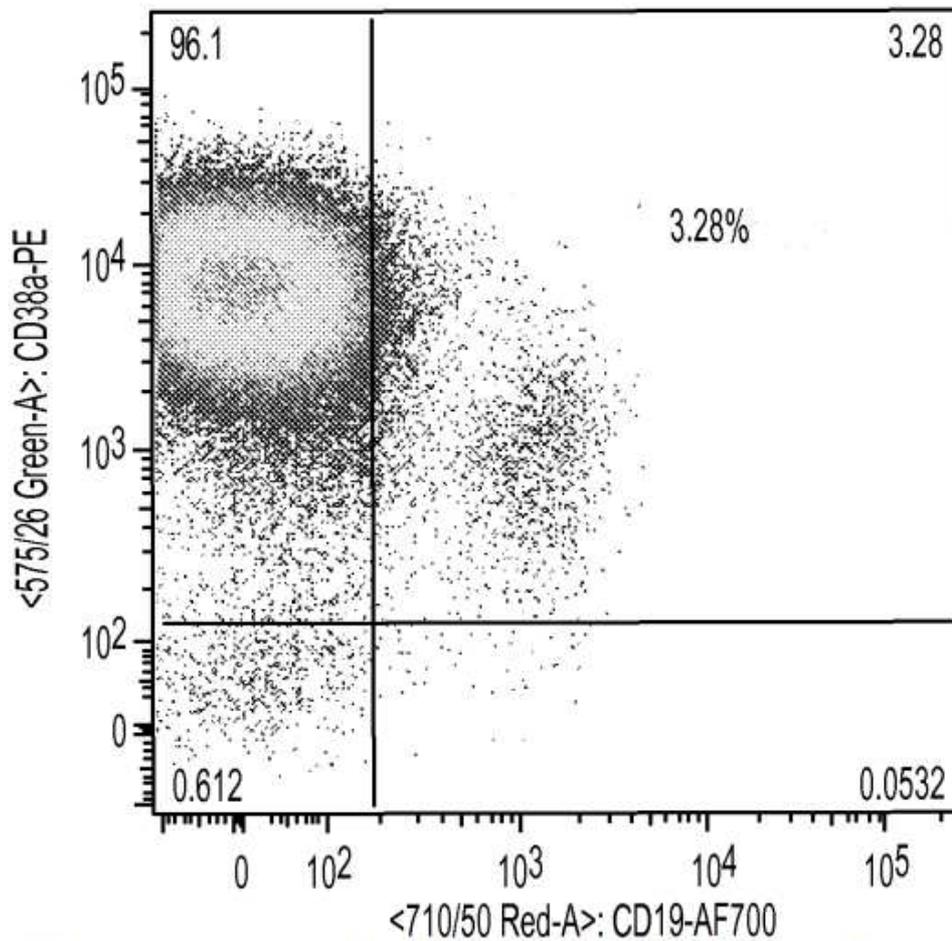


FIG. 7



Células tumorales CD138+CD45 dim teñidas para CD19 (eje X) y CD38 (eje y)

FIG. 8