

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 153**

51 Int. Cl.:

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2015 PCT/US2015/025047**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16093878**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2015 E 15718065 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3230310**

54 Título: **Receptores de antígeno quimérico anti-cd70**

30 Prioridad:

08.12.2014 US 201462088882 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2020

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES (100.0%)
Office of Technology Transfer, National Institutes
of Health, 6011 Executive Boulevard, Suite 325,
MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**WANG, QIONG J.;
YU, ZHIYA y
YANG, JAMES C.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 745 153 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígeno quimérico anti-cd70

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud de patente reclama el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 62/088.882, presentada el 8 de diciembre de 2014. La presente invención fue realizada con la financiación del gobierno con el número de proyecto Z01BC011227-04 por los Institutos Nacionales de la Salud, Instituto Nacional del Cáncer. El gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

MATERIAL REMITIDO ELECTRÓNICAMENTE

En el presente documento se incluye un listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos en soporte informático que se remite al mismo tiempo que el mismo y se identifica de la siguiente manera: un archivo ASCII (texto) de 55.121 bytes denominado "719062ST25.TXT", con fecha del 3 de diciembre de 2014.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer es un problema de salud pública. A pesar de los avances en tratamientos tales como la quimioterapia, el pronóstico para muchos cánceres, incluidos el carcinoma de células renales (CCR), el glioblastoma, el linfoma no Hodgkin (LNH), la leucemia linfocítica crónica (LLC), el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma folicular, puede ser malo. Por consiguiente, existe una necesidad insatisfecha de tratamientos adicionales para el cáncer, particularmente CCR, glioblastoma, LNH, LLC, linfoma difuso de células B grandes y linfoma folicular.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Una realización de la invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene especificidad antigénica por CD70, comprendiendo el CAR: un dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27; un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB; un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ ; y opcionalmente, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28.

Otra realización de la invención proporciona un CAR que tiene especificidad antigénica por CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 11-13.

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

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

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A y 1B son gráficos que muestran el tamaño tumoral (mm²) de ratones portadores de tumor B16/mCD70 (A) o B16 (B) durante un período de tiempo (días) después de la administración de las células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ (círculos negros), células no transducidas (círculos blancos), solución salina tamponada con fosfato (PBS) (x), o pmel + VI (cuadrados) e irradiación (500 Rad).

Las Figuras 1C y 1D son gráficos que muestran el tamaño tumoral (mm²) de ratones portadores de tumor B16/mCD70 durante un período de tiempo (días) después de la administración de células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ a una dosis de 1×10^4 (▼), 1×10^5 (cuadrados negros), 1×10^6 (▲) o 1×10^7 (círculos negros) células por ratón; PBS (cuadrados blancos); células transducidas con un vector vacío (círculos blancos); o pmel + VI (rombos) con (C) o sin (D) irradiación (500 Rad).

La Figura 1E es un gráfico que muestra la supervivencia (%) de ratones portadores de tumores B16/mCD70 durante un período de tiempo (días) después de la administración de células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ a una dosis de 1×10^4 (rombos), 1×10^5 (▼), 1×10^6 (▲) o 1×10^7 (círculos negros) células por ratón; PBS (cuadrados blancos); células transducidas con un vector vacío (círculos blancos); o pmel + VI (Δ), seguido de irradiación (500 Rad).

La Figura 1F es un gráfico que muestra el tamaño tumoral (mm²) de ratones portadores de tumor B16/mCD70 durante un período de tiempo (días) después de la administración de células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ

(cuadrados), células no transducidas (Δ), células transducidas con un vector vacío (∇), o pmel + VI (círculos), seguido de irradiación y administración de IL-2.

5 Las Figuras 2A-2D son gráficos que muestran el peso promedio (g) de ratones portadores de tumor B16/mCD70 (A y B) o B16 (C y D) durante un período de tiempo (días) después de la administración de células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ (círculos negros), células no transducidas (cuadrados blancos), solución salina tamponada con fosfato (PBS) (∇), o pmel + VI (Δ) con (A y C) o sin (B y D) irradiación (500 Rad).

10 Las Figuras 2E-2H son gráficos que muestran el recuento absoluto de glóbulos blancos (K/ μ l) (E y F) o el recuento de esplenocitos ($\times 10^7$ por bazo) (G y H) de ratones portadores de tumores B16/mCD70 durante un período de tiempo (días) después de la administración de células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ (barras sombreadas), células no transducidas (barras sin sombrear) o células transducidas con un vector que codifica proteína fluorescente verde (GFP) (barras con rayas diagonales) con (E y G) o sin (F y H) irradiación (500 Rad).

15 La Figura 2I es un gráfico que muestra los niveles de interferón sérico (IFN) gamma (pg/ml) de ratones portadores de tumor B16/mCD70 durante un período de tiempo (días) después de la administración de células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ con (barras negras) o sin (barras rayadas horizontalmente) irradiación o células transducidas con un vector que codifica GFP con (barras cuadrículadas) o sin (barras sin sombrear) irradiación (500 Rad).

20 La Figura 3 es un gráfico que muestra el IFN- γ (pg/ml) secretado tras el cultivo de linfocitos T humanos transducidos con un vector retroviral vacío (control) (MSGV1) o uno de fCD27-CD3 ζ (SEQ ID NO: 7), Δ CD27-CD28 - CD3 ζ (SEQ ID NO: 8), Δ CD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 9), Δ CD27-CD28 -4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 10), fCD27-CD28 - CD3 ζ (SEQ ID NO: 11), fCD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 12) o fCD27-CD28- 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 13) solo (medio) (barras con rayas verticales) o tras cocultivo con células diana de control 624mel (barras cuadrículadas), 624/CD70 (barras negras), 938mel (barras punteadas) o 938/CD70 (barras blancas) o células diana RCC RCC 2245R (barras diagonales), RCC 2246R (barras diagonales invertidas), RCC 2361R (barras en caja) o RCC 1764 (barras en espiga).

30 La Figura 4 es un gráfico que muestra el IFN- γ (pg/ml) secretado tras el cultivo de células no transducidas (UT) o clones de empaquetamiento retrovirales A2, A10, B3, C1, E3 o G2 transducidos con Δ CD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 9) solo (medio, barras con rayas verticales) o tras cocultivo con células diana de control SNU1079 (barras punteadas), SNU1196 (barras blancas), 938mel (barras a cuadros), o 938/CD70 (barras negras) o células diana RCC RCC 2245R (barras diagonales), RCC 2246R (barras diagonales invertidas), RCC 2361R (barras en caja) o RCC 1764 (barras en espiga).

35 La Figura 5 es un gráfico que muestra el IFN- γ (pg/ml) secretado tras el cultivo de células no transducidas (UT) o clones de empaquetamiento retrovirales A2, B11, C5 o D2 transducidos con Δ CD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 9) solo (medio, barras rayadas verticalmente) o tras cocultivo con células diana de control SNU1079 (barras punteadas), SNU1196 (barras blancas), 938mel (barras a cuadros) o 938/CD70 (barras negras) o células diana RCC RCC 2245R (barras diagonales), RCC 2246R (barras diagonales invertidas), RCC 2361R (barras en caja) o RCC 1764 (barras en espiga).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 Una realización de la invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene especificidad antigénica por CD70, comprendiendo el CAR: un dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27; un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB; un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ ; y opcionalmente, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28. En lo sucesivo, las referencias a un "CAR" también hacen referencia a porciones funcionales y variantes funcionales del CAR, a menos que se especifique lo contrario.

50 Un CAR es una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene los dominios de unión a antígeno de un receptor (por ejemplo, un receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)) ligados a dominios de señalización de linfocitos T. Las características de los CAR incluyen su capacidad para redirigir la especificidad y reactividad de linfocitos T hacia una diana seleccionada de manera no restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), explotando las propiedades de unión a antígeno de los receptores. El reconocimiento de antígeno no restringido por MHC da a los linfocitos T que expresan CAR la capacidad de reconocer el antígeno independientemente del procesamiento del antígeno, eludiendo así un mecanismo principal de escape tumoral. Además, cuando se expresan en linfocitos T, los CAR ventajosamente no se dimerizan con las cadenas alfa y beta del receptor de linfocitos T (TCR) endógeno.

60 Las frases "tienen especificidad de antígeno (antigénica)" y "provocan una respuesta específica de antígeno", como se usan en el presente documento, significan que el CAR puede unirse específicamente a un antígeno y reconocerlo inmunológicamente, de tal modo que la unión del CAR al antígeno provoca una respuesta inmunitaria.

65

Los CAR de la invención tienen especificidad de antígeno por CD70. CD70 pertenece a la superfamilia de TNF y tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. CD70 es una molécula coestimuladora que participa en la proliferación y supervivencia de las células derivadas de linfoides cuando interactúa con su receptor, CD27. La expresión normal y no cancerosa de CD70 está restringida a los tejidos linfoides, tales como los linfocitos T activados, los linfocitos B, los linfocitos citotóxicos naturales (NK), los monocitos y las células dendríticas. CD70 se expresa en una variedad de cánceres humanos tales como, por ejemplo, CCR (Diegmann et al., Eur. J. Cancer, 41: 1794-801 (2005)) (por ejemplo, CCR de células claras (CCRcc)), glioblastoma (Held-Feindt et al., Int. J. Cancer, 98: 352-56 (2002); Wischhusen et al., Cancer Res., 62: 2592-99 (2002)), LNH y LLC (Lens et al., Br. J. Haematol., 106: 491-503 (1999)), linfoma difuso de células B grandes y linfoma folicular.

Sin limitarse a una teoría o mecanismo particular, se cree que al provocar una respuesta específica de antígeno contra CD70, los CAR inventivos proporcionan uno o más de cualquiera de los siguientes: atacar y destruir células cancerosas que expresan CD70, reducir o eliminar células cancerosas, facilitar la infiltración de células inmunitarias en el sitio o sitios del tumor, y potenciar/extender las respuestas contra el cáncer. Debido a que la expresión normal de CD70 se limita a los tejidos linfoides, tales como los linfocitos T activados, los linfocitos B, los linfocitos NK, los monocitos y las células dendríticas, se contempla que los CAR inventivos eviten ventajosamente atacar/destruir muchos tejidos normales.

Una realización de la invención proporciona un CAR que comprende un dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CD27. A este respecto, el CAR puede comprender tanto un dominio de unión a antígeno de CD27 como un dominio transmembrana de CD27. El CD27 puede comprender o consistir en cualquier secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana de CD27 de unión a antígeno humano adecuada. En una realización de la invención, el CD27 de longitud completa, que incluye el dominio de unión a antígeno, el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular de linfocitos T, tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización de la invención, el dominio de unión a antígeno de CD27 está compuesto por los residuos de aminoácidos 1-188 de la SEQ ID NO: 2 y tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, el dominio transmembrana de CD27 está compuesto por los residuos de aminoácidos 189-211 de la SEQ ID NO: 2 y tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, y el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27 está compuesto por los residuos de aminoácidos 212-260 de la SEQ ID NO: 2 y tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23. Por consiguiente, en una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 21 y 22. El dominio de unión a antígeno de CD27 se une específicamente a CD70.

Una realización de la invención proporciona un CAR que comprende un dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27. Una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27 también se denomina en el presente documento "secuencia de aminoácidos de CD27 truncado" o "CD27 truncado".

En una realización, el dominio transmembrana de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27. A este respecto, el dominio transmembrana de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de los residuos de aminoácidos contiguos 212 a 260 como se define por la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de los residuos de aminoácidos contiguos 212 a 260 de la SEQ ID NO: 2. En una realización de la invención, el dominio transmembrana de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23. En una realización de la invención, el dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 o que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

El CAR puede comprender además un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB; un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 zeta (ζ); y opcionalmente, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28. En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28. En otra realización de la invención, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ . En una realización preferida, los dominios de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB, CD3 ζ y CD28 son humanos. CD28 es un marcador de linfocitos T importante en la coestimulación de linfocitos T. 4-1BB, también conocido como CD137, transmite una potente señal coestimuladora a los linfocitos T, promoviendo la diferenciación y potenciando la supervivencia a largo plazo de los linfocitos T. CD3 ζ se asocia con TCR para producir una señal y contiene motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores (ITAM).

5 El dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ puede comprender o consistir en cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T humanos de CD3 ζ adecuada. En una realización de la invención, el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

10 El dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB puede comprender o consistir en cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB humanos adecuada. En una realización de la invención, el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

20 El dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28 puede comprender o consistir en cualquier secuencia de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T humanos de CD28 adecuada. En una realización de la invención, el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 6. Preferiblemente, el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

30 En una realización de la invención, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 de longitud completa, que incluye un dominio de unión a antígeno de CD27, un dominio transmembrana de CD27 y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27, en combinación con un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ ((f) CAR CD27-CD3 ζ de longitud completa). A este respecto, el CAR puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos de CD27 de longitud completa al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 y cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CD3 ζ descritas en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. Por ejemplo, el CAR fCD27-CD3 ζ puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de CD27 de longitud completa de SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de CD3 ζ de SEQ ID NO: 4. En una realización de la invención, el CAR fCD27-CD3 ζ puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente el 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 7. Preferiblemente, el CAR fCD27-CD3 ζ comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En una realización de la invención, el CAR fCD27-CD3 ζ carece de uno o ambos CD19 y DsRed truncados.

45 En una realización de la invención, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 de longitud completa, que incluye un dominio de unión a antígeno de CD27, un dominio transmembrana de CD27 y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27, en combinación con un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28 (fCD27-CD28-CD3 ζ). A este respecto, el CAR puede comprender o consistir en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CD27 de longitud completa, cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CD3 ζ y cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CD28 descritas en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. Por ejemplo, el CAR fCD27-CD28-CD3 ζ puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de CD27 de longitud completa de SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos de CD3 ζ de SEQ ID NO: 4 y la secuencia de aminoácidos de CD28 de SEQ ID NO: 6. En una realización de la invención, el CAR fCD27-CD28-CD3 ζ puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 11. Preferiblemente, el CAR fCD27-CD28-CD3 ζ comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

65 En una realización de la invención, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 de longitud completa, que incluye un dominio de unión a antígeno de CD27, un dominio transmembrana de CD27 y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27, en combinación con un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB (fCD27-4-1BB-CD3 ζ). A este respecto, el CAR puede comprender o consistir en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CD27 de

longitud completa, cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CD3ζ y cualquiera de las secuencias de aminoácidos de 4-1BB descritas en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. Por ejemplo, el CAR fCD27-4-1BB-CD3ζ puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de CD27 de longitud completa de SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos de CD3ζ de SEQ ID NO: 4 y la secuencia de aminoácidos de 4-1BB de SEQ ID NO: 5. En una realización de la invención, el CAR fCD27-4-1BB-CD3ζ puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 12. Preferiblemente, el CAR fCD27-4-1BB-CD3ζ comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En una realización de la invención, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 de longitud completa, que incluye un dominio de unión a antígeno de CD27, un dominio transmembrana de CD27 y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27, en combinación con un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB y un dominio de señalización intracelular de CD28 (fCD27-CD28-4-1BB-CD3ζ). A este respecto, el CAR puede comprender o consistir en cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CD27 de longitud completa, cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CD3ζ, cualquiera de las secuencias de aminoácidos de 4-1BB y cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CD28 descritas en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. Por ejemplo, el CAR fCD27-CD28-4-1BB-CD3ζ puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de CD27 de longitud completa de SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos de CD3ζ de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de 4-1BB de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos de CD28 de SEQ ID NO: 6. En una realización de la invención, el CAR fCD27-CD28-4-1BB-CD3ζ puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. Preferiblemente, el CAR fCD27-CD28-4-1BB-CD3ζ comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En una realización de la invención, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 de ratón de longitud completa, que incluye un dominio de unión a antígeno de CD27, un dominio transmembrana de CD27 y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27, en combinación con dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ de ratón (mCD27-CD3ζ). A este respecto, el CAR puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos de CD27 de ratón de longitud completa al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 26 en combinación con una secuencia de aminoácidos de CD3ζ de ratón al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 27. Por ejemplo, el CAR mCD27-CD3ζ puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos de CD27 de ratón de longitud completa de SEQ ID NO: 26 y la secuencia de aminoácidos de CD3ζ de ratón de SEQ ID NO: 27. En una realización de la invención, el CAR mCD27-CD3ζ puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 25. Preferiblemente, el CAR mCD27-CD3ζ comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 truncado que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27, en combinación con un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28 (CD27-CD28 - CD3ζ truncado (Δ)). A este respecto, el CAR puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana de unión a antígeno de CD27 truncado al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 en combinación con cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ y cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28 descritas en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. Por ejemplo, el CAR ΔCD27-CD28 - CD3ζ puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana de unión a antígeno de CD27 truncado de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CD3C de SEQ ID NO: 4 y la secuencia de aminoácidos de CD28 de SEQ ID NO: 6. En una realización de la invención, el CAR ΔCD27-CD28 - CD3ζ puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.

aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 8. Preferiblemente, el CAR ΔCD27-CD28-CD3ζ comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

5 En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 truncado que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27, en combinación con un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB (ΔCD27-4-1BB - CD3ζ). A este respecto, el CAR puede comprender o consistir en cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio transmembrana de unión a antígeno de CD27 truncado, cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ y cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB descritas en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. Por ejemplo, el CAR ΔCD27-4-1BB - CD3ζ puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana de unión a antígeno CD27 truncado de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CD3ζ de SEQ ID NO: 4 y la secuencia de aminoácidos de 4-1BB de SEQ ID NO: 5. En una realización de la invención, el CAR ΔCD27-4-1BB - CD3ζ puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 9. Preferiblemente, el CAR ΔCD27-4-1BB - CD3ζ comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

20 En una realización de la invención, el CAR comprende un dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 truncado que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27, en combinación con un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28 y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB (ΔCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ). A este respecto, el CAR puede comprender o consistir en cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio transmembrana de unión al antígeno de CD27 truncado, cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ, cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28, y cualquiera de las secuencias de aminoácidos del dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB descritas en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. Por ejemplo, el CAR ΔCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos del dominio transmembrana de unión a antígeno de CD27 truncado de SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de CD3ζ de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de CD28 de SEQ ID NO: 6 y la secuencia de aminoácidos de 4-1BB de SEQ ID NO: 5. En una realización de la invención, el CAR ΔCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, el CAR ΔCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

40 En una realización de la invención, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 8-10. En una realización de la invención, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90% idéntica a la SEQ ID NO: 9 o 10. En otra realización de la invención, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 11-13. En otra realización de la invención, el CAR comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 12 o 13. Preferiblemente, el CAR comprende, consiste o consiste esencialmente en cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en la Tabla 1A. En una realización preferida de la invención, el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-13. Preferiblemente, el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 9, 10, 12 y 13.

TABLA 1A

CAR	Dominio de unión de antígeno y transmembrana	Dominio de señalización intracelular de linfocitos T
(f) CD27-CD3ζ (SEQ ID NO: 7) de longitud completa	CD27 humano de longitud completa	CD27 humano y CD3ζ humano
(Δ) CD27-CD28 - CD3ζ (SEQ ID NO: 8) truncado	CD27 humano truncado	CD28 humano y CD3ζ humano
ΔCD27-4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 9)	CD27 humano truncado	4-1BB humano y CD3ζ humano
ΔCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 10)	CD27 humano truncado	4-1BB humano, CD28 humano y CD3ζ humano

CAR	Dominio de unión de antígeno y transmembrana	Dominio de señalización intracelular de linfocitos T
fCD27-CD28 - CD3ζ (SEQ ID NO: 11)	CD27 humano de longitud completa	CD27 humano, CD28 humano y CD3 ζ humano
fCD27-4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 12)	CD27 humano de longitud completa	CD27 humano, 4-1BB humano y CD3 ζ humano
fCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 13)	CD27 humano de longitud completa	CD27 humano, 4-1BB humano, CD28 humano y CD3 ζ humano
mCD27-CD3ζ (SEQ ID NO: 25)	CD27 de ratón de longitud completa	CD3 ζ de ratón

Se incluyen en el alcance de la invención porciones funcionales de los CAR inventivos descritos en el presente documento. El término "porción funcional" cuando se usa en referencia a un CAR hace referencia a cualquier parte o fragmento del CAR de la invención, cuya parte o fragmento retiene la actividad biológica del CAR del cual es parte (el CAR original). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un CAR que retienen la capacidad de reconocer células diana, o detectar, tratar o prevenir el cáncer, en una medida, la misma medida, o en mayor medida, que el CAR original. En referencia al CAR original, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente un 10 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 68 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o más, del CAR original.

La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxilo de la porción, o en ambos extremos, cuyos aminoácidos adicionales no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del CAR original. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, reconocer células diana, detectar cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del CAR original.

Se incluyen en el alcance de la invención las variantes funcionales de los CAR inventivos descritos en el presente documento. El término "variante funcional" como se usa en el presente documento hace referencia a un CAR, polipéptido o proteína que tiene una identidad o similitud de secuencia sustancial o significativa con un CAR original, cuya variante funcional retiene la actividad biológica del CAR del cual es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del CAR descritas en el presente documento (el CAR original) que retienen la capacidad de reconocer las células diana en una medida similar, la misma medida o en mayor medida que el CAR original. En referencia al CAR original, la variante funcional puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente un 30 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o más idéntica en secuencia de aminoácidos al CAR original.

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

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

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

5 Los CAR de las realizaciones de la invención pueden ser de cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que los CAR retengan su actividad biológica, p. ej., la capacidad de unirse específicamente al antígeno, detectar células cancerosas en un mamífero o tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, etc. Por ejemplo, el CAR puede tener una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos, tal como 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos de longitud.

10 Los CAR de las realizaciones de la invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos de origen natural. Tales aminoácidos sintéticos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexanocarboxílico, norleucina, ácido α -amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometilcisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina, β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentanocarboxílico, α -aminociclohexanocarboxílico ácido, ácido α -aminocicloheptanocarboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido α,β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -terc-butilglicina.

15 Los CAR de las realizaciones de la invención pueden estar glicosilados, amidados, carboxilados, fosforilados, esterificados, N-acilados, ciclados a través de, p. ej., un puente disulfuro, o convertidos en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizados o polimerizados, o conjugados.

20 Los CAR de las realizaciones de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, síntesis *de novo*. Además, los polipéptidos y las proteínas se pueden producir de forma recombinante utilizando los ácidos nucleicos descritos en el presente documento usando procedimientos recombinantes estándares. Véase, por ejemplo, Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4^a ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012). Como alternativa, los CAR descritos en el presente documento pueden sintetizarse comercialmente por compañías, tales como Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). A este respecto, los CAR inventivos pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

25 Además, una realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los CAR descritos en el presente documento. Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los dominios de unión a antígeno, dominios transmembrana y/o dominios de señalización intracelular de linfocitos T descritos en el presente documento. En una realización de la invención, el ácido nucleico comprende, consiste o consiste esencialmente en cualquiera de las secuencias de nucleótidos expuestas en la Tabla 1B. Preferiblemente, el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 14-20. Preferiblemente, el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 16, 17, 19 y 20. En una realización de la invención, la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR fCD27-CD3 ζ no codifica uno o ambos de CD19 y DsRed truncados.

TABLA 1B

CAR	Dominio de unión de antígeno y transmembrana	Dominio de señalización intracelular de linfocitos T
(f) CD27-CD3 ζ (SEQ ID NO: 14) de longitud completa	CD27 humano de longitud completa	CD27 humano y CD3 ζ humano
(Δ) CD27-CD28 - CD3 ζ truncado (SEQ ID NO: 15)	CD27 humano truncado	CD28 humano y CD3 ζ humano
Δ CD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 16)	CD27 humano truncado	4-1BB humano y CD3 ζ humano
Δ CD27-CD28 - 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 17)	CD27 humano truncado	4-1BB humano, CD28 humano y CD3 ζ humano
fCD27-CD28 - CD3 ζ (SEQ ID NO: 18)	CD27 humano de longitud completa	CD27 humano, CD28 humano y CD3 ζ humano
fCD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 19)	CD27 humano de longitud completa	CD27 humano, 4-1BB humano y CD3 ζ humano

CAR	Dominio de unión de antígeno y transmembrana	Dominio de señalización intracelular de linfocitos T
fCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 20)	CD27 humano de longitud completa	CD27 humano, 4-1BB humano, CD28 humano y CD3 ζ humano
mCD27-CD3ζ (SEQ ID NO: 24)	CD27 de ratón de longitud completa	CD3 ζ de ratón

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

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

Un ácido nucleico recombinante puede ser uno que tiene una secuencia que no es de origen natural o que tiene una secuencia que está elaborada por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otra manera. Esta combinación artificial a menudo se logra mediante síntesis química o, más comúnmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, p. ej., mediante técnicas de ingeniería genética, tales como las descritas en Green y Sambrook, *supra*. Los ácidos nucleicos pueden construirse en base a síntesis química y/o reacciones de ligadura enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook, *supra*. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados diversamente diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (p. ej., derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5- (carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina N⁶-sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención se pueden adquirir en compañías tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos aislada o purificada que codifique cualquiera de los CAR descritos en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender una secuencia de nucleótidos que está degenerada en cualquiera de las secuencias o una combinación de secuencias degeneradas.

Una realización de la invención también proporciona un ácido nucleico aislado o purificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los nucleicos. ácidos descritos en el presente documento.

La secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas puede hibridar en condiciones de alto rigor. Por "condiciones de alto rigor" se entiende que la secuencia de nucleótidos hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento) en una cantidad que es detectablemente mayor que la hibridación no específica. Las condiciones de alto rigor incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o una que contenga solo unos pocos desapareamientos dispersos de una secuencia aleatoria que tenga algunas regiones pequeñas (p. ej., 3-10 bases) que coincidan con la secuencia de nucleótidos. Tales regiones pequeñas de complementariedad se funden más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alto

rigor las hace fácilmente distinguibles. Las condiciones de rigor relativamente alto incluirían, por ejemplo, condiciones bajas en sal y/o de alta temperatura, tales como las proporcionadas por aproximadamente NaCl 0,02-0,1 M o su equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70 °C. Dichas condiciones de alto rigor toleran poco, o ningún, desapareamiento entre la secuencia de nucleótidos y la hebra molde o diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de los CAR inventivos. Generalmente, se aprecia que las condiciones pueden volverse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

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

En una realización, los ácidos nucleicos de la invención pueden incorporarse en un vector de expresión recombinante. A este respecto, una realización de la invención proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención. Con los fines de el presente documento, el término "vector de expresión recombinante" significa un constructo de oligonucleótidos o polinucleótidos genéticamente modificados que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por una célula hospedadora, cuando el constructo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, proteína, polipéptido o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para expresar el ARNm, proteína, polipéptido o péptido dentro de la célula. Los vectores de la invención no son de origen natural en su conjunto. Sin embargo, partes de los vectores pueden ser de origen natural. Los vectores de expresión recombinantes inventivos pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluidos, pero sin limitación, ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, sintetizados u obtenidos en parte de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender grupos de enlace internucleotídicos de origen natural o no natural, o ambos tipos de grupos de enlace. Preferiblemente, los nucleótidos o grupos de enlace internucleotídicos de origen no natural o alterados no obstaculizan la transcripción o replicación del vector. En una realización de la invención, el vector de expresión recombinante que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR fCD27-CD3ζ no codifica uno o ambos de CD19 y DsRed truncados.

En una realización, el vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier célula hospedadora adecuada. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para propagación y expansión o para expresión o ambas, tales como plásmidos y virus. El vector se puede seleccionar del grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También se pueden usar vectores de bacteriófagos, tales como λGT10, λGT11, λZapII (Stratagene), λEMBL4 y λNM1149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión de animales incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). El vector de expresión recombinante puede ser un vector vírico, p. ej., un vector retrovírico o un vector lentivírico. En algunas realizaciones, el vector puede ser un transposón.

En una realización, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante estándares descritas, por ejemplo, en Green y Sambrook, *supra*. Los constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, pueden prepararse para contener un sistema de replicación funcional en una célula hospedadora procariontica o eucariótica. Los sistemas de replicación pueden derivar, p. ej., de ColEI, plásmido de 2 μ, λ, SV40, virus del papiloma bovino y similares.

El vector de expresión recombinante puede comprender secuencias reguladoras, tales como los codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos del tipo de célula hospedadora (p. ej., bacteria, hongo, planta o animal) en el que se va a introducir el vector, según sea apropiado, y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN. El vector de expresión recombinante puede comprender sitios de restricción para facilitar la clonación.

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

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR, o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria o que hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. La selección de promotores, p. ej., fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos de desarrollo, está dentro de las habilidades comunes del experto. De manera

similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de las habilidades del experto. El promotor puede ser un promotor no vírico o un promotor vírico, p. ej., un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV o un promotor que se encuentra en la repetición terminal larga del virus de citoblastos murinos.

5 Los vectores de expresión recombinantes inventivos pueden diseñarse para expresión transitoria, para expresión estable o para ambas. Además, los vectores de expresión recombinantes pueden elaborarse para expresión constitutiva o para expresión inducible.

10 Además, se puede hacer que los vectores de expresión recombinantes incluyan un gen suicida. Como se usa en el presente documento, el término "gen suicida" hace referencia a un gen que causa que la célula que expresa el gen suicida muera. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, p. ej., un fármaco, a la célula en la que se expresa el gen, y causa que la célula muera cuando la célula se pone en contacto con el agente o se expone a él. Los genes suicidas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el gen de timidina cinasa (TK) del herpesvirus simple (HSV), citosina daminasa, nucleósido de purina fosforilasa y nitrorreductasa.

15 Una realización de la invención proporciona además una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "célula hospedadora" hace referencia a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante inventivo. La célula hospedadora puede ser una célula eucariótica, p. ej., plantas, animales, hongos o algas, o puede ser una célula procariótica, p. ej., bacterias o protozoos. La célula hospedadora puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, p. ej., un ser humano. La célula hospedadora puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células hospedadoras adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, células DH5 α de *E. coli*, células ováricas de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. Con fines de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula hospedadora puede ser una célula procariótica, p. ej., una célula DH5 α . Con fines de producir un CAR recombinante, la célula hospedadora puede ser una célula de mamífero. La célula hospedadora puede ser una célula humana. Si bien la célula hospedadora puede ser de cualquier tipo celular, puede originarse de cualquier tipo de tejido y puede ser de cualquier estado de desarrollo, la célula hospedadora puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL) o una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC). La célula hospedadora puede ser un linfocito T.

20 Con los fines del presente documento, el linfocito T puede ser cualquier linfocito T, tal como un linfocito T cultivado, p. ej., un linfocito T primario, o un linfocito T de una línea de linfocitos T cultivados, p. ej., Jurkat, SupT1, etc., o un linfocito T obtenido de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, el linfocito T se puede obtener de numerosas fuentes que incluyen, pero sin limitación, sangre, médula ósea, nódulos linfáticos, el timo u otros tejidos o fluidos. Los linfocitos T también pueden enriquecerse o purificarse. El linfocito T puede ser un linfocito T humano. El linfocito T puede ser un linfocito T aislado de un ser humano. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede estar en cualquier estado de desarrollo, incluidos, pero sin limitación, linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ dobles positivos, linfocitos T auxiliares CD4⁺, p. ej., linfocitos Th₁ y Th₂, linfocitos T CD8⁺ (p. ej., linfocitos T citotóxicos), células infiltrantes de tumores, linfocitos T de memoria, linfocitos T vírgenes y similares. El linfocito T puede ser un linfocito T CD8⁺ o un linfocito T CD4⁺.

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

30 En una realización de la invención, el número de células en la población puede incrementarse rápidamente. El incremento del número de células que expresan el CAR se puede lograr mediante cualquiera de los diversos procedimientos conocidos en la técnica como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 8.034.334; la patente de EE. UU. 8.383.099; la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0244133; Dudley y col., *J. Immunother.*, 26: 332-42 (2003) y Riddell y col., *J. Immunol. Methods*, 128: 189-201 (1990). En una realización, se lleva a cabo el incremento del número de células cultivando los linfocitos T con anticuerpo OKT3, IL-2 y PBMC de alimentación (p. ej., PBMC alogénicas irradiadas).

Los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes y las células hospedadoras (incluidas las poblaciones de las mismas), todos los cuales se denominan colectivamente como "materiales de CAR inventivos" en lo sucesivo, pueden aislarse y/o purificarse. El término "aislado" como se usa en el presente documento significa que se ha retirado de su entorno natural. El término "purificado" o "aislado" no requiere pureza absoluta o aislamiento; más bien, se pretende como un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de célula hospedadora purificada (o aislada) es aquella en la que la célula hospedadora es más pura que las células en su entorno natural dentro del cuerpo. Tales células hospedadoras pueden producirse, por ejemplo, mediante técnicas de purificación estándares. En algunas realizaciones, una preparación de una célula hospedadora se purifica de tal manera que la célula hospedadora representa al menos aproximadamente el 50 %, por ejemplo al menos aproximadamente el 70 %, del contenido celular total de la preparación. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente 50 %, puede ser mayor de aproximadamente 60 %, de aproximadamente 70 % o aproximadamente 80 %, o puede ser de aproximadamente 100 %.

Los materiales de CAR inventivos pueden formularse en una composición, tal como una composición farmacéutica. A este respecto, una realización de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los CAR, ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras (incluidas las poblaciones de las mismas), y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas inventivas que contienen cualquiera de los materiales de CAR inventivos pueden comprender más de un material de CAR inventivo, p. ej., un CAR y un ácido nucleico, o dos o más CAR diferentes. Como alternativa, la composición farmacéutica puede comprender un material de CAR inventivo en combinación con otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterapéuticos, p. ej., asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende la célula hospedadora inventiva o poblaciones de la misma.

Preferiblemente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de los usados convencionalmente para el material de CAR inventivo particular en consideración. Tales portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

La elección del portador estará determinada en parte por el material de CAR inventivo particular, así como por el procedimiento particular usado para administrar el material de CAR inventivo. Por consiguiente, hay una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Las formulaciones adecuadas pueden incluir cualquiera de aquellas para administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal o interperitoneal. Se puede usar más de una vía para administrar los materiales de CAR inventivos, y en ciertos casos, una vía particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra vía.

Preferiblemente, el material de CAR inventivo se administra por inyección, p. ej., por vía intravenosa. Cuando el material de CAR inventivo es una célula hospedadora que expresa el CAR inventivo, el portador farmacéuticamente aceptable para inyección en las células puede incluir cualquier portador isotónico tal como, por ejemplo, solución salina normal (aproximadamente 0,90 % p/v de NaCl en agua, aproximadamente 300 mOsm/l de NaCl en agua, o aproximadamente 9,0 g de NaCl por litro de agua), solución electrolítica NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), aproximadamente 5 % de dextrosa en agua, o Ringer lactato. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable se complementa con albúmina de suero humano.

La dosis del material de CAR inventivo también estará determinada por la existencia, naturaleza y medida de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un material de CAR inventivo en particular. Típicamente, el médico tratante decidirá la dosificación del material inventivo de CAR con la que tratar a cada paciente individual, teniendo en cuenta una variedad de factores, tales como la edad, el peso corporal, la salud general, la dieta, el sexo, el material inventivo de CAR que se administrará, la vía de administración y la gravedad del cáncer que se está tratando. En una realización en la que el material de CAR inventivo es una población de células, el número de células administradas por infusión puede variar, p. ej., de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{12} células o más. En ciertas realizaciones, se pueden administrar menos de 1×10^6 células.

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

Con los fines de la invención, podría usarse un ensayo que comprende, por ejemplo, comparar la medida en que las células diana se lisan y/o se secreta IFN- γ por los linfocitos T que expresan el CAR inventivo tras la administración de una dosis dada de tales linfocitos T a un mamífero, entre un conjunto de mamíferos a los que se les da una dosis diferente de linfocitos T, para determinar la dosis de partida que se administrará a un mamífero. La medida en que las células diana se lisan y/o se secreta IFN- γ tras la administración de una dosis determinada puede ensayarse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que los materiales de CAR inventivos de la invención pueden modificarse de varias maneras, de tal modo que la eficacia terapéutica o profiláctica de los materiales de CAR inventivos aumente mediante la modificación. Por ejemplo, los materiales de CAR inventivos pueden conjugarse directa o indirectamente a través de un ligador con un resto orientativo. Es conocida en la técnica la práctica de conjugar compuestos, p. ej. materiales de CAR inventivos, con restos orientadores.

Cuando los materiales de CAR inventivos se administran con uno o más agentes terapéuticos adicionales, pueden coadministrarse uno o más agentes terapéuticos adicionales al mamífero. Por "coadministración" se entiende administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales y los materiales de CAR inventivos suficientemente próximos en el tiempo, de tal manera que los materiales de CAR inventivos puedan potenciar el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. A este respecto, los materiales de CAR inventivos pueden administrarse primero y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse en segundo lugar, o viceversa. Como alternativa, los materiales de CAR inventivos y el uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar simultáneamente. Un agente terapéutico ejemplar que puede coadministrarse con los materiales de CAR es IL-2. Se cree que IL-2 potencia el efecto terapéutico de los materiales inventivos de CAR.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas inventivas, los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras o las poblaciones de células puedan usarse en procedimientos para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero. Sin limitarse a una teoría o mecanismo particular, los CAR inventivos tienen actividad biológica, p. ej., capacidad de reconocer el antígeno, p. ej., CD70, de tal modo que el CAR cuando se expresa por una célula es capaz de mediar una respuesta inmunitaria contra la célula que expresa el antígeno, p. ej., CD70, para el cual el CAR es específico. A este respecto, una realización de la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras, la población de células y/o las composiciones farmacéuticas de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

Una realización de la invención comprende además terapia linfopenizante en el mamífero antes de administrar los materiales de CAR inventivos. Los ejemplos de terapia linfocitopenizante incluyen, pero sin limitación, quimioterapia linfopenizante no mieloablativa, quimioterapia linfopenizante mieloablativa, irradiación corporal total, etc.

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

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

Con respecto a los procedimientos de la invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluido cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer de vejiga (p. ej., Carcinoma de vejiga), cáncer de huesos, cáncer de cerebro (p. ej., meduloblastoma), cáncer de mama., cáncer de ano, canal anal o ano recto, cáncer de ojo, cáncer de conducto biliar intrahepático, cáncer de articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de cavidad oral, cáncer de vulva, leucemia linfocítica crónica (LLC), cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer cervicouterino, fibrosarcoma, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello (p. ej., carcinoma epidermoide de cabeza y cuello), glioblastoma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, tumores líquidos, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (p. ej., carcinoma pulmonar no microcítico), linfoma, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular maligno, mesotelioma, mastocitoma, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crónica B, tricoleucemia, leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, CCR, CCRcc, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, tumores sólidos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de uréter. Preferiblemente, el cáncer se caracteriza por la expresión de CD70.

En una realización preferida, el cáncer es cualquiera de CCR (por ejemplo, CCRcc), glioblastoma, LNH, LLC, linfoma difuso de células B grandes y linfoma folicular.

Los términos "tratar" y "prevenir", así como las palabras derivadas de los mismos, tal como se usan en el presente documento, no necesariamente implican un 100 % de tratamiento o prevención completos. Por el contrario, hay diversos grados de tratamiento o prevención que un experto en la materia reconoce que tienen un beneficio potencial o efecto terapéutico. A este respecto, los procedimientos inventivos pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el procedimiento inventivo pueden incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, p. ej., cáncer, que se está tratando o previniendo. Además, con los fines del presente documento, "prevención" puede abarcar retrasar el inicio de la enfermedad, o un síntoma o afección de la misma.

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

Otra realización de la invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con los CAR, los ácidos nucleicos, los vectores de expresión recombinantes, las células hospedadoras o la población de células de la invención, formando así un complejo, (b) y detectar el complejo, en la que la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.

La muestra se puede obtener por cualquier procedimiento adecuado, p. ej., biopsia o necropsia. Una biopsia es la retirada de tejido y/o células de un individuo. Tal retirada puede ser para recoger tejido y/o células del individuo con el fin de realizar experimentación en el tejido y/o células retirados. Esta experimentación puede incluir experimentos para determinar si el individuo tiene y/o sufre de una determinada afección o estado patológico. La afección o enfermedad puede ser, p. ej., cáncer.

Con respecto a una realización del procedimiento inventivo para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, la muestra que comprende células del mamífero puede ser una muestra que comprende células enteras, lisados de las mismas o una fracción de los lisados de células enteras, p. ej., una fracción nuclear o citoplasmática, una fracción de proteína completa o una fracción de ácido nucleico. Si la muestra comprende células enteras, las células pueden ser cualquier célula del mamífero, p. ej., las células de cualquier órgano o tejido, incluidas las células sanguíneas o las células endoteliales.

Con los fines del procedimiento de detección inventivo, el contacto puede tener lugar *in vitro* o *in vivo* con respecto al mamífero. Preferiblemente, el contacto es *in vitro*.

Además, la detección del complejo puede ocurrir a través de cualquier número de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los CAR, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células hospedadoras o poblaciones de células inventivos, descritos en el presente documento, pueden marcarse con un marcaje detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un fluoróforo (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE)), una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante) y partículas de elementos (p. ej., partículas de oro).

En la técnica son conocidos procedimientos para ensayar la capacidad de un CAR de reconocer células diana y la especificidad de antígeno. Por ejemplo, Clay et al., J. Immunol., 163: 507-513 (1999), enseñan procedimientos para medir la liberación de citocinas (p. ej., Interferón- γ , factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interleucina 2 (IL-2)). Además, la función del CAR se puede evaluar midiendo la citotoxicidad celular, como se describe en Zhao et al., J. Immunol., 174: 4415-4423 (2005).

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero, por supuesto, no se deberían interpretar como limitantes de ningún modo de su alcance.

EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra la eficacia de transducción de un vector retroviral que codifica un CAR que incluye CD27 de ratón de longitud completa y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ de ratón (CAR mCD27-CD3 ζ) y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y la reactividad del CAR mCD27-CD3 ζ contra células tumorales que expresan mCD70 *in vitro*.

Se construyó un vector retroviral que codifica un CAR que incluye CD27 de ratón de longitud completa y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T CD3 ζ de ratón (CAR mCD27-CD3 ζ) y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. Se transdujeron retroviralmente los linfocitos T murinos con el vector retroviral CAR mCD27-CD3 ζ . Se determinó que la eficacia de transducción era de 62,6 %.

Los linfocitos T de ratón generados a partir de esplenocitos eran no transducidos (UT) o transducidos con un vector que codifica GFP o el CAR mCD27-CD3 ζ (células efectoras) y cultivados solos (medio) o cocultivados con células de melanoma B16 que no expresan CD70 de ratón (células B16) o células B16 que se transdujeron para expresar células diana CD70 de ratón (B16/mCD70). Las células Pmel, que son linfocitos T de ratón que reconocen el tumor B16, se usaron como células efectoras de control positivo. Se midió la secreción de IFN- γ . Los resultados se muestran en la Tabla 2. Como se muestra en la Tabla 2, las células transducidas con el CAR mCD27-CD3 ζ mostraban alta reactividad contra tumores que expresan CD70 *in vitro*.

TABLA 2

	IFN- γ (pg/ml)		
	B16	B16/mCD70	Medio
Medio	0	0	0
pmel	795	1762	0
Linfocitos T de ratón/UT	0	0	0
Linfocitos T de ratón/mGFP	0	0	0
Linfocitos T de ratón/CAR mCD27-CD3ζ	0	642122	0

EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra que los linfocitos T de ratón generados a partir de esplenocitos transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR que incluye CD27 de ratón de longitud completa y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ de ratón (CAR mCD27-CD3 ζ) y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 reducen la carga tumoral y aumentan la supervivencia de ratones portadores de tumor que expresan CD70.

Once días antes de transferir células que expresan CAR a ratones, se establecieron tumores en ratones inyectándoles células B16 o células B16/mCD70. Cuatro días después, se retiraron los esplenocitos de los ratones y se estimularon con concanavalina A (ConA) e IL-7 o CD3 anti-ratón (mCD3) y CD28 soluble (sCD28). Dos días después, se transdujeron los linfocitos T de ratón generados a partir de los esplenocitos estimulados con un vector retroviral MSGV1 que codifica el CAR mCD27-CD3 ζ que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. Cinco días después, se administraron las células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ (1×10^7) a los ratones portadores de tumor, y se irradiaron los ratones (500 rad). A los ratones portadores de tumor de control se les administraron células no transducidas, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o una combinación de células pmel (pmel), una vacuna de gp100 (V) e IL-2 (I) ("pmel + VI") y se irradiaron. Se midió el tamaño de los tumores durante un período de tiempo de hasta aproximadamente 35 días después del tratamiento. Los resultados se muestran en las Figuras 1A-1B. Como se muestra en las Figuras 1A-1B, las células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ reducían la carga tumoral en ratones portadores de tumor B16/mCD70, pero no en ratones portadores de tumor B16. Por consiguiente, los ratones portadores de tumores CD70+ podrían tratarse con éxito con células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ , y el tratamiento era específico de CD70.

El experimento se repitió con ratones portadores de tumores B16/mCD70, excepto que los esplenocitos fueron estimulados con anti-mCD3 y sCD28, y se administró también a los ratones IL-2 después de la irradiación y administración de células transducidas. A los ratones portadores de tumor de control se les administraron células no transducidas, células transducidas con un vector vacío o pmel + VI, seguido de irradiación y administración de IL-2. Se midió el tamaño de los tumores durante un período de tiempo de hasta aproximadamente 24 días después del tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 1F. Como se muestra en la Figura 1F, cuando se coadministraron con IL-2, las células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ reducían la carga tumoral en ratones portadores de tumor B16/mCD70.

Veintiún días después de la transferencia celular, los tumores se retiraron de los ratones tratados y se cultivaron *in vitro* durante siete días. Se midió la expresión de CD70 de ratón en los tumores mediante FACS. Se observó que la expresión de CD70 se perdía en ratones tratados con células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ , pero no en ratones tratados con Pmel + V o células no transducidas. Sin limitarse a una teoría o mecanismo particular, se cree que la recurrencia del crecimiento tumoral se debía muy probablemente a la pérdida de la expresión de CD70 en los tumores B16/mCD70.

Se repitió de nuevo el experimento correspondiente al de la Figura 1B con ratones portadores de tumor B16/mCD70, con las siguientes excepciones. A los ratones portadores de tumor B16/mCD70 se les administraron células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ a una dosis de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 o 1×10^7 células por ratón con o sin irradiación (500 Rad). A los ratones portadores de tumor de control se les administró PBS, pmel + VI o linfocitos T de ratón que se transdujeron con un vector vacío con o sin irradiación (500 Rad). Los resultados se muestran en la

Figuras 1C-1D. Como se muestra en la Figura 1C, la dosis eficaz mínima para tratar tumores era de 1×10^5 células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ por ratón cuando se irradiaban ratones. Como se muestra en las Figuras 1C-1D, a una dosis de 1×10^7 células por ratón, la irradiación no parecía afectar la eficacia del tratamiento.

- 5 Se evaluó también la supervivencia de los ratones portadores de tumor durante un período de tiempo de hasta aproximadamente 42 días después del tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 1E. Como se muestra en la Figura 1E, los ratones irradiados portadores de tumor tratados con las células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ sobrevivían más tiempo, particularmente a dosis de 1×10^6 o 1×10^7 células por ratón.

10 EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra que la administración de células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ a ratones portadores de tumor da como resultado cierta toxicidad. Este ejemplo también demuestra que los ratones pueden recuperarse de la toxicidad.

- 15 A los ratones portadores de tumor B16 o B16/mCD70 se les administraron células no transducidas o células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, PBS o pmel + V, con o sin irradiación (500 Rad). Se midió el peso promedio de los ratones durante un período que comenzaba aproximadamente seis días después de la transferencia celular hasta aproximadamente 17 días después del tratamiento. Los resultados se muestran en las Figuras 2A-2D. Como se muestra en las Figuras 2A-2D, se observaron pesos corporales transitorios menores tanto para ratones portadores de tumor B16/mCD70 como B16 que fueron tratados con CAR mCD27-CD3 ζ . El menor peso corporal observado en los ratones tratados con CAR mCD27-CD3 ζ era irrelevante para los tumores implantados. Sin limitarse a una teoría o mecanismo particular, se cree que el peso corporal menor implica que células endógenas eran la diana del CAR mCD27-CD3 ζ . Los ratones recuperaron el peso corporal perdido cuando se les administró un hidrogel que contenía agua, hidrocoloides, ácido alimentario y benzoato de sodio.

- 30 A los ratones portadores de tumores B16 o B16/mCD70 se les administraron células no transducidas o células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, o células transducidas con un vector que codifica GFP, con o sin irradiación (500 Rad). Se midió el recuento absoluto de glóbulos blancos (WBC) en los ratones durante un período que comenzaba aproximadamente seis días después de la transferencia celular hasta aproximadamente 14 días después del tratamiento. Los resultados se muestran en las Figuras 2E-2H. Como se muestra en las Figuras 2E-2F, se observó un recuento transitorio menor de WBC en los ratones que se trataron con CAR mCD27-CD3 ζ . Como se muestra en las Figuras 2G-2H, también se observó un recuento transitorio de esplenocitos menor en los ratones que se trataron con CAR mCD27-CD3 ζ .

- 40 A los ratones portadores de tumor B16/mCD70 se les administraron células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o células transducidas con un vector que codifica GFP, con o sin irradiación (500 Rad). Se midieron los niveles séricos de IFN- γ durante un período que comenzaba aproximadamente tres días después de la transferencia celular hasta aproximadamente siete días después del tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 2I. Como se muestra en la Figura 2I, se observó secreción transitoria de IFN- γ en los ratones irradiados tratados con CAR mCD27-CD3 ζ .

45 EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra que la administración de CAR mCD27-CD3 ζ no tiene un efecto mensurable sobre la función inmunitaria a largo plazo de ratones no portadores de tumor.

- 50 A los ratones no portadores de tumor se les administraron células transducidas con CAR mCD27-CD3 ζ que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 o células transducidas con un vector que codifica GFP (GFP), con o sin irradiación (500 Rad). Se inmunizaron los ratones con ovoalbúmina (OVA) o gp100 humana (h) 32 o 50 días después de la transferencia de células transducidas. Se retiraron linfocitos T del bazo y el nódulo linfático (NL) de los ratones siete días después de la inmunización. Se estimularon las células *in vitro* con péptido OT-1, OT-II o hgp100. Los resultados se muestran en la Tabla 3 (Día 32 - bazo), la Tabla 4 (Día 32 - NL) y la Tabla 5 (Día 50 - bazo). En la Tabla 5, se usaron ratones C57BL/6 inmunizados (inmunocompetentes) (B6/Im) como control positivo. Se usaron ratones C57BL/6 no tratados (B6/no tratado) como control negativo. Como se muestra en las Tablas 3-5, la administración de CAR mCD27-CD3 ζ no tiene un efecto mensurable sobre la función inmunitaria a largo plazo de los ratones no portadores de tumor.

- 60 Se examinó la histología de diversos órganos, incluidos el cerebro, los pulmones, el hígado, los riñones, el intestino, el corazón, el bazo y los huesos, de 3 a 7 días después de la transferencia celular. Se examinó la química de la sangre, en particular, los niveles sanguíneos de sodio, potasio, cloruro, calcio, magnesio, fósforo, glucosa, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina, ácido úrico, albúmina, proteínas, colesterol, triglicéridos, fosfatasa alcalina (ALK P), alanina aminotransferasa (ALT/GPT), aspartato aminotransferasa (AST/GOT), amilasa, creatina cinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LD) de 3 días a 7 días después de la transferencia celular. No se observaron cambios en la histología ni en la química sanguínea.

TABLA 3

Inmunizado con:	OVA				hgp100	
Estimulado con:	OT-I		OT-II		hgp100	
mCD27 - CD3 ζ CAR (500 Rad)	<u>2263</u>	54	44	48	<u>1293</u>	<32
GFP (500 Rad)	<u>1130</u>	84	67	60	<u>177</u>	40
CAR mCD27-CD3 ζ	<u>347</u>	<32	<32	<32	<u>298</u>	<32
GFP	<u>933</u>	96	96	93	<u>544</u>	80

TABLA 4

Inmunizado con:	OVA				hgp100	
Estimulado con:	OT-I		OT-II		hgp100	
CAR mCD27-CD3 ζ (500 Rad)	<32	<32	<u>12980</u>	<32	<35	<32
GFP (500 Rad)	62	<32	<u>230</u>	<32	<35	45
CAR mCD27 - CD3 ζ	<u>235</u>	66	<u>557</u>	32	<u>301</u>	139
GFP	<u>121</u>	<32	<u>340</u>	35	<35	<32

5

TABLA 5

Inmunizado con:	OVA				hgp100	
Estimulado con:	OT-I		OT-II		hgp100	
CAR mCD27-CD3 ζ (500 Rad)	<u>1708</u>	24	<u>575</u>	<32	<32	<32
GFP (500 Rad)	<u>498</u>	114	<u>4429</u>	122	<32	<32
CAR mCD27-CD3 ζ	<u>1219</u>	77	<u>995</u>	<32	<32	<32
GFP	<u>371</u>	<32	<u>370</u>	<32	67	<32
B6/Im	<u>1138</u>	79	<u>245</u>	39	<u>119</u>	33
B6/no tratado	<32	<32	134	70	<32	<32

EJEMPLO 5

10 Este ejemplo demuestra que los linfocitos T transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR que incluye CD27 humano de longitud completa y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3 ζ humano (CAR fCD27-CD3 ζ) expresan el CAR después del incremento de los números de células transducidas.

15 Se estimularon PBL de forma inespecífica con OKT3 y los linfocitos T generados a partir de PBL (a) no se transdujeron (UT), (b) se transdujeron con una secuencia de nucleótidos que codifica CD27 humano de longitud completa (fCD27), o (c) se transdujeron con una secuencia de nucleótidos que codifica el CAR fCD27-CD3 ζ que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Se cultivaron las células, se analizó la expresión de CAR mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y se ensayó la reactividad tumoral basándose en la producción de IFN- γ . Se incrementaron rápidamente (REP) los números de células reactivas con CD70, en general como se describe en Riddell et al., J. Immunol. Methods, 128: 189-201 (1990). Se hicieron crecer los números de células incrementados y se analizó la expresión de CD27, CD70, CD45RO y CD62L por FACS. La Tabla 6 muestra el porcentaje de células con los fenotipos indicados medidos por FACS. La Tabla 7 muestra el incremento en veces y la viabilidad (%) de las células después de la estimulación (pero antes de REP) y después de REP. Como se muestra en las Tablas 6 y 7, los números incrementados de células transducidas expresan el CAR y son viables y

25 tienen un fenotipo de memoria efectora.

TABLA 6

		UT	fCD27	CAR fCD27-CD3 ζ
Después de la estimulación y antes de REP	CD27+/CD70+	10,84 %	2,04 %	3,27 %
	CD27-/CD70+	25,85 %	0,53 %	0,36 %

		UT	fCD27	CAR fCD27-CD3ζ
	CD27+/CD70-	44,82 %	85,18 %	94,55 %
	CD27-/CD70-	18,49 %	12,24 %	1,82 %
	CD45RO+/CD62L+	48,97 %	29,02 %	39,77 %
	CD45RO-/CD62L+	8,14 %	7,38 %	6,50 %
	CD45RO+/CD62L-	31,70 %	48,63 %	47,27 %
	CD45RO-/CD62L-	11,19 %	14,97 %	6,47 %
Después de REP	CD27+/CD70+	5,20 %	4,93 %	0,45 %
	CD27-/CD70+	70,02 %	12,53 %	0,12 %
	CD27+/CD70-	11,01 %	71,76 %	91,84 %
	CD27-/CD70-	13,77 %	10,78 %	7,59 %
	CD45RO+/CD62L+	17,42 %	14,52 %	12,39 %
	CD45RO-/CD62L+	2,40 %	1,59 %	5,53 %
	CD45RO+/CD62L-	72,9 %	73,98 %	44,37 %
	CD45RO-/CD62L-	7,40 %	9,90 %	37,70 %

TABLA 7

		Incremento en veces	Viabilidad (%)
Después de la estimulación y antes de REP	UT	6	88
	fCD27	3	84
	CAR fCD27-CD3ζ	3	70
Después de REP	UT	720	86
	fCD27	560	75
	CAR fCD27-CD3ζ	790	79

EJEMPLO 6

5 Este ejemplo demuestra que los linfocitos T transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR que incluye CD27 humano de longitud completa y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ humano (CAR fCD27-CD3ζ) proliferan tras cocultivo con células que expresan CD70 y reconocen específicamente líneas celulares tumorales que expresan CD70 *in vitro*.

10 Se generaron linfocitos T a partir de PBL humanos. Se cultivaron linfocitos T no transducidos (UT) o linfocitos T transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica fCD27 o el CAR fCD27-CD3ζ (células efectoras) solos o se cocultivaron con la línea de células tumorales que expresan CD70 624mel o células 624mel transducidas con CD70 (624/CD70) (células diana). Se midió la proliferación de las células efectoras usando éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) el día 4 del cocultivo. Los linfocitos T transducidos con el CAR fCD27-CD3ζ proliferaban solo cuando se cocultivaban con la línea celular tumoral que expresa CD70 624/CD70. Los linfocitos T UT y linfocitos T transducidos con fCD27 no proliferaban en ningún cultivo.

20 Se cultivaron linfocitos T UT o linfocitos T transducidos con una secuencia de nucleótidos que codifica fCD27 o el CAR fCD27-CD3ζ (SEQ ID NO: 7) (células efectoras) solos (medio) o se cocultivaron con una de las líneas celulares de CCR humanas o líneas celulares de control 624, 624/CD70, SNU245, SNU1079 o SNU1196 (células diana) mostradas en la Tabla 8 a continuación. Todas las líneas celulares de SNU eran negativas de CD70. Se midió la secreción de IFN-γ. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Como se muestra en la Tabla 8, los linfocitos T transducidos con una secuencia de nucleótidos del CAR fCD27-CD3ζ (SEQ ID NO: 7) eran reactivas contra líneas celulares de CCR humanas que expresan CD70.

TABLA 8

	Expresión de CD70	IFN-γ (pg/ml)		
		UT	fCD27	CAR fCD27-CD3ζ
624	Negativa (Neg)	39	170	87
624/CD70	Positiva (Pos)	29	173	6485
RCC 2219R	Pos	61	147	12068
RCC 2245R	Pos	29	103	9108
RCC 2095R	Pos	40	210	5819
RCC 1581	Pos	41	163	11797
RCC 2246R	Pos	27	94	8221
RCC 2657R	Pos	17	48	3510
RCC 2361R	Pos	14	48	2256
RCC 2261R	Pos	60	129	7267
RCC 2654R	Pos	38	150	7894
SNU245	Neg	86	150	36
SNU1079	Neg	70	110	33
SNU1196	Neg	35	85	25
Medio	-	185	389	53

EJEMPLO 7

5 Este ejemplo demuestra la eficacia de transducción de constructos de CAR humanos anti-CD70.

10 Se transdujeron los linfocitos T humanos con un vector retroviral vacío (ficticio) o un vector retroviral que codifica uno de los constructos expuestos en las Tablas 9A-9C. Los CAR que incluyen un CD27 truncado (Δ) carecen de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27, es decir, el CD27 truncado carece de los residuos de aminoácidos contiguos 212-260 de SEQ ID NO: 2. Se analizó en las células transducidas la expresión de CD3, CD27, CD62L y CD45RO por FACS. Las Tablas 9A-9C muestran el porcentaje de células con los fenotipos indicados medidos por FACS. Como se muestra en la Tabla 9B, las células transducidas con CAR tienen un fenotipo de memoria efectora.

15

TABLA 9A

	Fenotipo (%)			
	CD3+/CD27+	CD3+/CD27-	CD3-/CD27+	CD3-/CD27-
(f) CD27-CD3ζ (SEQ ID NO: 7) de longitud completa	75,90	5,85	16,00	2,23
(Δ) CD27-CD28 - CD3ζ truncado (SEQ ID NO: 8)	44,30	51,60	0,70	3,41
ΔCD27-4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 9)	60,20	27,90	8,16	3,71
ΔCD27-CD28- 4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 10)	16,0	80,30	0,30	3,39
fCD27-CD28 - CD3ζ (SEQ ID NO: 11)	3,11	93,90	0,037	2,98
fCD27-4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 12)	60,70	29,20	5,98	4,10
fCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 13)	60,80	23,40	9,66	6,08
Ficticio (control) (vector vacío)	0,26	97,50	6,75 x 10 ⁻³	2,28

TABLA 9B

	Fenotipo (%)			
	CD45RO+/ CD62L+	CD45RO+/ CD62L-	CD45RO-/ CD62L+	CD45RO-/ CD62L-
(f) CD27-CD3 ζ (SEQ ID NO: 7) de longitud completa	68,30	23,50	6,13	2,03
(Δ) CD27-CD28 - CD3 ζ (SEQ ID NO: 8) truncado	84,70	9,52	4,49	1,25
Δ CD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 9)	74,00	20,20	4,20	1,60
Δ CD27-CD28 - 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 10)	86,40	7,83	4,54	1,19
fCD27-CD28 - CD3 ζ (SEQ ID NO: 11)	87,70	9,72	1,76	0,86
fCD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 12)	69,10	22,70	5,80	2,35
fCD27-CD28 - 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 13)	73,20	13,90	10,20	2,72
Ficticio (control) (vector vacío)	85,50	11,60	2,11	0,73

TABLA 9C

	Fenotipo (%)			
	CD27+/CD70+	CD27+/CD70-	CD27-/CD70+	CD27-/CD70-
(f) CD27-CD3 ζ (SEQ ID NO: 7) de longitud completa	1,63	96,40	0,10	1,89
(Δ) CD27-CD28 - CD3 ζ (SEQ ID NO: 8) truncado	0,69	90,80	0,46	8,06
Δ CD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 9)	0,77	95,40	0,057	3,77
Δ CD27-CD28 - 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 10)	0,42	83,80	0,66	15,10
fCD27-CD28 - CD3 ζ (SEQ ID NO: 11)	9,30	68,10	11,60	11,0
fCD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 12)	1,09	92,20	0,16	6,55
fCD27-CD28 - 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 13)	2,04	92,70	0,11	5,18
Ficticio (control) (vector vacío)	1,67	28,50	51,30	18,50

5 EJEMPLO 8

Este ejemplo demuestra que los linfocitos T humanos transducidos con fCD27-CD3 ζ (SEQ ID NO: 7), Δ CD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 9), Δ CD27-CD28 - 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 10), fCD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 12) o fCD27-CD28 - 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 13) reconocen las células tumorales RCC que expresan CD70 *in vitro*.

10 Se transdujeron linfocitos T humanos con un vector retroviral vacío (MSGV1) o un vector retroviral que codifica uno de los constructos expuestos en la Tabla 9A. Se cultivaron las células transducidas solas (medio) o se cocultivaron con las células diana de control 624mel, 624/CD70, 938mel o células 938mel transducidas para expresar CD70 (938/CD70) o células diana RCC 2245R, RCC 2246R, RCC 2361R, o RCC 1764. Se midió la secreción de IFN- γ . Los resultados se muestran en la Figura 3. Como se muestra en la Figura 3, los linfocitos T humanos transducidos con fCD27-CD3 ζ (SEQ ID NO: 7), Δ CD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 9), Δ CD27-CD28 - 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 10), fCD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 12) o fCD27-CD28 - 4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 13) reconocen las células tumorales RCC que expresan CD70 *in vitro*.

20 EJEMPLO 9

Este ejemplo demuestra la selección de un vector retroviral Δ CD27-4-1BB - CD3 ζ (SEQ ID NO: 9) que produce un clon de empaquetamiento.

Los clones A2, A10, B3, C1, E3, G2 de la línea celular de empaquetamiento retrovítico PG13 no se transdujeron o se transdujeron con un vector retrovítico que codifica ΔCD27-4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 9). La Tabla 10 muestra el porcentaje de células con los fenotipos indicados medidos por FACS.

5

TABLA 10

	Fenotipo (%)			
	CD3+/CD27+	CD3-/CD27+	CD3+/CD27-	CD3-/CD27-
A2	32,6	0,30	65,9	1,16
A10	31,0	0,34	67,7	0,94
B3	27,6	0,25	71,2	0,91
C1	30,0	0,33	68,7	0,94
E3	40,9	0,40	57,8	0,95
G2	18,6	0,17	80,3	0,95
Sin transducir (UT)	0,12	0,020	98,6	1,28

Se cultivaron los clones transducidos solos (medio) o se cocultivaron con las células de control diana 938mel, 938/CD70, SNU1079, SNU1196 o las líneas celulares diana RCC RCC 2245R, RCC 2246R, RCC 2361R o RCC 1764. Se midió la secreción de IFN-γ. Los resultados se muestran en la Figura 4. Como se muestra en la Figura 4, el clon de empaquetamiento retrovítico E3 demostró reactividad contra líneas celulares tumorales diana que expresan CD70.

10

Se transdujeron los clones celulares de empaquetamiento retrovítico con un CAR como se expone en la Tabla 11. La Tabla 11 muestra el porcentaje de células con los fenotipos indicados medidos por FACS.

15

TABLA 11

	Fenotipo (%)			
	CD3+/CD27+	CD3-/CD27+	CD3+/CD27-	CD3-/CD27-
PG13/B11/fCD27-CD3ζ (SEQ ID NO: 7)	73,5	1,37	24,5	0,62
PG13/A2/ΔCD27-4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 9)	34,7	0,57	63,5	1,18
PG13/E3/ΔCD27-4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 9)	50,7	1,23	47,0	1,07
PG13/C5/fCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 13)	45,7	1,48	51,4	1,43
RD114/D2/fCD27-CD28 - 4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 13)	30,7	0,65	67,8	0,91
Sin transducir (UT)	0,26	3,45 x 10 ⁻³	98,9	1,71

Se cultivaron los clones transducidos solos (medio) o se cocultivaron con las células de control diana 938mel, 938/CD70, SNU1079, SNU1196 o las líneas celulares diana RCC RCC 2245R, RCC 2246R, RCC 2361R o RCC 1764. Se midió la secreción de IFN-γ. Los resultados se muestran en la Figura 5. Como se muestra en la Figura 5, el clon de empaquetamiento retrovítico E3 demostró reactividad contra líneas celulares tumorales diana que expresan CD70.

20

En base a su eficacia de transducción y actividad tumoral, se eligió el clon de empaquetamiento retrovítico E3/ΔCD27-4-1BB - CD3ζ (SEQ ID NO: 9) para uso clínico.

25

El uso de los términos "uno" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar de modo que cubra tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan "incluyendo, pero sin limitación") a menos que se indique de otro modo. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento pretende servir simplemente como un procedimiento abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor separado que esté dentro del intervalo, a menos que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado individualmente en el presente documento. Todos los procedimientos

30

35

5 descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o del vocabulario ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, pretende simplemente iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se indique de otro modo. Ningún vocabulario en la memoria descriptiva se debe interpretar de forma que indique que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

10 Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en el presente documento, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de esas realizaciones preferidas pueden hacerse evidentes para los expertos en la materia al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores tienen la intención de que la invención se practique de otra manera que la descrita específicamente en el presente documento. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia en cuestión enumeradas en las reivindicaciones adjuntas a la misma, según lo permitido por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos está abarcada por la invención a
15 menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, REPRESENTADOS POR LA SECRETARÍA DEL DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS
- <120> RECEPTORES DE ANTIGENO QUIMÉRICO ANTI-CD70
- <130> 720305
- 10 <150> US 62/088.882
- <151> 12/08/2014
- <160> 27
- 15 <170> PatentIn versión 3,5
- <210> 1
- <211> 193
- 20 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
 1          5              10          15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
          20              25          30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
          35              40          45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
          50              55          60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
65          70              75          80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
          85              90          95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
          100             105          110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
          115             120          125

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
          130             135          140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
145          150             155          160
    
```

25

ES 2 745 153 T3

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
 165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
 180 185 190

Pro

<210> 2

<211> 260

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
 20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
 115 120 125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
 130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
 145 150 155 160

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
 165 170 175

10

ES 2 745 153 T3

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
 180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
 195 200 205

Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser
 210 215 220

Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro
 245 250 255

Ala Cys Ser Pro
 260

<210> 3
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
 20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
 115 120 125

10

ES 2 745 153 T3

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
 130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
 145 150 155 160

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
 165 170 175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
 180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
 195 200 205

Leu Phe Leu
 210

<210> 4
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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

10 <210> 5
 <211> 47
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 5

ES 2 745 153 T3

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

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

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

<210> 6
<211> 41
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 6

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

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

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

10

<210> 7
<211> 372
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Sintética

20

<400> 7

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
65 70 75 80

ES 2 745 153 T3

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
115 120 125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
145 150 155 160

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
165 170 175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
195 200 205

Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser
210 215 220

Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu
225 230 235 240

Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro
245 250 255

Ala Cys Ser Pro Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
260 265 270

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
275 280 285

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
290 295 300

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
305 310 315 320

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
325 330 335

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
340 345 350

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
355 360 365

Leu Pro Pro Arg
370

ES 2 745 153 T3

<210> 8
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

10

<400> 8

```

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
 1          5          10          15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
          20          25          30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
          35          40          45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50          55          60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
65          70          75          80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
          85          90          95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
          100          105          110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
          115          120          125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
          130          135          140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
145          150          155          160
    
```

ES 2 745 153 T3

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
 165 170 175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
 180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
 195 200 205

Leu Phe Leu Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 210 215 220

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 225 230 235 240

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe
 245 250 255

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 260 265 270

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 275 280 285

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 290 295 300

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 325 330 335

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 340 345 350

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 355 360

- <210> 9
- <211> 370
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintética
- 10 <400> 9

ES 2 745 153 T3

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
115 120 125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
145 150 155 160

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
165 170 175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
195 200 205

Leu Phe Leu Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu
210 215 220

Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu
225 230 235 240

Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys
245 250 255

ES 2 745 153 T3

Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 260 265 270

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 275 280 285

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

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 305 310 315 320

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 325 330 335

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 340 345 350

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 355 360 365

Pro Arg
 370

<210> 10
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 10

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
 20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
 65 70 75 80

5

10

ES 2 745 153 T3

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95
 Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110
 Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
 115 120 125
 Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
 130 135 140
 Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
 145 150 155 160
 Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
 165 170 175
 His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
 180 185 190
 Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
 195 200 205
 Leu Phe Leu Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 210 215 220
 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 225 230 235 240
 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Val
 245 250 255
 Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
 260 265 270
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
 275 280 285
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser
 290 295 300
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 305 310 315 320
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 325 330 335

ES 2 745 153 T3

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 340 345 350

Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 355 360 365

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 370 375 380

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 385 390 395 400

Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 405 410

<210> 11
 <211> 413
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 11

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
 20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
 115 120 125

ES 2 745 153 T3

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
145 150 155 160

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
165 170 175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
195 200 205

Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser
210 215 220

Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu
225 230 235 240

Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro
245 250 255

Ala Cys Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr
260 265 270

Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln
275 280 285

Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys
290 295 300

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
305 310 315 320

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
325 330 335

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
340 345 350

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
355 360 365

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
370 375 380

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
385 390 395 400

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
405 410

5 <210> 12
<211> 419
<212> PRT

ES 2 745 153 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

5

<400> 12

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

ES 2 745 153 T3

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
 180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
 195 200 205

Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser
 210 215 220

Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro
 245 250 255

Ala Cys Ser Pro Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 260 265 270

Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 275 280 285

Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 290 295 300

Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 305 310 315 320

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 325 330 335

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 340 345 350

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 355 360 365

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 370 375 380

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 385 390 395 400

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 405 410 415

Pro Pro Arg

<210> 13
 <211> 460
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 13

ES 2 745 153 T3

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
 20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
 115 120 125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
 130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
 145 150 155 160

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
 165 170 175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
 180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
 195 200 205

ES 2 745 153 T3

Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser
 210 215 220

Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro
 245 250 255

Ala Cys Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr
 260 265 270

Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln
 275 280 285

Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ser
 290 295 300

Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
 305 310 315

Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
 325 330 335

Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe
 340 345 350

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 355 360 365

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 370 375 380

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 385 390 395 400

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 405 410 415

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 420 425 430

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 435 440 445

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

<210> 14
 <211> 1119
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 14

ES 2 745 153 T3

```

atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc gttctgggga ccctggtggg gctctcagct      60
actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctcagggaaa gctgtgctgc      120
cagatgtgtg agccaggaac attcctcgtg aaggactgtg accagcatag aaaggctgct      180
cagtgtgatc cttgcatacc gggggtctcc ttctctcctg accaccacac ccggccccac      240
tgtgagagct gtcggcactg taactctggg cttctcgttc gcaactgcac catcaactgcc      300
aatgctgagt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg caccgagtgt      360
gatcctcttc caaaccttc gctgaccgct cggtcgtctc aggcctgag cccacaccct      420
cagcccaccc acttaccta tgtcagtgag atgctggagg ccaggacagc tgggcacatg      480
cagactctgg ctgacttcag gcagctgcct gcccgactc tctctacca ctggccaccc      540
caaagatccc tgtgcagctc cgatthtatt cgcaccttg tgatcttctc tggaatgttc      600
cttgttttca ccctggccgg ggcctgttc ctccatcaac gaaggaata tagatcaaac      660
aaaggagaaa gtcctgtgga gcctgcagag ccttgtcgtt acagctgcc cagggaggag      720
gagggcagca ccatcccat ccaggaggat taccgaaaac cggagcctgc ctgtccccc      780
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcaggcca gaaccagctc      840
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc      900
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat      960
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc     1020
cggaggggca aggggcacga tggcctttac caggtctca gtacagccac caaggacacc     1080
tacgacgccc ttcacatgca ggcctgccc cctcgctaa                               1119

```

<210> 15
 <211> 1095
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 15

```

atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc gttctgggga ccctggtggg gctctcagct      60
actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctcagggaaa gctgtgctgc      120
cagatgtgtg agccaggaac attcctcgtg aaggactgtg accagcatag aaaggctgct      180

```

ES 2 745 153 T3

cagtgtgac cttgcataacc gggggtctcc ttctctcctg accaccacac ccggccccac 240
 tgtgagagct gtcggcactg taactctggg cttctcgttc gcaactgcac catcactgcc 300
 aatgctgagt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg caccgagtgt 360
 gatcctcttc caaaccttc gctgaccgct cggtcgtctc aggcctgag cccacaccct 420
 cagcccaccc acttacctta tgtcagtgag atgctggagg ccaggacagc tgggcacatg 480
 cagactctgg ctgacttcag gcagctgcct gcccggaactc tctctaccca ctggccaccc 540
 caaagatccc tgtgcagctc cgatthtatt cgcacccctg tgatcttctc tggaatgttc 600
 cttgttttca ccctggccgg ggccctgttc ctcaggagta agaggagcag gctcctgcac 660
 agtgactaca tgaacatgac tccccgccgc cccgggccc aaccgcaagca ttaccagccc 720
 tatgccccac cacgcgactt cgcagcctat cgctccagag tgaagttcag caggagcgca 780
 gagcccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga 840
 agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag 900
 ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg 960
 gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc 1020
 cttaccaggt gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccttca catgcaggcc 1080
 ctgccccctc gctaa 1095

<210> 16
 <211> 1113
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 16

atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc gttctgggga ccctgggtggg gctctcagct 60
 actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctcagggaaa gctgtgctgc 120
 cagatgtgtg agccaggaaac attcctcgtg aaggactgtg accagcatag aaaggctgct 180
 cagtgtgac cttgcataacc gggggtctcc ttctctcctg accaccacac ccggccccac 240
 tgtgagagct gtcggcactg taactctggg cttctcgttc gcaactgcac catcactgcc 300
 aatgctgagt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg caccgagtgt 360
 gatcctcttc caaaccttc gctgaccgct cggtcgtctc aggcctgag cccacaccct 420
 cagcccaccc acttacctta tgtcagtgag atgctggagg ccaggacagc tgggcacatg 480
 cagactctgg ctgacttcag gcagctgcct gcccggaactc tctctaccca ctggccaccc 540
 caaagatccc tgtgcagctc cgatthtatt cgcacccctg tgatcttctc tggaatgttc 600

ES 2 745 153 T3

cttgttttca ccctggcccg ggcctgttc ctcctgttct ctggtgttaa acggggcaga 660
 aagaagctcc tgtatatatt caaacaacca tttatgagac cagtacaac tactcaagag 720
 gaagatggct gtagctgccg atttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg 780
 aagttcagca ggagcgcaga ccccccccg taccagcagg gccagaacca gctctataac 840
 gagctcaatc taggacgaag agaggagtac gatgtttttg acaagagacg tggccgggac 900
 cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag aacctcagg aaggcctgta caatgaactg 960
 cagaaagata agatggcggg ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg 1020
 ggcaaggggc acgatggcct ttaccaggt ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac 1080
 gccttcaca tgcaggccct gccccctgc taa 1113

<210> 17
 <211> 1236
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 17

atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc gttctgggga ccctggtggg gctctcagct 60
 actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctcaggaaa gctgtgctgc 120
 cagatgtgtg agccaggaac attcctcgtg aaggactgtg accagcatag aaaggctgct 180
 cagtgtgatc cttgcatacc gggggtctcc ttctctcctg accaccacac ccggccccac 240
 tgtgagagct gtcggcactg taactctggt cttctcgttc gcaactgcac catcactgcc 300
 aatgctgagt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg caccgagtgt 360
 gatcctcttc caaaccttc gctgaccgct cggctcgttc aggcctgag cccacaccct 420
 cagcccaccc acttacctta tgtcagtgag atgctggagg ccaggacagc tgggcacatg 480
 cagactctgg ctgacttcag gcagctgcct gccggactc tctctacca ctggccaccc 540
 caaagatccc tgtgcagctc cgattttatt cgcatecttg tgatcttctc tggaatgttc 600
 cttgttttca ccctggcccg ggcctgttc ctcaggagta agaggagcag gctcctgcac 660
 agtgactaca tgaacatgac tccccccgc cccgggcca cccgcaagca ttaccagccc 720
 tatgccccac cacgcgactt cgcagcctat cgctcccgtt tctctgttgt taaacggggc 780
 agaaagaagc tcctgtatat attcaaaca ccatttatga gaccagtaca aactactcaa 840
 gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 900
 gtgaagttca gcaggagcgc agaccccc gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat 960
 aacgagctca atctagacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggcccg 1020
 gacctgaga tgggggaaa gccgagaagg aagaacctc aggaaggcct gtacaatgaa 1080
 ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcggcg 1140
 aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1200
 gacgcccctc acatgcaggc cctgccccct cgctaa 1236

ES 2 745 153 T3

<210> 18
 <211> 1242
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

<400> 18

10

```

atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc gttctgggga ccctggtggg gctctcagct      60
actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctcagggaaa gctgtgctgc      120
cagatgtgtg agccaggaac attcctcgtg aaggactgtg accagcatag aaaggtgct      180
cagtgtgatc cttgcatacc gggggtctcc ttctctcctg accaccacac ccggccccac      240
tgtgagagct gtcggcactg taactctggt cttctcgttc gcaactgcac catcactgcc      300
aatgctgagt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg caccgagtgt      360
gatcctcttc caaaccttc gctgaccgct cggtcgtctc aggccctgag cccacaccct      420
cagcccaccc acttaccta tgtcagttag atgctggagg ccaggacagc tgggcacatg      480
cagactctgg ctgacttcag gcagctgcct gcccgactc tctctacca ctggccaccc      540
caaagatccc tgtgcagctc cgattttatt cgcaccttg tgatcttctc tggaatgttc      600
cttgttttca ccctggccgg ggcctgttc ctccatcaac gaaggaaata tagatcaaac      660
aaaggagaaa gtcctgtgga gcctgcagag cettgtcgtt acagctgcc cagggaggag      720
gagggcagca ccatccccat ccaggaggat taccgaaaac cggagcctgc ctgctcccc      780
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgcccaccc      840
ggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gcccaccac gcgacttcgc agcctatcgc      900
tccagagtga agttcagcag gagcgcagac gccccgcgt accagcaggg ccagaaccag      960
ctctataacg agctcaatct aggacgaaga gaggagtacg atgttttggg caagagacgt     1020
ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg agaaggaaga accctcagga aggcctgtac     1080
aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag     1140
cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac     1200
acctaagacg cccttcacat gcaggcctg cccctcgt aa                               1242
    
```

<210> 19
 <211> 1260
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sintética

20

<400> 19

ES 2 745 153 T3

atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc gttctgggga ccctggtggg gctctcagct 60
actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctccaggaaa gctgtgctgc 120
cagatgtgtg agccaggaac attcctogtg aaggactgtg accagcatag aaaggctgct 180
cagtgtgatc cttgcatacc gggggtctcc ttctctcctg accaccacac ccggccccac 240
tgtgagagct gtcggcactg taactctggt cttctcgttc gcaactgcac catcactgcc 300
aatgctgagt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg caccgagtgt 360
gatcctcttc caaaccttc gctgaccgct cggctcgttc aggccctgag cccacaccct 420
cagccccacc acttaccta tgtcagtgag atgctggagg ccaggacagc tgggcacatg 480
cagactctgg ctgacttcag gcagctgcct gcccgactc tctctacca ctggccaccc 540
caaagatccc tgtgcagctc cgattttatt cgcaccttg tgatcttctc tggaatgttc 600
cttgttttca ccctggccgg ggcctgttc ctccatcaac gaaggaaata tagatcaaac 660
aaaggagaaa gtcctgtgga gcctgcagag ccttgtcgtt acagctgcc cagggaggag 720
gagggcagca ccatcccat ccaggaggat taccgaaaac cggagcctgc ctgctcccc 780
cgtttctctg ttgttaaacg gggcagaaag aagctcctgt atatattcaa acaaccattt 840
atgagaccag tacaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa 900
gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac 960
cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1020
gttttgaca agagacgtgg ccgggacct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1080
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 1140
attgggatga aaggcagcgg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1200
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc ctccacatgc aggccctgcc ccctcgttaa 1260

<210> 20
<211> 1383
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintética

<400> 20

atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc gttctgggga ccctggtggg gctctcagct 60
actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctccaggaaa gctgtgctgc 120
cagatgtgtg agccaggaac attcctogtg aaggactgtg accagcatag aaaggctgct 180

ES 2 745 153 T3

```

cagtgtgatc cttgcataacc gggggtctcc ttctctcctg accaccacac ccggccccac      240
tgtgagagct gtcggcactg taactctggg cttctcgttc gcaactgcac catcactgcc      300
aatgctgagt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg caccgagtgt      360
gatcctcttc caaaccttc gctgaccgct cggtcgtctc aggccctgag cccacaccct      420
cagcccaccc acttacctta tgtcagtgag atgctggagg ccaggacagc tgggcacatg      480
cagactctgg ctgacttcag gcagctgctt gcccggaactc tctctaccca ctggccaccc      540
caaagatccc tgtgcagctc cgatthttatt cgcacccctg tgatcttctc tggaatgttc      600
cttgttttca ccctggccgg ggcctgttcc ctccatcaac gaaggaaata tagatcaaac      660
aaaggagaaa gtcctgtgga gcctgcagag ccttgtcgtt acagctgccc cagggaggag      720
gagggcagca ccatccccat ccaggaggat taccgaaaac cggagcctgc ctgctcccc      780
aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc      840
gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat gcccaccac gcgacttgc agcctatcgc      900
tcccgtttct ctgttgtaaa acggggcaga aagaagctcc tgtatatatt caaacaacca      960
tttatgagac cagtacaaac tactcaagag gaagatggct gtagctgccg atttccagaa     1020
gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg aagttcagca ggagcgcaga cgcctccgcg     1080
taccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc taggacgaag agaggagtac     1140
gatgttttg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg ggggaaagcc gagaaggaag     1200
aacctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt     1260
gagattggga tgaaaggcga gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt     1320
ctcagtacag ccaccaagga cacctacgac gccttcaca tgcaggccct gccccctcgc     1380
taa

```

<210> 21
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

```

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
1              5              10              15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
                20              25              30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
                35              40              45

```

5

10

ES 2 745 153 T3

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
 115 120 125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
 130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
 145 150 155 160

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
 165 170 175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp
 180 185

<210> 22
 <211> 23
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Phe Ile Arg Ile Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Ala Gly Ala Leu Phe Leu
 20

<210> 23
 <211> 49
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu
 1 5 10 15

Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser
 20 25 30

Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser
 35 40 45

Pro

ES 2 745 153 T3

<210> 24
 <211> 1092
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética

 10 <400> 24

 atggcatggc cacctcccta ctggctctgc atgctgggga ccttggtagg actctcagct 60
 accctagccc caaacagctg tccagacaaa cactactgga ctgggggagg actctgctgc 120
 cggatgtgtg agccaggtag attctttgtg aaggactgtg aacaagacag aacagctgct 180
 cagtgtgatc cctgtatacc aggcacctcc ttctctccag actaccacac ccggccccac 240
 tgcgagagct gcaggcattg taactctggt tttcttatcc gcaactgcac agtcaactgcc 300
 aatgctgagt gcagctgttc caagaactgg cagtgcaggg accaggaatg tacagagtgt 360
 gaccctctc taaaccctgc actgaccaga cagccatctg agacccccgag cccacagcca 420
 cccccaccc acttacctca tggcacagag aagccatcct ggcccctaca caggcagctt 480
 cccaactcga ctgtctatag ccagcgggtca tcccatagac ccctgtgcag ctcggactgc 540
 atccggatct ttgtgacctt ctccagcatg tttcttatct tcgtcctggg tgcaatcttg 600
 ttcttccatc aaagaagaaa ccacgggcca aatgaagacc ggcaggcagt gcctgaagag 660
 ccttgtcctt acagctgccc caggaagag gagggcagt ctatccctat ccaggaggac 720
 taccggaaac ccgagcctgc tttctacctt agagcaaaat tcagcaggag tgcaagagact 780
 gctgcccaacc tgcaggacc caaccagctc tacaatgagc tcaatctagg gcgaagagag 840
 gaatatgacg tcttgagaaa gaagcgggct cgcgatccag agatgggagg caaacagcag 900
 aggaggagga acccccagga aggcgtatac aatgcactgc agaaagacaa gatggcagaa 960
 gcctacagtg agatcggcac aaaaggcgag aggcggagag gcaaggggca cgatggcctt 1020
 taccagggtc tcagcactgc caccaaggac acctatgatg ccctgcatat gcagaccctg 1080
 gccctctgct aa 1092

<210> 25
 15 <211> 363
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Sintética

<400> 25

ES 2 745 153 T3

Met Ala Trp Pro Pro Pro Tyr Trp Leu Cys Met Leu Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Leu Ala Pro Asn Ser Cys Pro Asp Lys His Tyr
 20 25 30

Trp Thr Gly Gly Gly Leu Cys Cys Arg Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Phe Val Lys Asp Cys Glu Gln Asp Arg Thr Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Thr Ser Phe Ser Pro Asp Tyr His Thr Arg Pro His
 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Phe Leu Ile Arg Asn Cys
 85 90 95

Thr Val Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ser Cys Ser Lys Asn Trp Gln Cys
 100 105 110

Arg Asp Gln Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Ala Leu
 115 120 125

Thr Arg Gln Pro Ser Glu Thr Pro Ser Pro Gln Pro Pro Pro Thr His
 130 135 140

Leu Pro His Gly Thr Glu Lys Pro Ser Trp Pro Leu His Arg Gln Leu
 145 150 155 160

Pro Asn Ser Thr Val Tyr Ser Gln Arg Ser Ser His Arg Pro Leu Cys
 165 170 175

Ser Ser Asp Cys Ile Arg Ile Phe Val Thr Phe Ser Ser Met Phe Leu
 180 185 190

Ile Phe Val Leu Gly Ala Ile Leu Phe Phe His Gln Arg Arg Asn His
 195 200 205

Gly Pro Asn Glu Asp Arg Gln Ala Val Pro Glu Glu Pro Cys Pro Tyr
 210 215 220

Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Ala Ile Pro Ile Gln Glu Asp

ES 2 745 153 T3

225 230 235 240

Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Phe Tyr Pro Arg Ala Lys Phe Ser Arg
245 250 255

Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn
260 265 270

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys
275 280 285

Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg Arg Asn
290 295 300

Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
305 310 315 320

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
325 330 335

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
340 345 350

Asp Ala Leu His Met Gln Thr Leu Ala Pro Arg
355 360

<210> 26
<211> 250
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 26

Met Ala Trp Pro Pro Pro Tyr Trp Leu Cys Met Leu Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Leu Ala Pro Asn Ser Cys Pro Asp Lys His Tyr
20 25 30

Trp Thr Gly Gly Gly Leu Cys Cys Arg Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
35 40 45

Phe Val Lys Asp Cys Glu Gln Asp Arg Thr Ala Ala Gln Cys Asp Pro
50 55 60

Cys Ile Pro Gly Thr Ser Phe Ser Pro Asp Tyr His Thr Arg Pro His
65 70 75 80

10 Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Phe Leu Ile Arg Asn Cys

ES 2 745 153 T3

85

90

95

Thr Val Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ser Cys Ser Lys Asn Trp Gln Cys
100 105 110

Arg Asp Gln Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Pro Leu Asn Pro Ala Leu
115 120 125

Thr Arg Gln Pro Ser Glu Thr Pro Ser Pro Gln Pro Pro Pro Thr His
130 135 140

Leu Pro His Gly Thr Glu Lys Pro Ser Trp Pro Leu His Arg Gln Leu
145 150 155 160

Pro Asn Ser Thr Val Tyr Ser Gln Arg Ser Ser His Arg Pro Leu Cys
165 170 175

Ser Ser Asp Cys Ile Arg Ile Phe Val Thr Phe Ser Ser Met Phe Leu
180 185 190

Ile Phe Val Leu Gly Ala Ile Leu Phe Phe His Gln Arg Arg Asn His
195 200 205

Gly Pro Asn Glu Asp Arg Gln Ala Val Pro Glu Glu Pro Cys Pro Tyr
210 215 220

Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Ala Ile Pro Ile Gln Glu Asp
225 230 235 240

Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Phe Tyr Pro
245 250

<210> 27
<211> 113
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 27

Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn Leu Gln Asp
1 5 10 15

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

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

10 Gln Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala Leu Gln

ES 2 745 153 T3

50

55

60

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

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

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

Arg

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene especificidad antigénica por CD70, comprendiendo el CAR:
- un dominio transmembrana de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CD27 que carece de todo el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD27;
- 10 un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB;
- un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ; y
- 15 opcionalmente, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28.
- 2.** El CAR según la reivindicación 1, que comprende un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB, un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28.
- 20 **3.** El CAR según la reivindicación 1, que comprende un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB y un dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ.
- 4.** El CAR según la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD28 comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 6.
- 25 **5.** El CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de 4-1BB comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 5.
- 30 **6.** El CAR según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el dominio de señalización intracelular de linfocitos T de CD3ζ comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 4.
- 7.** El CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el dominio transmembrana de unión a antígeno de CD27 comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3.
- 35 **8.** El CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 90 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 8-10, opcionalmente en el que el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 8-10.
- 40 **9.** Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el CAR según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, opcionalmente en el que el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 15-17.
- 45 **10.** Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 11.** Una célula hospedadora aislada que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 10.
- 50 **12.** Una población de células que comprende al menos una célula hospedadora de la reivindicación 11.
- 13.** Una composición farmacéutica que comprende el CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el ácido nucleico de la reivindicación 9, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 10, la célula hospedadora de la reivindicación 11, o la población de células de la reivindicación 12 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 55 **14.** Un procedimiento para detectar la presencia de cáncer en un mamífero, comprendiendo el procedimiento:
- 60 (a) poner en contacto una muestra que comprende una o más células del mamífero con el CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el ácido nucleico de la reivindicación 9, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 10, la célula hospedadora de la reivindicación 11, la población de células de reivindicación 12, o la composición farmacéutica de la reivindicación 13, formando así un complejo, y
- 65 (b) detectar el complejo, en el que la detección del complejo es indicativa de la presencia de cáncer en el mamífero.

5 **15.** El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el ácido nucleico de la reivindicación 9, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 10, la célula hospedadora de la reivindicación 11, la población de células de la reivindicación 12, o la composición farmacéutica de la reivindicación 13, para uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

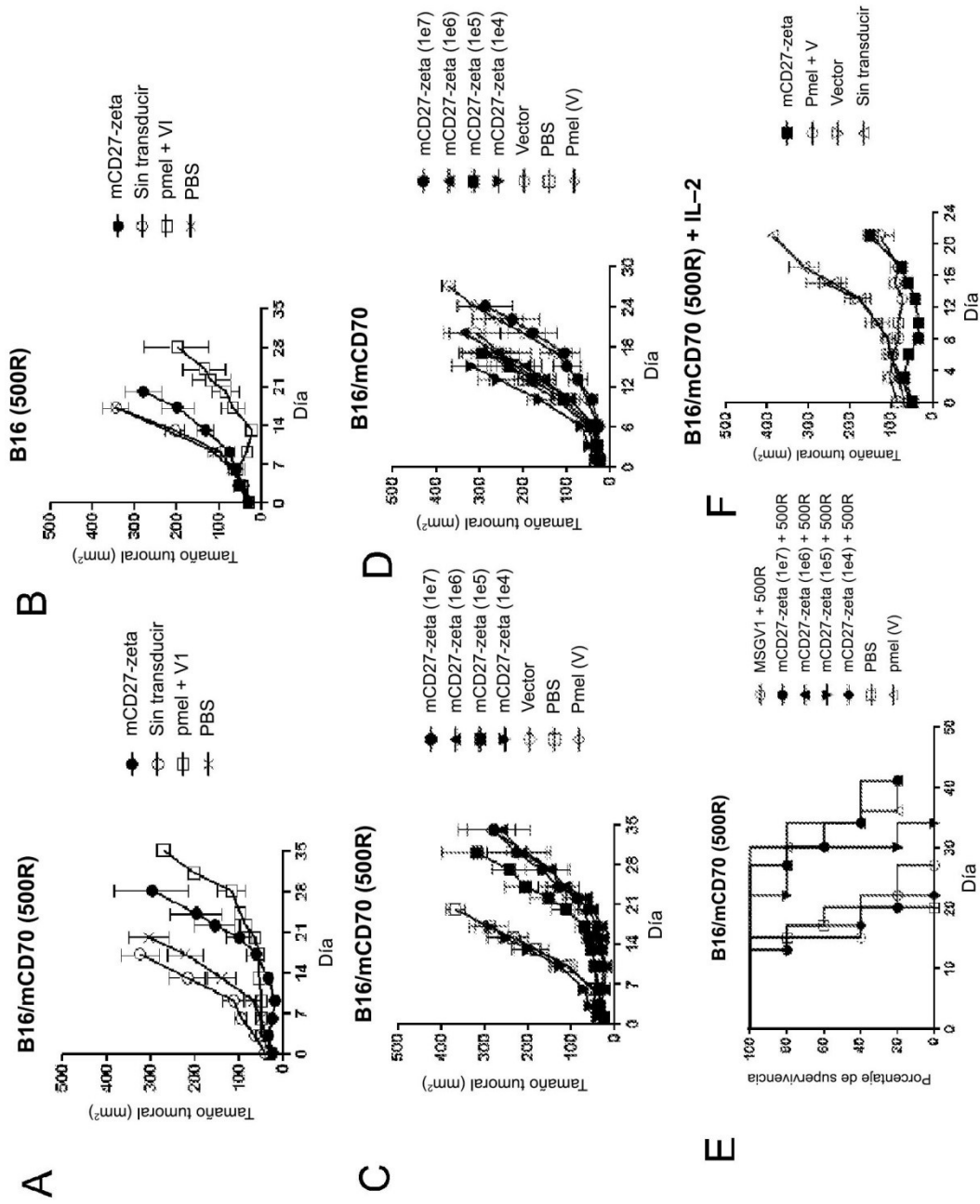


FIG. 1A-1F

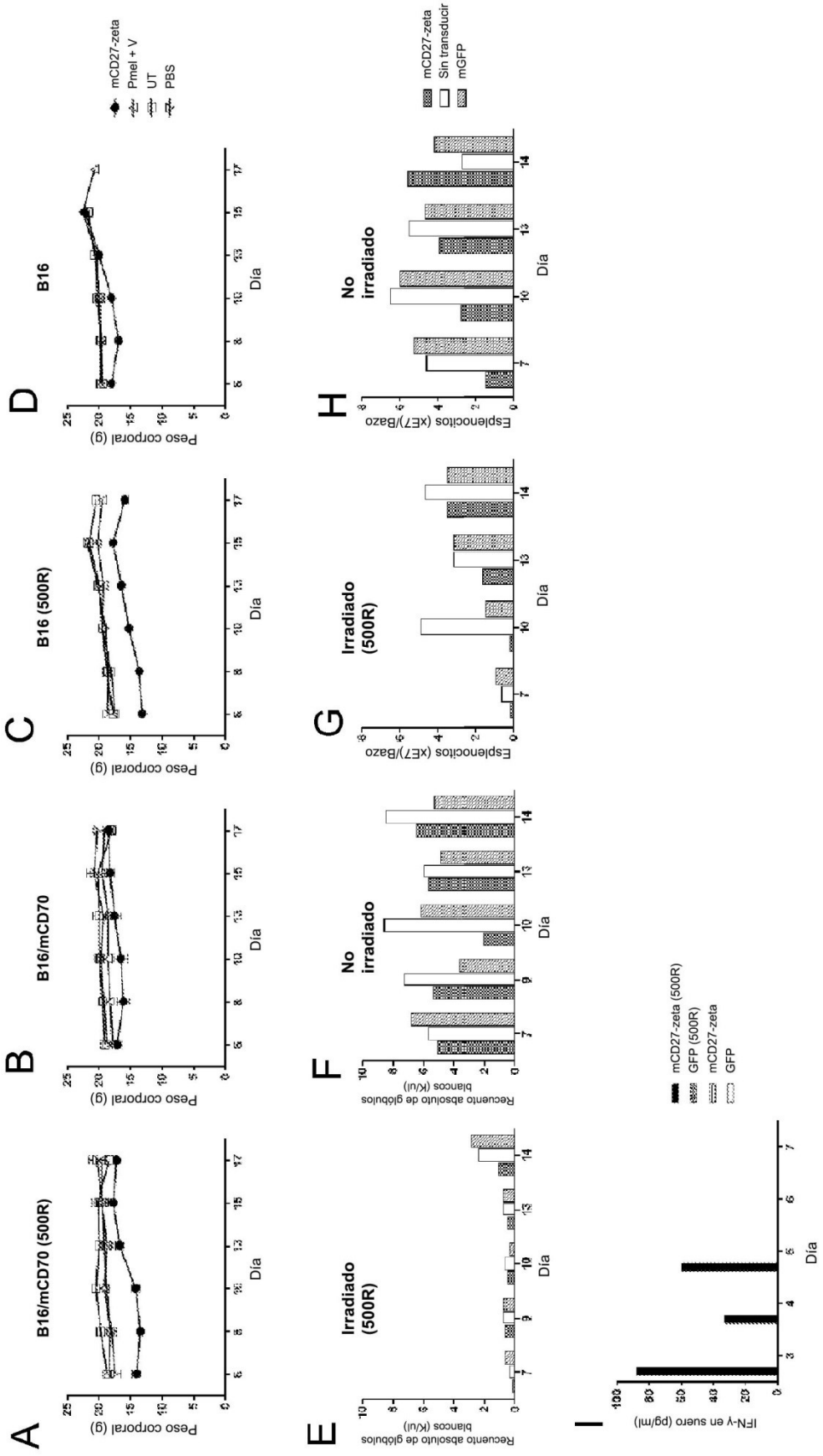


FIG. 2A-2I

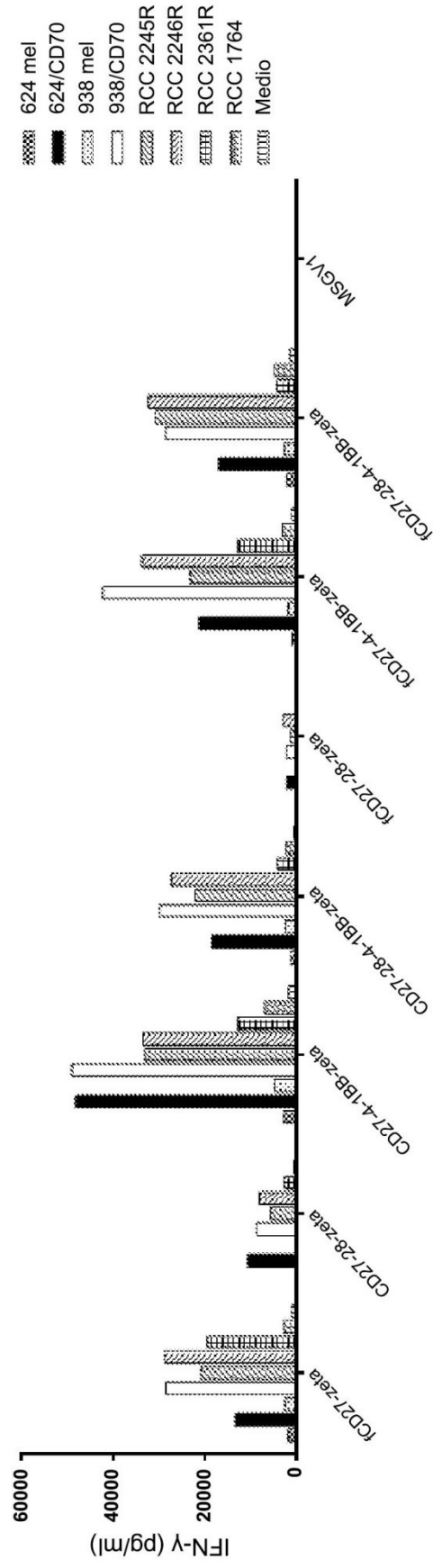


FIG. 3

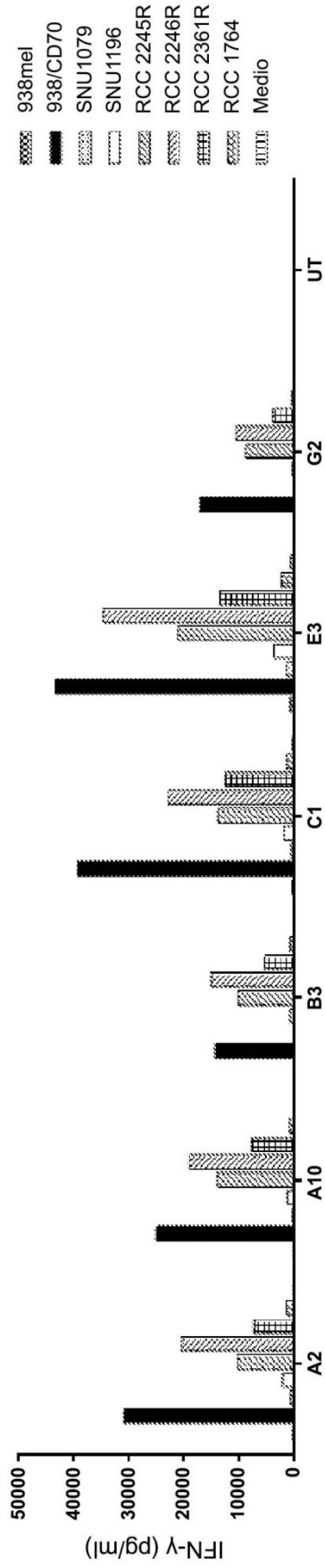


FIG. 4

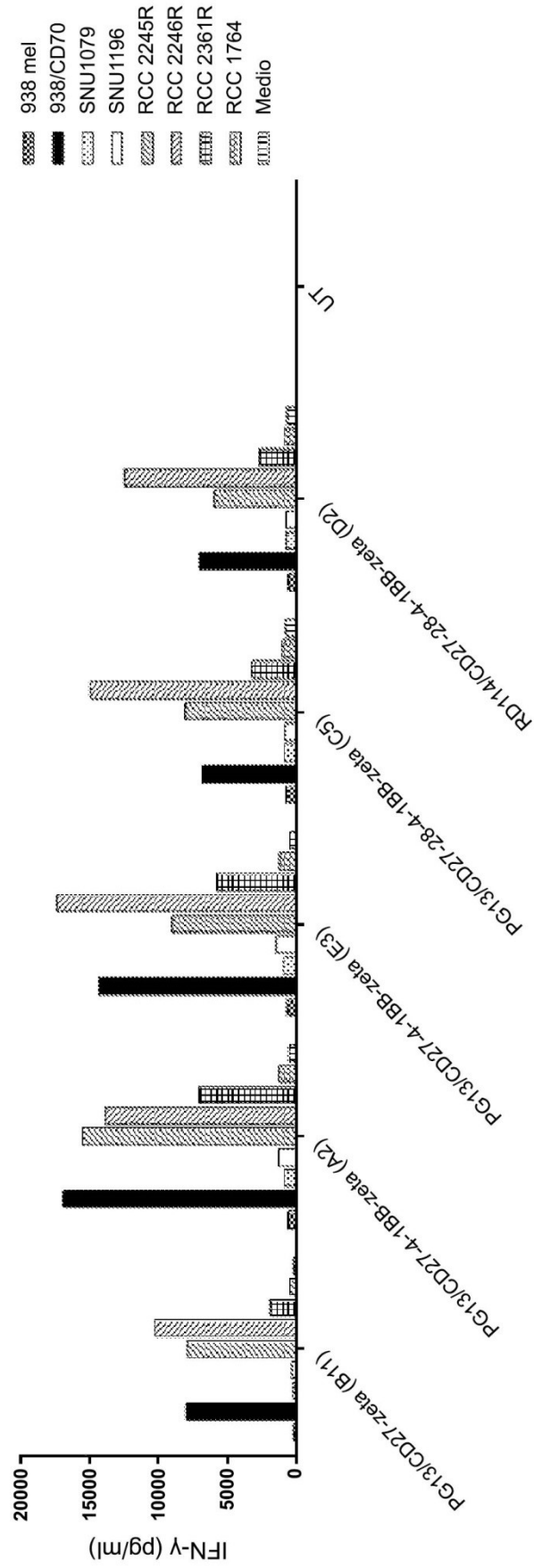


FIG. 5