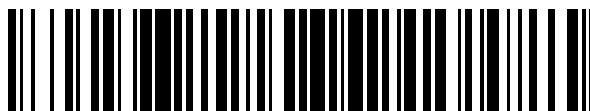


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 903**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2016 PCT/GB2016/051019**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166521**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2016 E 16717433 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3283526**

54 Título: **Proteína quimérica**

30 Prioridad:

**13.04.2015 GB 201506223**

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

**24.03.2020**

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS LTD (100.0%)  
The Network Building 97 Tottenham Court Road  
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**PULÉ, MARTIN y  
PHILIP, BRIAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 749 903 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

Proteína quimérica

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína quimérica útil en la terapia celular adoptiva (ACT). La proteína quimérica puede actuar como un gen suicida permitiendo que las células que expresan la proteína quimérica se eliminen. La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica dicha proteína quimérica, una  
10 célula que comprende dicho ácido nucleico y sus usos terapéuticos.

Antecedentes de la invención

La inmunoterapia adoptiva es un enfoque terapéutico establecido y en evolución. En el contexto del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT), con frecuencia se administran infusiones de linfocitos de donantes (DLI) para tratar la recaída de tumores malignos hematológicos. Los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) son efectivos en el tratamiento del melanoma metastásico. La ingeniería genética de las células T aumenta en gran medida el alcance y la potencia de la terapia con células T: la transferencia de receptores de células T permite la selección de antígenos de cáncer intracelular, mientras que los receptores de antígeno quimérico (CAR) permiten la selección de antígenos específicos de linaje o cáncer de superficie. Se han observado respuestas clínicas con ambos enfoques, y se están realizando numerosos ensayos adicionales.

Pueden ocurrir eventos adversos agudos después de la inmunoterapia adoptiva. La enfermedad de injerto versus huésped (GvHD) es una complicación común y grave de DLI. La administración de células T modificadas también ha resultado en toxicidad. Por ejemplo, se ha informado de una toxicidad fuera del tumor en el objetivo en estudios de transferencia de receptores de células T nativos contra antígenos de melanoma; las células T redirigidas al antígeno de carcinoma de células renales anhidrasa carbónica IX (CAIX) produjeron una hepatotoxicidad inesperada. Se ha informado sobre síndromes de activación inmune después de la terapia con CD19 CAR. Finalmente, la mutagénesis insercional inducida por vector produce un riesgo teórico de trastornos linfoproliferativos. La incidencia y la gravedad de estas toxicidades son impredecibles. Además, contrariamente a una proteína terapéutica o moléculas pequeñas cuyos eventos adversos usualmente disminuyen con la vida media terapéutica, las células T se injertan y replican, lo que puede resultar potencialmente en una toxicidad creciente y fulminante.

*Genes suicidas*

35 Un gen suicida es un mecanismo genéticamente codificado que permite la destrucción selectiva de las células T transferidas adoptivamente ante una toxicidad inaceptable. Se han probado dos genes suicidas en estudios clínicos: timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) y caspasa inducible 9 (iCasp9).

40 La expresión de HSV-TK en células T confiere susceptibilidad al ganciclovir. HSV-TK es un gen suicida altamente efectivo, pero la inmunogenicidad limita la aplicación a entornos clínicos de inmunosupresión profunda como el HSCT haploidéntico. Además, impide el uso de ganciclovir para el tratamiento de la infección por citomegalovirus (CMV).

45 iCasp9 es activado por un inductor o dimerizador químico de molécula pequeña experimental (CID). Este CID es un fármaco experimental y se considera biológicamente inerte, ya que no interactúa con el FKBP12 de tipo salvaje. Sin embargo, la experiencia clínica con este agente se limita a un número muy pequeño de pacientes (Di Stasi, A. et al. (2011) N. Engl. J. Med. 365, 1673-1683; e Iliucci, J. D. et al. (2001), J. Clin. Pharmacol. 41, 870-879). Es una molécula relativamente grande y polar y es poco probable que cruce la barrera hematoencefálica. Se ha descrito un gen suicida basado en la activación de CID de FAS (Amara et al. (1999) Hum. Gene Ther. 10, 2651-2655). Esto también depende de este CID para la activación, y dado que no activa directamente la cascada de apoptosis, es posible que se escape (a través de la resistencia de FAS).

50 La timidilato quinasa humana mutante (mTMPK) hace que las células sean susceptibles al AZT. Recientemente, HSV-TK, iCasp9 se compararon con mTMPK (Marin et al. (2012) Hum. Gene Ther. Methods 23, 376-386). mTMPK no es suficientemente activo para ser de utilidad.

55 Se han propuesto otros genes suicidas, por ejemplo, CD20 de longitud completa que, cuando se expresa en una célula T, puede hacer que las células T sean susceptibles a la lisis por el anticuerpo terapéutico anti-CD20 rituximab (Introna, M. et al. (2000) Hum. Gene Ther. 11, 611-620). También se han descrito otros genes suicidas sobre este tema del reconocimiento de anticuerpos: RQR8 hace que las células T sean susceptibles a CD20 pero es más compacta que la molécula CD20 de longitud completa (Philip, B. et al. (2014) Blood doi: 10.1182/blood-2014-01-545020); una versión truncada de EGFR (huEGFRt) hace que las células sean susceptibles a la lisis por mAbs anti-EGFR (Wang, X. et al. (2011) Blood 118, 1255-1263); y una etiqueta de epítipo myc expresada sobre una superficie celular deja a las células susceptibles a la lisis con un anticuerpo anti-myc (Kieback et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 623-628). Una limitación importante de estos enfoques dependientes de anticuerpos es su

dependencia de la biodisponibilidad de un anticuerpo terapéutico en altas concentraciones locales para actuar. Se sabe, por ejemplo, que los anticuerpos líticos no son particularmente efectivos contra la enfermedad voluminosa y una limitación de los genes suicidas basados en anticuerpos es que las células residentes donde no se alcanzan altas concentraciones de anticuerpos se escaparían.

5 El documento WO 01/00854 se refiere a proteínas quiméricas de la superficie celular que pueden usarse en la inducción selectiva de apoptosis en tipos de células diana particulares, tales como células cancerosas in vivo o in vitro.

10 Por lo tanto, existe la necesidad de un gen suicida alternativo que no esté asociado con las desventajas mencionadas anteriormente.

#### Descripción de las figuras

15 Figura 1: Reconocimiento de truncamientos de CD20 por Rituximab y Ofatumumab. Se hicieron truncamientos amino- y carboxi-terminales de CD20, por lo que se truncaron los endodominios amino- o carboxi-terminales. Estos se expresaron con eGFP y se transfectaron en células 293T.

20 Figura 2: Caricatura que muestra a) RQR8 y RQR8-FAS, y b) dCD20-FAS.

Figura 3: Comparación de la función de RQR8 y RQR8-FAS y la apoptosis de dCD20-FAS (como porcentaje de las células que se expresan) tras la expresión y tras la activación por Ofatumumab en los diferentes constructos de prueba.

25 Figura 4: Sensibilidad y curso temporal de dCD20-FAS a Rituximab.

Las células T Jurkat se transdujeron con dCD20-FAS coexpresado con eGFP. La muerte directa inducida por rituximab se muestra con el tiempo y en diferentes concentraciones de Rituximab.

30 Figura 5: Curva de dosis-respuesta extendida de dCD20-FAS a Rituximab.

Las células T Jurkat transducidas con dCD20-FAS y que coexpresaban eGFP se cultivaron con diluciones crecientes de Rituximab durante 48 horas. La muerte directa se muestra respecto de diferentes concentraciones de Rituximab.

35 Figura 6: Sensibilidad y curso temporal de dCD20-FAS a Ofatumumab.

Las células T Jurkat se transdujeron con dCD20-FAS coexpresado con eGFP. La muerte directa inducida por Ofatumumab se muestra con el tiempo y en diferentes concentraciones de Ofatumumab.

40 Figura 7: Curva de dosis-respuesta extendida de dCD20-FAS a Ofatumumab.

Las células T Jurkat transducidas con dCD20-FAS y que coexpresaban eGFP se cultivaron con diluciones crecientes de Ofatumumab durante 48 horas. La muerte directa se muestra respecto de diferentes concentraciones de Ofatumumab.

45 Figura 8: La mutación P172W en CD20 produce resistencia a Rituximab.

Figura 9: Eliminación directa y mediada por CDC de células T humanas primarias por dCD20-FAS y dCD20<sup>P172W</sup>-FAS.

50 Figura 10: Ejemplo de muerte directa por dCD20-FAS de células T primarias por Ofatumumab.

#### Compendio de aspectos de la invención

55 Los presentes inventores han desarrollado un nuevo gen suicida que es inducible con un ligando extracelular, como un anticuerpo, y tiene baja toxicidad basal y alta toxicidad inducida. El gen suicida tiene "triple función", ya que puede causar suicidio por activación de FAS, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

60 Por lo tanto, en un primer aspecto, se proporciona una proteína quimérica que comprende una proteína transmembrana de múltiples segmentos fusionada a un endodominio FAS, en donde la proteína transmembrana de múltiples segmentos se une a un ligando extracelular, lo que lleva a la activación del endodominio FAS y en donde la proteína transmembrana multiespacio comprende CD20, o una versión truncada de la misma que carece del endodominio amino-terminal o el endodominio carboxi-terminal.

65 El ligando extracelular puede ser un anticuerpo monoclonal anti-CD20, como Rituxumab, Ofatumumab o

Veltuzumab. El ligando extracelular puede comprender la porción de unión a antígeno (tal como VH/VL o secuencias de región determinante de complementariedad (CDR)) de un anticuerpo monoclonal anti-CD20.

5 La proteína quimérica puede comprender un endodominio FAS fusionado al terminal carboxi de una versión truncada de CD20, que carece del endodominio amino-terminal.

10 La proteína transmembrana de múltiples segmentos puede comprender una o más mutaciones para aumentar su afinidad o especificidad de unión. Por ejemplo, puede comprender una o más mutaciones de modo que se una a Ofatumumab, pero no a Rituxumab. Por ejemplo, el CD20 puede comprender la mutación P172W, con referencia a la secuencia de longitud completa que se muestra como SEQ ID No. 3.

La proteína transmembrana de múltiples segmentos puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID No. 3, 4, 5 o 6.

15 El endodominio FAS puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID No. 20.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína quimérica de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

20 También se proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un receptor de células T (TOR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

25 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un constructo de ácido nucleico como se definió anteriormente.

30 El vector también puede comprender un nucleótido de interés. El nucleótido de interés puede codificar un receptor de antígeno quimérico o un receptor de células T, de modo que, cuando el vector se usa para transducir una célula diana, la célula diana coexpresa una proteína quimérica de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un quimérico receptor de antígeno o receptor de células T.

35 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula que expresa una proteína quimérica de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La célula puede ser, por ejemplo, una célula T, una célula asesina natural (NK) o una célula madre.

40 En un quinto aspecto, se proporciona un método para producir una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención que comprende la etapa de transducir o transfectar una célula ex vivo con un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

45 Descrito en el presente documento, se proporciona un ligando extracelular para su uso en un método para eliminar una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, que comprende la etapa de exponer las células a un ligando extracelular que se une a CD20.

En el método, la unión del ligando extracelular puede causar uno, dos o los tres siguientes:

- activación del endodominio FAS que conduce a la apoptosis de la célula;
- 50 • reticulación de proteínas transmembrana de múltiples segmentos de una pluralidad de proteínas quiméricas, que conduce a la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); y
- citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), donde el ligando extracelular es un anticuerpo.

55 El ligando extracelular puede ser un anticuerpo monoclonal anti-CD20, como Rituxumab, Ofatumumab o Veltuzumab.

60 En un sexto aspecto, se proporciona una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención para usar en un método para prevenir o tratar una enfermedad en un sujeto.

El método puede comprender las siguientes etapas:

65 (i) transducir o transfectar una muestra de células aisladas de un sujeto con un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, y

(ii) administrar las células transducidas/transfectadas a un paciente.

El método puede ser para tratar el cáncer.

5 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un ligando extracelular para usar en un método para prevenir y/o tratar una reacción inmune patológica en un sujeto causada por la administración de una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención al sujeto, en donde el ligando extracelular es capaz de unirse a CD20.

10 La reacción inmune patológica puede ser, por ejemplo: enfermedad de injerto versus huésped; toxicidad dentro del objetivo, fuera del tumor; síndrome de activación inmune; o un trastorno linfoproliferativo.

El método para tratar una enfermedad en un sujeto puede comprender las siguientes etapas:

(i) administrar una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención al sujeto;

15 (ii) monitorear al sujeto para el desarrollo de una reacción inmune patológica; y

(iii) administrar un ligando extracelular, capaz de unirse a la proteína transmembrana de múltiples segmentos, al sujeto si el sujeto muestra signos de desarrollo o de haber desarrollado una reacción inmune patológica.

20 También se proporciona una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención para su uso en trasplante de células madre hematopoyéticas, infusión de linfocitos o transferencia de células adoptivas.

25 También se proporciona un anticuerpo anti-CD20 para su uso en la prevención o el tratamiento de una reacción inmune patológica causada por la administración de una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención a un sujeto.

Descripción detallada

30 Proteína quimérica

La presente invención se refiere a una proteína quimérica que actúa como un gen suicida. Las células que expresan la proteína quimérica pueden eliminarse in vivo o in vitro mediante la administración de un ligando extracelular.

35 La proteína quimérica comprende una proteína transmembrana de múltiples segmentos fusionada a un endodominio FAS.

La proteína quimérica puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 o una variante de la misma.

40 SEQ ID No. 1

>dCD20-FAS

```

<-----dCD20-----
MGQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKN
-----dCD20-----
SRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEK
-----dCD20-----
NSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIK
-----dCD20-----><-L1-><-----
EEVVGLTETSSQPKNEDIEIIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSPSGGGGSEVQKTCRK
-----dFAS-----
HRKENQGSHEP TLNPETVAINLSVDVLSKYITTIAGVMTLSQVKG FVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQD
-----dFAS----->
TAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEIQSLV
    
```

SEQ ID No. 2

>dCD20<sub>P172W</sub>-FAS

```

<-----dCD20-----
MGQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKN
-----dCD20-----*-----
SRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANWSEK
-----dCD20-----
NSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIK
-----dCD20-----><-L1-><-----
EEVVGLTETSSQPKNEDIEIIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSPSGGGGSEVQKTCRK
-----dFAS-----
HRKENQGSHEP TLNPETVAINLSVDVLSKYITTIAGVMTLSQVKG FVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQD
-----dFAS----->
TAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDITSDSENSNFRNEIQSLV
    
```

5

Las secuencias variantes pueden tener al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 1 o 2, siempre que las secuencias proporcionen un gen suicida eficaz. Es decir, siempre que las secuencias retengan la capacidad de unirse a un ligando extracelular, lo que lleva a la activación del endodominio FAS.

10

Proteína transmembrana de múltiples segmentos

15

Una proteína transmembrana es una proteína que abarca la totalidad de la membrana biológica a la que está unida en forma permanente. Es decir, las proteínas transmembrana se extienden desde un lado de una membrana hasta el otro lado de la membrana.

Las proteínas transmembrana se clasifican comúnmente por topología, con referencia a la posición de los dominios N- y C-terminales. Los tipos I, II y III son moléculas de un solo paso, mientras que el tipo IV se refiere a moléculas de

múltiples pasos. La proteína quimérica de la presente invención comprende una proteína transmembrana de tipo IV, que comprende una pluralidad de hélices alfa, que abarcan la membrana, unidas por una serie de bucles extracelulares y/o intracelulares.

5 Las proteínas transmembrana de tipo IV se subdividen en IV-A, en donde el dominio N-terminal se dirige al citosol; y IV-B, en donde el dominio N-terminal dirigido al lumen del retículo endoplasmático durante la síntesis. Una vez que la proteína transmembrana se expresa en la superficie celular, las proteínas transmembrana de tipo IV-A tienen un dominio N-terminal intracelular, mientras que las proteínas transmembrana de tipo IV-B tienen un dominio N-terminal extracelular.

10 La proteína transmembrana de múltiples segmentos comprende un dominio de unión a ligando que se une a un ligando extracelular. El dominio de unión al ligando se coloca en el lado extracelular de la membrana plasmática. El dominio de unión a ligando puede ser una parte integral de la proteína transmembrana de múltiples segmentos, como el epítipo de unión a Rituximab de CD20, o puede introducirse mediante ingeniería de proteínas.

15 El dominio de unión al ligando puede estar o insertarse en un bucle extracelular de la proteína transmembrana de múltiples segmentos, es decir, un bucle hidrofílico entre dos porciones hidrofóbicas, alfa helicoidales, que abarcan la membrana. Alternativamente, el dominio de unión a ligando puede estar o insertarse en el extremo o conectarse al extremo de una porción extracelular amino- o carboxilo-terminal de la proteína transmembrana de múltiples segmentos, es decir, una de las partes extremas hidrofílicas de la proteína transmembrana de múltiples segmentos, siempre que se coloque en el lado extracelular de la membrana plasmática, en lugar del lado citosólico.

Los dominios de unión a ligando pueden fusionarse o introducirse en una proteína transmembrana de múltiples segmentos mediante ingeniería de proteínas recombinantes.

25 El ligando extracelular puede ser un ligando de origen no natural, como un anticuerpo que se ha generado contra el dominio de unión al ligando de la proteína transmembrana de múltiples segmentos.

30 El dominio de unión al ligando de la proteína transmembrana de múltiples segmentos es capaz de unirse al ligando extracelular, lo que provoca la activación del endodominio FAS.

Para evitar la eliminación descontrolada de las células que expresan el gen suicida, la proteína de múltiples capas puede no tener un ligando endógeno, o puede modificarse de modo que ya no tenga la capacidad de unirse a ningún ligando natural.

35 CD20

40 CD20 es una proteína de membrana de múltiples segmentos. CD20 se expresa en todas las etapas del desarrollo de las células B, excepto la primera y la última: está presente desde las células pro-B tardías a través de las células de memoria, pero no en las células pro-B tempranas ni en los blastos de plasma y las células plasmáticas. Se expresa en casi todos los linfomas de células B, leucemia de células pilosas y leucemia linfocítica crónica de células B. CD20 tiene dos bucles extracelulares: un bucle menor y un bucle principal limitado por un enlace disulfuro. Tiene un endodominio amino-terminal y carboxi-terminal. CD20 se agrega en balsas lipídicas cuando se expone con ciertos anticuerpos monoclonales anti-CD20. La agregación depende del endodominio carboxi-terminal.

45 La secuencia de CD20 humano de longitud completa se muestra como SEQ ID No. 3.

SEQ ID No. 3

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGP IAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFMMRESKTLGAVQIMNGLFH  
IALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYI IISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFA  
AISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEP **ANP**SEKNSPSTQYCYSIQSL

50 FLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTC SRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTET  
SSQPKNEEDIEI IPIQE EEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP

Las posiciones de A170 y P172 se muestran en negrita y están subrayadas.

55 Los presentes inventores han demostrado que es posible truncar CD20, ya sea en el término amino o carboxi, y retener la capacidad de expresarse en la superficie celular, y la capacidad de ser reconocida por los anticuerpos anti-CD20 como Rituximab u Ofatumumab.

## ES 2 749 903 T3

La proteína transmembrana de múltiples segmentos puede comprender una versión truncada de CD20, que carece del endodominio amino-terminal. El CD20 truncado puede carecer de hasta e incluir 41 aminoácidos del término amino. Por ejemplo, el CD20 truncado puede carecer de entre 1 y 41,5 y 35, o 10-20 aminoácidos del término amino

- 5 El CD20 truncado puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID No. 4, o una variante de la misma.

SEQ ID No. 4 (dCD20)

```
QSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAAT
EKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNC
EPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLL
SAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSPIEN
DSSP
```

- 10 La proteína transmembrana de múltiples segmentos puede comprender una versión truncada de CD20, que carece del endodominio carboxi-terminal. El CD20 truncado puede carecer de hasta e incluir 61 aminoácidos del término carboxi. Por ejemplo, el CD20 truncado puede carecer de entre 1 y 61, 5 y 55, o 10-20 aminoácidos del término carboxi.

- 15 El CD20 truncado puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID No. 5, o una variante de la misma.

SEQ ID No. 5 (CD20d)

```
MGTTPRNSVNGTFPAEPMKGP IAMQSGPKPLFRMSSLVGP TQSFFMRESKTLGAVQIMNGLF
HIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSL
AAISGMILSMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQS
LFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKK
```

- 20 El CD20 puede ser diseñado para aumentar la afinidad de unión o aumentar la selectividad de unión al ligando extracelular. Por ejemplo, CD20 puede comprender una mutación en la posición A170 y/o P172 con referencia a la numeración de la secuencia de CD20 de longitud completa mostrada como SEQ ID No. 3 arriba (mostrada en **negrita y subrayada** en la SEQ ID No. 3). La mutación puede ser, por ejemplo, una adición, eliminación o sustitución.

- 25 En particular, la secuencia CD20 puede comprender la mutación P172W, de modo que la variante CD20 se une a Ofatumumab, pero no a Rituximab.

- 30 La proteína quimérica puede comprender una versión truncada de CD20, que carece del endodominio amino-terminal, que comprende la mutación P172W con referencia a la numeración de la posición de CD20 de longitud completa, como se muestra en la SEQ ID No. 3. Esta secuencia se muestra como SEQ ID No. 6 a continuación.

35 SEQ ID No. 6 (dCD20<sub>P172W</sub>)

```
QSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAAT
EKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNC
EPANWSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLL
SAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEETETNFPEPPQDQESSPIEN
DSSP
```

El dominio de unión a ligando puede unirse a un mAb anti-CD20 como Rituximab.

- 40 El dominio de unión al ligando puede comprender la secuencia del epítipo de unión a Rituximab de CD20, que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 7.

CEPANPSEKNSPSTQYC (SEQ ID No. 7)

- 45 Perosa et al (2007, J. Immunol 179: 7967-7974) describen una serie de péptidos cíclicos 7-meros con restricción de cisteína, que tienen el motivo antigénico reconocido por el mAb anti-CD20 Rituximab pero tienen diferentes aminoácidos que rodean los motivos. Se describieron once péptidos en total, como se muestra en la siguiente tabla:



<b>Péptido</b>	<b>Secuencia de inserto</b>
R15-C	acPYANPSLc (SEQ ID No. 8)
R3-C	acPYSNPSLc (SEQ ID No. 9)
R7-C	acPFANPSTc (SEQ ID No. 10)
R8-, R12-, R18-C	acNFSNPSLc (SEQ ID No. 11)
R14-C	acPFSNPSMc (SEQ ID No. 12)
R16-C	acSWANPSQc (SEQ ID No. 13)
R17-C	acMFSNPSLc (SEQ ID No. 14)
R19-C	acPFANPSMc (SEQ ID No. 15)
R2-C	acWASNPSLc (SEQ ID No. 16)
R10-C	acEHSNPSLc (SEQ ID No. 17)
R13-C	acWAANPSMc (SEQ ID No. 18)

Li et al (2006 Cell Immunol 239:136-43) también describen mimétos de Rituximab, incluyendo la secuencia: QDKLTQWPKWLE (SEQ ID No. 19).

- 5 La proteína quimérica de la presente invención puede comprender un epítipo de unión a Rituximab que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID No. 7 a 19 o una variante de la misma que retiene la actividad de unión a Rituximab.

10 Un epítipo de unión a Rituximab variante se basa en la secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID No. 7 a 19, pero comprende una o más mutaciones de aminoácidos, tales como inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos, siempre que el epítipo retenga la actividad de unión a Rituximab. La secuencia puede comprender 3 o menos, 2 o menos, o una mutación de aminoácidos.

15 Un epítipo de unión a Rituximab tal como uno que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID No. 7 a 19 o una variante del mismo puede introducirse en un bucle extracelular o una secuencia extracelular de aminoácidos o carboxi-terminal de una proteína transmembrana de múltiples segmentos por métodos conocidos en la técnica, tales como el uso de técnicas recombinantes.

20 Endodominio FAS

El receptor FAS (FasR), también conocido como antígeno de apoptosis 1 (APO-1 o APT), grupo de diferenciación 95 (CD95) o miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 6 (TNFRSF6) es un receptor de muerte en la superficie de células que conducen a la muerte celular programada (apoptosis).

25 La proteína FAS madura tiene 319 aminoácidos, tiene un peso molecular previsto de 48 kD y se divide en 3 dominios: un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. El dominio extracelular tiene 157 aminoácidos y es rico en residuos de cisteína. Los dominios transmembrana y citoplasmático tienen 17 y 145 aminoácidos, respectivamente.

30 El citoplasma o endodominio de FAS contiene el "dominio de la muerte".

El ligando fisiológico para FAS es FASL, que es un miembro de la familia de las citoquinas TNF. FASL se expresa en células T activadas, células asesinas naturales (NK) y otras células del sistema inmune. Cuando FAS se une a su ligando, se inicia una cascada de caspasa dentro de la célula que finalmente conduce a su muerte.

35 FAS forma el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) al unirse al ligando. El trímero de ligando FAS anclado a la membrana en la superficie de una célula adyacente provoca la oligomerización de FAS. Después de la agregación del dominio de muerte (DD), el complejo receptor se internaliza a través de la maquinaria endosómica celular. Esto permite que la molécula adaptadora FADD se una al dominio de muerte de FAS a través de su propio dominio de muerte.

40 FAS desempeña papeles críticos en el sistema inmune, incluida la destrucción de células infectadas con patógenos y la muerte de linfocitos obsoletos y autorreactivos. De esta manera, en el sistema inmune, FAS protege contra la autoinmunidad y el desarrollo de tumores linfoides. FAS desencadena la apoptosis a través del reclutamiento mediado por FADD y la activación de caspasa-8. Mientras que, en el tejido no linfóide, por ejemplo, hepatocitos, la

apoptosis inducida por FAS requiere amplificación a través de la activación proteolítica del miembro de la familia proapoptótico BCL-2 BID. Sin embargo, las células linfoides son extremadamente sensibles a la activación de FAS.

5 La unión del ligando extracelular a la proteína transmembrana de múltiples segmentos provoca la activación del endodominio FAS de una manera análoga a la FAS de unión a FASL. La unión del ligando extracelular a la proteína transmembrana de múltiples segmentos provoca la agregación de los endodominios de FAS, la unión de FADD y la activación de caspasa-8.

10 FAS es un componente clave en una vía a través de la cual se eliminan los linfocitos autorreactivos. La proteína quimérica de la presente invención explota esta vía como un gen suicida, una de cuyas aplicaciones clave es detener las respuestas de células T diseñadas que son autorreactivas (por ejemplo, toxicidad fuera del tumor en el blanco).

15 La proteína quimérica de la presente invención puede comprender el dominio citoplasmático de FAS, que corresponde a los residuos 174-317 de FAS y tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 20, o una variante de la misma.

SEQ ID No. 20

20 EVQKTCRKHRKENQGSHEPTLNPETVAINLSDVDLSKYITTIAGVMTLSQVKG FVRKNGVNE  
AKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTLAEKIQTIILKDIT  
SDSENSNFRNEIQSLV

25 La proteína quimérica de la presente invención puede comprender el "dominio de muerte" de FAS, que corresponde a los residuos 230-314 del endodominio de FAS y tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 29, o una variante de la misma.

SEQ ID No. 29

30 SKYITTIAGVMTLSQVKG FVRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYD  
TLIKDLKKANLCTLAEKIQTII

Las secuencias variantes pueden tener al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 20 o 29, siempre que la variante de FAS conserve la capacidad de desencadenar la apoptosis. Es decir, siempre que la variante de FAS conserve la capacidad de provocar el ensamblaje de DISC tras la unión del ligando, lo que conduce a la posterior activación de caspasa-8.

35 Ligando extracelular

El ligando extracelular puede ser cualquier proteína u otra entidad que sea capaz de unirse al dominio de unión al ligando de la porción transmembrana de múltiples segmentos de la proteína quimérica que conduce a la activación del endodominio FAS.

40 El término "extracelular" indica que el ligando está presente fuera de la célula que comprende la proteína quimérica de la invención en su membrana celular.

45 El ligando extracelular puede causar la agrupación de la proteína quimérica del primer aspecto de la invención en la membrana celular. El ligando extracelular puede ser, en sí mismo, lítico (como el rituximab), proporcionando otro mecanismo por el cual las células que expresan la proteína quimérica se destruyen.

El ligando extracelular puede ser un ligando soluble (es decir, no unido a la membrana).

50 Para evitar la eliminación descontrolada de células que expresan el gen suicida, el ligando extracelular no debe ser un ligando endógeno o tener una contraparte endógena que también sea capaz de unirse a la porción de la proteína quimérica que abarca varias membranas.

55 El ligando extracelular puede ser un ligando sintético o un ligando natural que no es endógeno para el sujeto (por ejemplo, derivado de una planta u otra especie animal).

En particular, el ligando extracelular puede ser un anticuerpo, término que incluye fragmentos de anticuerpos y miméticos.

60 Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" significa un polipéptido que tiene un sitio de unión a antígeno

que comprende al menos una región determinante de complementariedad CDR. El anticuerpo puede comprender 3 CDR y tener un sitio de unión a antígeno que es equivalente al de un anticuerpo de dominio (dAb). El anticuerpo puede comprender 6 CDR y tener un sitio de unión a antígeno que es equivalente al de una molécula de anticuerpo clásica. El resto del polipéptido puede ser cualquier secuencia que proporcione un armazón adecuado para el sitio de unión al antígeno y lo muestre de manera apropiada para que se una al antígeno. El anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina completa o una parte de la misma, como un fragmento Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv, Fv de cadena simple (ScFv) o nanocuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo bifuncional. El anticuerpo puede ser no humano, quimérico, humanizado o completamente humano.

Por lo tanto, el anticuerpo puede ser cualquier fragmento funcional que retenga la especificidad antigénica del anticuerpo completo.

El dominio de unión al ligando extracelular puede comprender, por otro lado, una unidad estructural de unión que no se deriva de una inmunoglobulina ni se basa en ella. Se han desarrollado varias proteínas repetidas (DRP) diseñadas por "miméticos de anticuerpos" para explotar las capacidades de unión de los polipéptidos no anticuerpos.

Las proteínas repetidas como la anquirina o las proteínas repetidas ricas en leucina son moléculas de unión ubicuas que se producen, a diferencia de los anticuerpos, intra- y extracelularmente. Su arquitectura modular única presenta unidades estructurales repetitivas (repeticiones), que se apilan juntas para formar dominios de repetición alargados que muestran superficies de unión a objetivos variables y modulares. En base a esta modularidad, se pueden generar bibliotecas combinatorias de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas. Las DARPs (proteínas repetitivas de anquirina diseñadas) son un ejemplo de un mimético de anticuerpo basado en esta tecnología.

Para las anticalinas, la especificidad de unión se deriva de las lipocalinas, una familia de proteínas que realizan una variedad de funciones in vivo asociadas con el transporte fisiológico y el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un barril β altamente conservado que soporta cuatro bucles en un extremo de la proteína. Estos bucles para la entrada a un bolsillo de unión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula explican la variación en la especificidad de unión entre diferentes lipocalinas.

Los avímeros se desarrollan a partir de una gran familia de dominios de receptores extracelulares humanos mediante la combinación aleatoria de exones in vitro y la presentación de fagos, generando proteínas multidominio con propiedades de unión e inhibitorias.

Versacuerpos son pequeñas proteínas de 3-5 kDa con >15% de cisteínas que forman un andamio de alta densidad de disulfuro, reemplazando el núcleo hidrofóbico presente en la mayoría de las proteínas. El reemplazo de una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos, que comprende el núcleo hidrofóbico, con una pequeña cantidad de disulfuros da como resultado una proteína que es más pequeña, más hidrofílica, más resistente a las proteasas y al calor y tiene una menor densidad de epítomos de células T. Las cuatro propiedades dan como resultado una proteína que tiene una inmunogenicidad considerablemente reducida. También pueden producirse en E. coli, y son altamente solubles y estables.

#### Anticuerpos monoclonales CD20

CD20 es el objetivo de los anticuerpos monoclonales (mAb) como rituximab, ofatumumab, veltuzumab, obinutuzumab, ibritumomab, tiuxetan y tositumomab.

El ligando extracelular puede estar o comprender sobre estos mAb CD20 o el dominio de unión del mismo.

Varios anticuerpos anti-CD20 han sido aprobados para uso terapéutico o están actualmente en ensayos clínicos, por ejemplo:

- Rituximab para el tratamiento del linfoma no Hodgkin y la leucemia linfocítica crónica (CLL)
- Ofatumumab fue aprobado por la FDA en octubre de 2009 para CLL;
- Obinutuzumab fue aprobado por la FDA en noviembre de 2013 para CLL;

El mAb quimérico rituximab (Rituxan) fue el primer anticuerpo monoclonal CD20 aprobado por la FDA. Actualmente está aprobado para tratar tumores malignos de células B CD20 positivas; por ejemplo, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica (CLL). Además, también está aprobado para su uso en algunas enfermedades autoinmunes, incluida la artritis reumatoide. El rituximab se usa cada vez más en otras diversas enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (SLE) o esclerosis múltiple. En indicaciones oncológicas, el rituximab se usó típicamente en combinación con quimioterapia, por ejemplo, el régimen CHOP con Rituximab (R-CHOP) es el estándar de atención para el linfoma difuso de células B grandes. El rituximab se usa cada vez más en

trastornos linfoproliferativos indolentes como monoterapia en una fase de mantenimiento prolongada. Rituximab es por mucho el anticuerpo terapéutico más utilizado. En consecuencia, ha surgido una imagen muy clara de sus propiedades farmacológicas: el rituximab es un anticuerpo linfodepletor altamente potente. Por lo general, se tolera muy bien. Aunque la monoterapia con rituximab da como resultado el agotamiento de las células B, el riesgo aumentado de infección, particularmente con regímenes cortos, es leve.

Rituximab es un denominado mAb CD20 de tipo I. El Rituximab induce la reorganización de las moléculas de CD20 en balsas lipídicas y, en consecuencia, activa eficazmente la vía clásica del sistema del complemento. Por el contrario, los mAbs CD20 de tipo II no tienen este efecto y activan pobremente el complemento. Ambos tipos son capaces de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras.

Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano modificado genéticamente. El anticuerpo es una inmunoglobulina IgG1 kappa que contiene secuencias de región variable de cadena liviana y pesada murinas y secuencias de región constante humana.

Las regiones variables de cadena pesada y liviana de Rituximab como se muestra en las SEQ ID No. 21 y 22.

Las regiones variables de la cadena pesada y liviana de ofatumumab como se muestra en las SEQ ID No. 23 y 24, con las secuencias CDR subrayadas.

Secuencia de cadena variable de cadena pesada de rituximab (SEQ ID No. 21)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK  
FKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVS

Secuencia de cadena variable de la cadena liviana de rituximab (SEQ ID No. 22)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFAQKPGSSPKPWIIYATSNLASGVPVRFSG  
SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR

El ligando extracelular que se une a la proteína quimérica de la invención puede ser o comprender Rituximab o sus porciones de unión. Por ejemplo, el ligando extracelular puede comprender la región variable de la cadena pesada de rituximab mostrada como SEQ ID No. 21 y/o la región variable de la cadena liviana de rituximab mostrada como SEQ ID No. 22. El ligando extracelular puede comprender CDR3 de la región variable de cadena pesada de rituximab mostrada como SEQ ID No. 21 y/o CDR3 de la región variable de cadena liviana de rituximab mostrada como SEQ ID No. 22. El ligando extracelular puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada de rituximab mostrada como SEQ ID No. 21 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena liviana de rituximab mostrada como SEQ ID No. 22.

Si bien Rituximab es el primer mAb anti-CD20 estándar en uso clínico, se han desarrollado otros y están en uso. El mAb CD20 ofatumumab completamente humano fue aprobado por la FDA en 2009 para el tratamiento de pacientes con CLL resistentes tanto a alemtuzumab como a fludarabina. El reconocimiento de ofatumumab de CD20 difiere del de Rituximab en que reconoce un epítipo superpuesto en el bucle extracelular pequeño y grande de CD20. Ofatumumab es un anticuerpo de tipo I y se considera que da como resultado una activación del complemento aún mejor que Rituximab, tal vez debido a una mejor formación de balsa lipídica. Veltuzumab es un mAb CD20 humanizado que transporta secuencias de CDR similares a Rituximab (y, por lo tanto, se une al mismo epítipo). El obinutuzumab (también conocido como GA101) es un mAb terapéutico anti-CD20 inusual ya que es un mAb CD20 de tipo II. Obinutuzumab se encuentra en desarrollo clínico.

Secuencia de cadena variable de la cadena pesada de ofatumumab (SEQ ID No. 23)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIQYADS  
VKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYYGMDVWVGQGTTVTSS

Secuencia de cadena variable de la cadena liviana de ofatumumab (SEQ ID No. 24)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFS  
GSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGRLEIK

En las secuencias anteriores, las secuencias de CDR están subrayadas.

El ligando extracelular que se une a la proteína quimérica de la invención puede ser o comprender ofatumumab o sus porciones de unión. Por ejemplo, el ligando extracelular puede comprender la región variable de la cadena pesada de ofatumumab mostrada como SEQ ID No. 23 y/o la región variable de la cadena liviana de ofatumumab mostrada como SEQ ID No. 24. El ligando extracelular puede comprender CDR3 de la región variable de cadena pesada de ofatumumab mostrada como SEQ ID No. 23 y/o CDR3 de la región variable de cadena liviana de ofatumumab mostrada como SEQ ID No. 24. El ligando extracelular puede comprender CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada de ofatumumab mostrada como SEQ ID No. 23 y/o CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena liviana de ofatumumab mostrada como SEQ ID No. 24.

Rituximab y Ofatumumab (y posiblemente Veltuzumab) son ideales para el desencadenante FAS del gen suicida de la presente invención, ya que causan la agrupación de CD20 y son intrínsecamente muy líticos y en especial Rituximab tiene un perfil de seguridad muy bien establecido. En ocasiones, un gen suicida desencadenado por Rituximab puede no ser práctico, esto sería en pacientes que reciben Rituximab en forma regular, particularmente el Rituximab de mantenimiento. Dado que Rituximab tiene una vida media tan larga y es probable que el enfoque del gen suicida que estamos desarrollando tenga tal sensibilidad, puede tomar meses después de una dosis de Rituximab para poder administrar células T manipuladas por ingeniería. En estos pacientes, sería útil tener una variante CD20 que fuera insensible al Rituximab pero sensible al Ofatumumab.

#### Secuencias de ácidos nucleicos

El segundo aspecto de la invención proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína quimérica según la invención.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “polinucleótido”, “nucleótido” y “ácido nucleico” pretenden ser sinónimos entre sí.

Un experto entenderá que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que los expertos pueden realizar, utilizando técnicas de rutina, sustituciones de nucleótidos que no afectan la secuencia de polipéptidos codificada por los polinucleótidos descritos aquí para reflejar el uso de codones de cualquier organismo huésped particular en el que los polipéptidos van a ser expresados.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. También pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de ellos nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica, se conocen varios tipos diferentes de modificación de oligonucleótidos. Estos incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosfortioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines del uso como se describe en el presente documento, debe entenderse que los polinucleótidos pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo para mejorar la actividad in vivo o la vida útil de los polinucleótidos de interés.

Los términos “variante”, “homólogo” o “derivado” en relación con una secuencia de nucleótidos incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno (o más) ácidos nucleicos de o a la secuencia.

La secuencia de ácidos nucleicos puede codificar la secuencia de proteína quimérica mostrada como SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 o una variante de la misma.

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia mostrada como SEQ ID No. 25 o 26.

SEQ ID No. 25 dCD20-FAS

ATGGGCCAGAGCTTCTTCATGCGGGAGAGCAAGACCCTGGGAGCCGTGCAGATCATGAACGGC  
 CTGTTCCACATCGCCCTGGGAGGCCTGCTGATGATCCCTGCCGGCATCTACGCCCCAATCTGC  
 GTGACCGTGTGGTACCCACTGTGGGGAGGCATCATGTACATCATCAGCGGCAGCCTGCTGGCC  
 GCCACCGAGAAGAACAGCCGGAAGTGCCTGGTGAAGGGCAAGATGATCATGAACAGCCTGAGC  
 CTGTTCCGCGCCATCAGCGGCATGATCCTGAGCATCATGGACATCCTGAACATCAAGATCAGC  
 CACTTCCTGAAGATGGAGAGCCTGAACTTCATCCGGGCCACACCCCATAACATCTAC  
 AACTGCGAGCCTGCCAACCCCAGCGAGAAGAACAGCCCCAGCACCCAGTACTGCTACAGCATC  
 CAGAGCCTGTTCTGGGCATCCTGAGCGTGATGCTGATCTTCGCCTTCTTCCAGGAGCTGGTG  
 ATCGCCGGCATCGTGGAGAACGAGTGGAAGCGGACCTGCAGCCGGCCCAAGAGCAACATCGTG  
 CTGCTGAGCGCCGAAGAGAAGAAAGAGCAGACCATCGAGATCAAGGAGGAAGTGGTGGGCCTG  
 ACCGAGACCAGCAGCCAGCCCAAGAACGAGGAGGACATCGAGATCATCCCCATCCAGGAAGAA  
 GAGGAAGAGGAGACCGAGACCAACTTCCCCGAGCCACCCAGGACCAGGAGAGCAGCCCTATC  
 GAGAACGACAGCAGCCCCAGCGGTGGCGGTGGCAGCGAGGTACAGAAAACATGCAGAAAAGCAC  
 AGAAAGGAAAACCAAGGTTCTCATGAATCTCCAACCTTAAATCCTGAAACAGTGGCAATAAAT  
 TTATCTGATGTTGACTTGAGTAAATATATCACCCTATTGCTGGAGTCATGACACTAAGTCAA  
 GTTAAAGGCTTTGTTTCGAAAGAATGGTGTCAATGAAGCCAAAATAGATGAGATCAAGAATGAC  
 AATGTCCAAGACACAGCAGAACAGAAAGTTCAACTGCTTCGTAATTGGCATCAACTTCATGGA  
 AAGAAAGAAGCGTATGACACATTGATTAAGATCTCAAAAAGCCAATCTTTGTACTCTTGCA  
 GAGAAAATTCAGACTATCATCCTCAAGGACATTACTAGTGACTCAGAAAATTCAAACTTCAGA  
 AATGAAATCCAAAGCTTGGTCTGA

5 SEQ ID No. 26 dCD20<sub>p172W</sub>-FAS

ATGGGCCAGAGCTTCTTCATGCGGGAGAGCAAGACCCTGGGAGCCGTGCAGATCATGAACGGC  
 CTGTTCCACATCGCCCTGGGAGGCCTGCTGATGATCCCTGCCGGCATCTACGCCCCAATCTGC  
 GTGACCGTGTGGTACCCACTGTGGGGAGGCATCATGTACATCATCAGCGGCAGCCTGCTGGCC  
 GCCACCGAGAAGAACAGCCGGAAGTGCCTGGTGAAGGGCAAGATGATCATGAACAGCCTGAGC  
 CTGTTCCGCGCCATCAGCGGCATGATCCTGAGCATCATGGACATCCTGAACATCAAGATCAGC  
 CACTTCCTGAAGATGGAGAGCCTGAACTTCATCCGGGCCACACCCCATAACATCTAC  
 AACTGCGAGCCTGCCAACTGGAGCGAGAAGAACAGCCCCAGCACCCAGTACTGCTACAGCATC  
 CAGAGCCTGTTCTGGGCATCCTGAGCGTGATGCTGATCTTCGCCTTCTTCCAGGAGCTGGTG  
 ATCGCCGGCATCGTGGAGAACGAGTGGAAGCGGACCTGCAGCCGGCCCAAGAGCAACATCGTG  
 CTGCTGAGCGCCGAAGAGAAGAAAGAGCAGACCATCGAGATCAAGGAGGAAGTGGTGGGCCTG  
 ACCGAGACCAGCAGCCAGCCCAAGAACGAGGAGGACATCGAGATCATCCCCATCCAGGAAGAA  
 GAGGAAGAGGAGACCGAGACCAACTTCCCCGAGCCACCCAGGACCAGGAGAGCAGCCCTATC  
 GAGAACGACAGCAGCCCCAGCGGTGGCGGTGGCAGCGAGGTACAGAAAACATGCAGAAAAGCAC  
 AGAAAGGAAAACCAAGGTTCTCATGAATCTCCAACCTTAAATCCTGAAACAGTGGCAATAAAT  
 TTATCTGATGTTGACTTGAGTAAATATATCACCCTATTGCTGGAGTCATGACACTAAGTCAA  
 GTTAAAGGCTTTGTTTCGAAAGAATGGTGTCAATGAAGCCAAAATAGATGAGATCAAGAATGAC  
 AATGTCCAAGACACAGCAGAACAGAAAGTTCAACTGCTTCGTAATTGGCATCAACTTCATGGA  
 AAGAAAGAAGCGTATGACACATTGATTAAGATCTCAAAAAGCCAATCTTTGTACTCTTGCA  
 GAGAAAATTCAGACTATCATCCTCAAGGACATTACTAGTGACTCAGAAAATTCAAACTTCAGA  
 AATGAAATCCAAAGCTTGGTCTGA

Construceto de ácido nucleico

La invención también proporciona un construceto de ácido nucleico que comprende:

- 5 i) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína quimérica que comprende una proteína transmembrana de múltiples segmentos fusionada a un endodominio FAS; y
- ii) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un nucleótido de interés (NOI).

10 El NOI puede codificar, por ejemplo, un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden unirse por una secuencia que permita la coexpresión de las dos o más secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el construceto puede comprender un promotor interno, una secuencia de entrada de ribosoma interno (IRES) o una secuencia que codifica un sitio de escisión. El sitio de escisión puede ser autoescindible, de modo que cuando se produce el polipéptido, se escinde inmediatamente en las proteínas discretas sin la necesidad de ninguna actividad de escisión externa.

Se conocen diversos sitios de autoescisión, incluido el péptido de autoescisión del virus de la fiebre aftosa (FMDV) 2a, que tiene la secuencia mostrada como SEQ ID No. 27 o 28:

20 SEQ ID No. 27

**RAEGRGSLTTCGDVEENPGP**

25 o

SEQ ID No 28

**QCTNYALLKLAGDVESNPGP**

30 La secuencia de coexpresión puede ser una secuencia interna de entrada en el ribosoma (IRES). La secuencia que coexpresa puede ser un promotor interno.

35 Receptor de células T (TCR)

El receptor de células T o TCR es una molécula que se encuentra en la superficie de las células T y es responsable de reconocer los antígenos unidos a las principales moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC). La unión entre TCR y antígeno es de afinidad relativamente baja y es degenerada: muchos TCR reconocen el mismo antígeno y muchos antígenos son reconocidos por el mismo TCR.

40 El TCR se compone de dos cadenas de proteínas diferentes, es decir, es un heterodímero. En el 95% de las células T, esta consiste en una cadena alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), mientras que en el 5% de las células T está compuesto de cadenas gamma y delta ( $\gamma/\delta$ ). Esta relación cambia durante la ontogenia y en estados patológicos.

45 Cuando el TCR se involucra con el péptido antigénico y el MHC (péptido/MHC), el linfocito T se activa a través de una serie de eventos bioquímicos mediados por enzimas asociadas, correceptores, moléculas adaptadoras especializadas y factores de transcripción activados o liberados.

50 El construceto o vector de ácido nucleico de la presente invención puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena TCR  $\alpha$ , una cadena TCR  $\beta$ , una cadena TCR  $\gamma$  o una cadena TCR  $\delta$ . Puede comprender, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena TCR  $\alpha$  y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena TCR  $\beta$ ; o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena TCR  $\gamma$  o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena TCR  $\delta$ . Las dos secuencias de ácidos nucleicos se pueden unir mediante una secuencia que permite la coexpresión de las dos cadenas de TCR, como un promotor interno, una secuencia IRES o un sitio de escisión como un sitio de autoescisión.

55 Receptores de antígenos quiméricos (CAR)

La secuencia de ácidos nucleicos de interés (NOI) puede codificar un receptor de antígeno quimérico (CAR).

60 Los CAR clásicos son proteínas quiméricas transmembrana de tipo I que conectan un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular (ligador) a un dominio de señalización intracelular (endodominio). El ligador es típicamente un fragmento variable de cadena simple (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal (mAb), pero puede basarse en otros formatos que comprenden un sitio de unión a antígeno tal como un ligando. Puede ser necesario un dominio espaciador para aislar el ligador de la membrana y permitirle una orientación adecuada. Un dominio espaciador

65

común utilizado es el Fc de IgG1. Los espaciadores más compactos pueden ser suficientes, por ejemplo, el tallo de CD8α e incluso solo la bisagra IgG 1 sola, dependiendo del antígeno. Un dominio transmembrana ancla la proteína en la membrana celular y conecta el espaciador al endodominio que puede comprender o asociarse con un dominio de señalización intracelular.

5 Los primeros diseños de CAR tenían dominios de señalización intracelular derivados de las partes intracelulares de la cadena ζ de FcεR1 o CD3ζ. En consecuencia, estos receptores de primera generación transmitían la señal inmunológica 1, que era suficiente para desencadenar la muerte de las células T de las células diana relacionadas, pero no pudieron activar completamente las células T para proliferar y sobrevivir. Para superar esta limitación, se han construido dominios de señalización compuestos: la fusión de la parte intracelular de una molécula coestimuladora de células T con la de CD3ζ resulta en receptores de segunda generación que pueden transmitir una señal activadora y coestimuladora simultáneamente después del reconocimiento de antígeno. El dominio coestimulador más utilizado es el de CD28. Esto proporciona la señal coestimuladora más potente, a saber, la señal inmunológica 2, que desencadena la proliferación de células T. También se han descrito algunos receptores que incluyen los endodominios de la familia de receptores de TNF, como los OX40 y 41BB estrechamente relacionados que transmiten señales de supervivencia. Incluso se han descrito CAR más potentes de tercera generación que tienen dominios de señalización intracelular capaces de transmitir señales de activación, proliferación y supervivencia.

20 Los ácidos nucleicos que codifican CAR pueden transferirse a células T usando, por ejemplo, vectores retrovirales. De esta manera, se puede generar una gran cantidad de células T específicas de antígeno para la transferencia de células adoptivas. Cuando el CAR se une al antígeno diana, esto da como resultado la transmisión de una señal de activación a la célula T en la que se expresa. Por lo tanto, el CAR dirige la especificidad y la citotoxicidad de la célula T hacia las células que expresan el antígeno dirigido.

25 Vector

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos o un constructo de ácido nucleico de la invención.

30 La presente invención también proporciona un vector o kit de vectores que comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos o constructos de ácido nucleico de la invención y, opcionalmente, una de más adiciones de secuencias de ácidos nucleicos de interés (NOI). Tal vector puede usarse para introducir la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos o los constructos de ácido nucleico en una célula huésped de modo que exprese una o más proteínas quiméricas de acuerdo con el primer aspecto de la invención y opcionalmente una o más diversas proteínas de interés (POI). El kit también puede comprender un ligando extracelular.

35 El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, como un vector retroviral o un vector lentiviral, o un vector basado en transposón o un ARNm sintético.

40 El vector puede ser capaz de transfectar o transducir una célula T.

45 El NOI puede codificar, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico o un receptor de células T, de modo que, cuando el vector se usa para transducir una célula diana, la célula diana coexpresa una proteína quimérica y un receptor de antígeno quimérico o receptor de células T.

Célula

50 La presente invención también se refiere a una célula que comprende una proteína quimérica de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

La célula puede ser, por ejemplo, una célula inmune como una célula T o una célula asesina natural (NK).

55 La célula puede ser una célula madre, como una célula madre hematopoyética.

Células T o linfocitos T que son un tipo de linfocito que desempeña un papel central en la inmunidad celular. Se pueden distinguir de otros linfocitos, como las células B y las células asesinas naturales (células NK), por la presencia de un receptor de células T (TCR) en la superficie celular. Hay varios tipos de células T, como se resume a continuación.

60 Las células T helper (células TH) ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunológicos, incluida la maduración de las células B en células plasmáticas y células B de memoria, y la activación de células T citotóxicas y macrófagos. Las células TH expresan CD4 en su superficie. Las células TH se activan cuando las moléculas MHC de clase II les presentan antígenos peptídicos en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Estas células pueden diferenciarse en uno de varios subtipos, incluidos TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 o TFH, que secretan diferentes citoquinas para facilitar distintos tipos de respuestas inmunes.



5 Las células T citolíticas (células TC o CTL) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Las CTL expresan el CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con el MHC de clase I, que está presente en la superficie de todas las células nucleadas. A través de la IL-10, la adenosina y otras moléculas secretadas por las células T reguladoras, las células CD8+ pueden inactivarse a un estado anérgico, que previene enfermedades autoinmunes como la encefalomiелitis autoinmune experimental.

10 Las células T de memoria son un subconjunto de células T específicas de antígeno que persisten a largo plazo después de que se resuelve una infección. Se expanden rápidamente a un gran número de células T efectoras al volver a exponerse a su antígeno cognado, lo que proporciona al sistema inmunitario "memoria" contra infecciones pasadas. Las células T de memoria comprenden tres subtipos: células T de memoria central (células TCM) y dos tipos de células T efectoras de memoria (células TEM y células TEMRA). Las células de memoria pueden ser CD4+ o CD8+. Las células T de memoria típicamente expresan la proteína de la superficie celular CD45RO.

15 Las células T reguladoras (células Treg), antes conocidas como células T supresoras, son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Su función principal es cerrar la inmunidad mediada por células T hacia el final de una reacción inmune y suprimir las células T autorreactivas que escaparon al proceso de selección negativa en el timo.

20 Se describieron dos clases principales de células Treg CD4+: las células Treg de origen natural y las células Treg adaptativas.

25 Las células Treg de origen natural (también conocidas como células Treg CD4+ CD25+ FoxP3+) surgen en el timo y se han relacionado con interacciones entre las células T en desarrollo con células dendríticas mieloides (CD11c+) y plasmacitoides (CD123+) que se han activado con TSLP. Las células Treg de origen natural se pueden distinguir de otras células T por la presencia de una molécula intracelular llamada FoxP3. Las mutaciones del gen FOXP3 pueden prevenir el desarrollo de células T reguladoras, causando la enfermedad autoinmune fatal IPEX.

30 Las células Treg adaptativas (también conocidas como células Tr1 o células Th3) pueden originarse durante una respuesta inmune normal.

35 Las células asesinas naturales (o células NK) son un tipo de célula citolítica que forma parte del sistema inmune innato. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las señales innatas de las células infectadas por virus de manera independiente de MHC.

40 Las células NK (que pertenecen al grupo de las células linfoides innatas) se definen como linfocitos granulares grandes (LGL) y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas del progenitor linfoide común que genera linfocitos B y T. Se sabe que las células NK se diferencian y maduran en la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas y el timo, donde luego entran en la circulación.

45 Las células madre son células no diferenciadas que pueden diferenciarse en células especializadas. En los mamíferos, existen dos grandes tipos de células madre: células madre embrionarias, que se aíslan de la masa celular interna de los blastocistos, y células madre adultas, que se encuentran en diversos tejidos. En organismos adultos, las células madre y las células progenitoras actúan como un sistema de reparación para el cuerpo, reponiendo los tejidos adultos. En un embrión en desarrollo, las células madre pueden diferenciarse en todas las células especializadas: ectodermo, endodermo y mesodermo (ver células madre pluripotentes inducidas), pero también mantienen el recambio normal de los órganos regenerativos, como la sangre, la piel o los tejidos intestinales.

50 Hay tres fuentes accesibles conocidas de células madre adultas autólogas en humanos:

1. Médula ósea, que requiere extracción mediante cosecha, es decir, perforación en hueso.
- 55 2. Tejido adiposo, que requiere extracción por liposucción.
3. Sangre, que requiere extracción mediante aféresis, en la que se extrae sangre del donante y se pasa a través de una máquina que extrae las células madre y devuelve otras partes de la sangre al donante.

60 Las células madre adultas se usan con frecuencia en terapias médicas, por ejemplo, en el trasplante de médula ósea. Las células madre ahora pueden crecer artificialmente y transformarse (diferenciarse) en tipos de células especializadas con características consistentes con las células de diversos tejidos, como los músculos o los nervios. Las líneas celulares embrionarias y las células madre embrionarias autólogas generadas a través de transferencia nuclear o desdiferenciación de células somáticas también se pueden usar para generar tipos celulares especializados para la terapia celular.

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son las células sanguíneas que dan origen a todas las demás células sanguíneas y se derivan del mesodermo. Se encuentran en la médula ósea roja, que está contenida en el núcleo de la mayoría de los huesos.

5 Dan origen a los linajes mieloide (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linfoide (células T, células B, células NK). El tejido hematopoyético contiene células con capacidades de regeneración a largo y corto plazo y progenitores multipotentes, oligopotenciales y unipotentes comprometidos.

10 Las HSC son una población heterogénea. Existen tres clases de células madre, que se distinguen por su proporción de progenie linfóide a mieloide (L/M) en la sangre. Las HSC con sesgo mieloide (My-bi) tienen una relación L/M baja (entre 0 y 3), mientras que las HSC con sesgo linfóide (Ly-bi) muestran una proporción grande (>10). La tercera categoría consiste en la HSC balanceada (Bala), cuya proporción L/M está entre 3 y 10. Solo las HSC balanceadas y de sesgo mieloide tienen propiedades duraderas de autorrenovación.

15 Las células que expresan proteínas quiméricas de la invención pueden ser cualquiera de los tipos de células mencionados anteriormente.

20 Las células T o NK que expresan una o más proteínas quiméricas de acuerdo con el primer aspecto de la invención pueden crearse ex vivo a partir de la propia sangre periférica del paciente (primera parte) o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de la sangre periférica del donante (segunda parte) o sangre periférica de un donante no conectado (tercera parte).

25 Alternativamente, las células T o NK que expresan una o más proteínas quiméricas de acuerdo con el primer aspecto de la invención pueden derivarse de la diferenciación ex vivo de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias a células T. Alternativamente, se puede usar una línea de células T inmortalizadas que conserva su función lítica y podría actuar como un agente terapéutico.

30 En todas estas realizaciones, las células que expresan proteínas quiméricas se generan mediante la introducción de ADN o ARN que codifica la proteína quimérica, o cada una, y opcionalmente un NOI por medio de la transducción con un vector viral o la transfección con ADN o ARN.

35 La célula de la invención puede ser una célula T o NK ex vivo de un sujeto. La célula T o NK puede ser de una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células T o NK pueden activarse y/o expandirse antes de transducirse con ácido nucleico que codifica una o más proteínas quiméricas de acuerdo con el primer aspecto de la invención, por ejemplo, mediante tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD3.

La célula T o NK de la invención puede estar hecha por:

40 (i) aislamiento de una muestra que contiene células T o NK de un sujeto u otras fuentes enumeradas anteriormente; y

45 (ii) transducción o transfección de las células T o NK con una o más secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

La presente invención también proporciona un kit que comprende una célula T o NK que comprende una o más proteínas quiméricas de acuerdo con el primer aspecto de la invención y un CID.

#### Composición farmacéutica

50 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una pluralidad de células de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tal formulación puede estar, por ejemplo, en una forma adecuada para infusión intravenosa.

#### Métodos

60 La invención también proporciona un método para producir una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención que comprende la etapa de transducir o transfectar una célula con un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención ex vivo.

El vector puede ser, por ejemplo, un vector retroviral o lentiviral.

65 La descripción también proporciona un método para eliminar una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, que comprende la etapa de exponer las células a un ligando extracelular que se une a la proteína

transmembrana de múltiples segmentos.

La unión del ligando extracelular puede conducir a la activación del endodominio FAS y la apoptosis de la célula.

5 La unión del ligando extracelular puede conducir a la reticulación de proteínas transmembrana de múltiples segmentos de una pluralidad de proteínas quiméricas, lo que lleva a una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

10 Cuando el ligando extracelular es un anticuerpo, la unión del ligando extracelular puede conducir a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Las células pueden estar expuestas al ligando extracelular in vivo o in vitro.

15 El ligando extracelular puede ser, por ejemplo, un mAb antiCD20 como Rituximab, Ofatumumab o Veltuzumab.

El ligando extracelular puede administrarse en forma de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tal formulación puede estar, por ejemplo, en una forma adecuada para infusión intravenosa.

20 La descripción también proporciona un método para prevenir y/o tratar una reacción inmune patológica en un sujeto causada por la administración de una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención al sujeto, que comprende la etapa de administrar un ligando extracelular, capaz de unir la proteína transmembrana de múltiples segmentos al sujeto.

25 La reacción inmune patológica se puede seleccionar del siguiente grupo: enfermedad de injerto versus huésped; toxicidad en el objetivo, fuera del tumor; síndrome de activación inmune; y trastornos linfoproliferativos.

30 La descripción también proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención al sujeto. La célula puede estar en forma de una composición farmacéutica como se definió anteriormente.

35 El método puede comprender las siguientes etapas:

(i) transducir o transfectar una muestra de células aisladas de un sujeto con un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, y

40 (ii) administrar las células transducidas/transfectadas a un paciente.

Un método para tratar una enfermedad se refiere al uso terapéutico de las células de la presente invención. Aquí las células pueden administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección existente para disminuir, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o para ralentizar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

45 El método para prevenir una enfermedad se refiere al uso profiláctico de las células inmunes de la presente invención. Aquí, dichas células pueden administrarse a un sujeto que aún no ha contraído la enfermedad y/o que no muestra ningún síntoma de la enfermedad para prevenir o perjudicar la causa de la enfermedad o para reducir o prevenir el desarrollo de al menos un síntoma asociado con la enfermedad. El sujeto puede tener una predisposición o estar en riesgo de desarrollar la enfermedad.

50 Los métodos para tratar una enfermedad proporcionados por la presente descripción pueden implicar controlar la progresión de la enfermedad y controlar cualquier actividad tóxica y ajustar la dosis del ligando extracelular administrado al sujeto para proporcionar niveles aceptables de progresión de la enfermedad y actividad tóxica.

55 Controlar la progresión de la enfermedad significa evaluar los síntomas asociados con la enfermedad a lo largo del tiempo para determinar si están reduciendo/mejorando o aumentando/empeorando.

60 Las actividades tóxicas se refieren a los efectos adversos causados por las células de la invención después de su administración a un sujeto. Las actividades tóxicas pueden incluir, por ejemplo, toxicidad inmunológica, toxicidad biliar y síndrome de dificultad respiratoria.

65 En particular, la descripción proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto, que comprende las siguientes etapas:

(i) administrar una célula de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención al sujeto;

(ii) controlar al sujeto para el desarrollo de una reacción inmune patológica; y

5 (iii) administrar rapamicina o un análogo de rapamicina al sujeto si el sujeto muestra signos de desarrollo o de haber desarrollado una reacción inmune patológica.

La presente invención proporciona una célula de la presente invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

10 La célula puede usarse, por ejemplo, para trasplante de células madre hematopoyéticas, infusión de linfocitos o transferencia de células adoptivas.

La descripción también se refiere al uso de una célula de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.

15 La presente invención también proporciona un ligando extracelular capaz de activar una proteína quimérica de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una actividad tóxica.

20 La enfermedad por tratar y/o prevenir por las células y los métodos de la presente descripción puede ser una infección, como una infección viral.

Los métodos de la descripción también pueden ser para el control de respuestas inmunes patógenas, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes, alergias y rechazo de injerto versus huésped.

25 Cuando las células de la invención expresan TCR o CAR, pueden ser útiles para el tratamiento de una enfermedad cancerosa, como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.

30 Las células que expresan TCR/CAR de la presente invención pueden ser capaces de matar células diana, como las células cancerosas.

35 Las células de la presente invención pueden usarse en cualquier terapia celular en la que se administran células modificadas o no modificadas a un paciente. Un ejemplo de una terapia celular es la transferencia de células T adoptivas después del trasplante de células madre CD34+. La administración de células T después de la transferencia de células madre ayuda a acelerar la reconstitución de un sistema inmune en el receptor del paciente. Cuando un donante compatible relacionado o no relacionado no está disponible, o la enfermedad es demasiado agresiva para una búsqueda exhaustiva de donantes, el uso de un donante familiar haploidéntico HLA puede ser efectivo. Dichos donantes pueden ser padres, hermanos o parientes de segundo grado. Tales infusiones pueden mejorar la recuperación inmune y, por lo tanto, reducir las infecciones virales y eliminar las células leucémicas recurrentes. Sin embargo, la coexistencia de células T alorreactivas en un injerto de células madre del donante puede causar enfermedad de injerto versus huésped (GvHD) en la que las células del donante reaccionan contra el receptor, lo que puede dañar progresivamente la piel, el intestino, el hígado y otros órganos del receptor.

45 Otros ejemplos de terapias celulares incluyen el uso de células nativas o células genéticamente modificadas para expresar un gen heterólogo. Estos tratamientos se usan para muchos trastornos, incluidos los trastornos de la sangre, pero estas terapias pueden tener efectos secundarios negativos. En otro método, las células progenitoras inmaduras que pueden diferenciarse en muchos tipos de células maduras, como, por ejemplo, las células del estroma mesenquimatoso, pueden usarse para tratar trastornos al reemplazar la función de las células enfermas. La presente invención proporciona un mecanismo rápido y efectivo para eliminar los posibles efectos negativos de las células donantes utilizadas en la terapia celular.

50 La presente descripción proporciona un método para reducir el efecto de la enfermedad de injerto versus huésped en un paciente humano después del trasplante de células T de donante, que comprende transfectar o transducir células T de donante humano en un cultivo de células de donante con vector de acuerdo con la presente invención; administrar las células T de donante transducidas o transfectadas al paciente; posteriormente, detectar la presencia o ausencia de enfermedad de injerto versus huésped en el paciente; y administrar un ligando extracelular a un paciente para el que se detecta la presencia de enfermedad de injerto versus huésped. Las células T pueden estar no aloagotadas.

60 La presente descripción proporciona un método de trasplante de células madre, que comprende administrar un trasplante de células madre haploidéntico a un paciente humano; y administrar células T de donante haploidénticas al paciente, en donde las células T se transfectan o transducen en un cultivo de células de donante haploidénticas con un vector de acuerdo con la invención.

65

Las células pueden ser células T de donante humano no aloagotadas en un cultivo de células donantes.

La presente descripción también proporciona un método de trasplante de células madre, que comprende administrar un trasplante de células madre haploidénticas a un paciente humano; y administrar células T de donante haploidénticas no aloagotadas al paciente, en donde las células T se transfectan o transducen en un cultivo de células de donante haploidénticas con el vector de acuerdo con la invención.

El trasplante de células madre haploidénticas puede ser un trasplante de células madre haploidénticas CD34+. Las células T del donante humano pueden ser haploidénticas a las células T del paciente. El paciente puede presentar cualquier enfermedad o trastorno que pueda aliviarse con el trasplante de células madre. El paciente puede tener cáncer, como un tumor sólido o cáncer de sangre o médula ósea.

El paciente puede tener una enfermedad de la sangre o la médula ósea. El paciente puede tener anemia falciforme o leucodistrofia metacromática.

El cultivo de células donantes puede prepararse a partir de una muestra de médula ósea o de sangre periférica. El cultivo de células donantes puede prepararse a partir de células mononucleares de sangre periférica del donante. En algunas realizaciones, las células T del donante se aloagotan del cultivo de células del donante antes de la transfección o transducción. Las células T transducidas o transfectadas pueden cultivarse en presencia de IL-2 antes de administrar al paciente.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de ejemplos, que están destinados a ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Prueba de versiones truncadas de CD20

CD20 es una proteína de membrana de múltiples segmentos que se expresa en las células B y en casi todos los linfomas de células B, leucemia de células pilosas y leucemia linfocítica crónica de células B. CD20 tiene dos bucles extracelulares: un bucle menor y un bucle principal limitado por un enlace disulfuro. Tiene un endodominio amino-terminal y carboxi-terminal.

CD20 es reconocido por varios anticuerpos monoclonales terapéuticos, incluidos Rituximab y Ofatumumab. Los presentes inventores trataron de determinar si CD20 con una delección de los términos amino o carboxi del endodominio podría aún ser reconocido por dichos anticuerpos.

Con este fin: CD20 de longitud completa; un amino-terminal (endodominio) truncado de CD20; y un carboxi-terminal (endodominio) truncado de CD20 se fusionaron con eGFP. Las células 293T se transfectaron con estos plásmidos y se tiñeron con Rituximab u Ofatumumab. El análisis de citometría de flujo mostró que estos truncamientos no hacían ninguna diferencia en la expresión de superficie/reconocimiento de CD20 (Figura 1).

### Ejemplo 2 - Producción de una quimera FAS con baja toxicidad basal

La expresión de una quimera FAS simple (por ejemplo, una fusión entre RQR8 y FAS), o un receptor de antígeno quimérico con un endodominio FAS (Tone et al. (2013), Hum. Gene Ther. Methods 24, 141-150) da como resultado una toxicidad basal significativa. Dado que FAS es un desencadenante tan sensible de la apoptosis, puede ser que la simple sobreexpresión conduzca a una activación espontánea.

Para probar esto, se generó una quimera FAS que era una fusión entre una proteína que abarca múltiples membranas y FAS. Esto debería dar como resultado el "relleno" de los endodominios FAS, reduciendo la probabilidad de activación espontánea y, por lo tanto, reduciendo o eliminando la toxicidad basal. Se eligió CD20 como la proteína de múltiples segmentos y el terminal carboxi de la versión truncada en forma amino-terminal de CD20 se fusionó con el endodominio de FAS, para crear dCD20-FAS (Figura 2b).

Los constructos también coexpresaron eGFP que permite estudiar su expresión y función. También se incluyeron RQR8 y RQR8-FAS, una variante de RQR8 donde FAS está unido al término carboxi de RQR8. La función se probó en células 293T, comparando su toxicidad basal y la toxicidad inducida por la exposición a Ofatumumab. Los resultados se muestran en la Figura 3. A diferencia de RQR8-FAS que tenía altos niveles de toxicidad basal, dCD20-FAS dio como resultado una toxicidad basal muy baja y una toxicidad inducida muy alta.

### Ejemplo 3 - Investigación de la sensibilidad al Rituximab

Las células T Jurkat se transdujeron con dCD20-FAS y se expusieron a diferentes concentraciones de Rituximab (sin complemento) y se realizó un curso temporal. Se espera que la apoptosis mediada por FAS se active de modo relativamente lento. La apoptosis se determinó tiñendo las células T con anexina-V/7AAD. Sorprendentemente,

como se muestra en la Figura 4, en el transcurso de 24 y 48 h, la concentración de Rituximab que mata el 50% de las células es inferior a 3,125 g/ml. Se realizaron experimentos adicionales donde la destrucción de células T que expresan dCD20-FAS se expuso a diluciones adicionales de Rituximab durante 48 horas (Figura 5). Este experimento indicó que dCD20-FAS proporciona una activación muy sensible con un porcentaje que mata al 50% de las células que es aproximadamente 0,6 ug/ml. Esto está muy por debajo de los niveles terapéuticos de ~200 ug/ml (Berinstein et al. (1998), Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 9, 995-1001).

Ejemplo 4: investigación de la sensibilidad al ofatumumab

Las células T Jurkat se transdujeron con dCD20-FAS y se expusieron a diferentes concentraciones de Ofatumumab y se realizó un curso temporal (Figura 6). Las células T son notablemente sensibles al ofatumumab. La destrucción ocurrió más rápido y en concentraciones más bajas que con Rituximab. Con el fin de determinar la sensibilidad de las células T que expresan dCD20-FAS, se realizaron experimentos adicionales donde se determinó la destrucción de las células T dCD20-FAS después de 48 horas de exposición a diluciones crecientes de ofatumumab (Figura 7). Sorprendentemente, no se alcanzó la concentración de Ofatumumab donde se destruyó el 50% de las células T, estando esta concentración por debajo de 0,195 g/ml. Esto está muy por debajo de las concentraciones terapéuticas de Ofatumumab que se reportan entre 63 ug/ml y 1482 ug/ml (después de la primera infusión de Ofatumumab y la decimosegunda, respectivamente) (Gravanis et al. (2010) The Oncologist; 15: 1335-1343).

Ejemplo 5 - Ingeniería de CD20 para interrumpir Rituximab, pero no la unión de Ofatumumab

Puede haber situaciones en las que Rituximab no sea un fármaco activador ideal, por ejemplo, en grupos de pacientes que reciben Rituximab regularmente. En estos pacientes, la insensibilidad al Rituximab pero la sensibilidad al Ofatumumab sería un enfoque útil ya que el Ofatumumab se usa con poca frecuencia pero parece ser igual o más efectivo que el Rituximab.

Para producir una variante de CD20, se introdujeron una serie de mutaciones en CD20 en el residuo A170 y P172, que se predice que desplazarán la unión de Rituximab pero no afectarán la unión de Ofatumumab. A partir de estas mutaciones, se descubrió que el CD20 mutado con P172W se une a Ofatumumab, pero no a Rituximab. Esto se confirma por los resultados mostrados en la Figura 8, donde CD20 de tipo salvaje y CD20-P172W se coexpresaron con eGFP y se transfectaron en células 293T. Estas células se tiñeron posteriormente con Rituximab u Ofatumumab. Mientras que el CD20 de tipo salvaje se une a ambos, el CD20-P172W solo se une a Ofatumumab.

Ejemplo 6 – Estudio de ADCC

Dado que ADCC ocurre dentro del marco de tiempo de la muerte directa, se generó un mutante de dCD20-FAS donde el endodominio FAS se inactivó utilizando una mutación puntual (E272K) (Wang et al., (2010), Nature Structural and Molecular Biology, 17, 11, 1324-1330). Las células T se transducen con este constructo. Los efectores de células asesinas naturales (NK) se generan utilizando una línea celular estimuladora K562, que expresa la interleuquina-15 y 41BBL unida a la membrana establecida por transducción de vectores retrovirales y clonación unicelular (K562.41BBL.mIL150). Células mononucleares de sangre periférica recién aisladas de donantes sanos se cultivan conjuntamente 1:1 en placas de múltiples pocillos tratadas con cultivo de tejidos de 24 pocillos con K562.41BBL.mIL15 irradiado, se irradian a 120 Gy y se suplementan con 40 iu de IL2. Se realizan cambios parciales de medios según sea necesario. Después de 7 días en cultivo, se aísla una población pura (-95% de pureza) de células NK después de una sola ronda de selección positiva para Miltenyi CD56 y se marca con violeta CellTRACE (invitrogen). Células T transducidas con CD20, RQR8 o dCD20-FAS<sub>E272K</sub> de longitud completa se utilizan como objetivos y se cultivan juntamente con efectores de células NK en relaciones de objetivo de efecto de 16:1, 8:1, 4:1 y 2:1 durante 48 horas. La eliminación celular se evalúa mediante citometría de flujo después de la tinción con anexina V (BD Biosciences) y yoduro de propidio (PI) (SigmaAldrich).

Ejemplo 7 - Estudio de la función de dCD20-FAS y dCD20<sub>P172W</sub>-FAS en células T humanas primarias

La capacidad de los constructos dCD20-FAS y dCD20<sub>P172W</sub>-FAS para activar directamente la apoptosis tras la exposición a Rituximab y Ofatumumab se investigó en células T humanas primarias. Dado que la activación de FAS tarda un tiempo en desarrollarse y CDC es casi instantánea, al probar la apoptosis inmediata en presencia de complemento, fue posible determinar si estos constructos también permiten la muerte mediada por CDC. Como se muestra en la Figura 9, las células T dCD20-FAS fueron efectivamente destruidas directamente por los CDC por Rituximab y Ofatumumab. Las células T primarias dCD20<sub>P172W</sub>-FAS, por otro lado, fueron efectivamente destruidas en forma directa o destruidas por CDC solo con Ofatumumab y no con Rituximab. En la Figura 10, se muestra un ejemplo de muerte directa con dCD20-FAS en células T primarias por Ofatumumab.

Por lo tanto, los presentes inventores han generado un gen suicida de triple función que se activa mediante anticuerpos monoclonales terapéuticos.

Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se

pretenden diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en biología molecular o campos relacionados, en la medida en que entren dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

- 5 Listado de secuencias
- <110> UCL Business PLC
- <120> PROTEÍNA QUIMÉRICA
- 10 <130> P106932PCT
- <150> GB 1506223.5
- 15 <151 >2015-04-13
- <160> 29
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
- <211> 406
- 25 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial <220>
- <223> proteína quimérica
- 30 <400> 1

ES 2 749 903 T3

Met Gly Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val  
 1 5 10 15

Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met  
 20 25 30

Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro  
 35 40 45

Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala  
 50 55 60

Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu Val Lys Gly Lys Met Ile Met  
 65 70 75 80

Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile  
 85 90 95

Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser  
 100 105 110

Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys  
 115 120 125

Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys  
 130 135 140

Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ser Val Met Leu Ile  
 145 150 155 160



ES 2 749 903 T3

Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu  
 165 170 175

Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser  
 180 185 190

Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile Glu Ile Lys Glu Glu Val Val  
 195 200 205

Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu  
 210 215 220

Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe  
 225 230 235 240

Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser  
 245 250 255

Ser Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys  
 260 265 270

His Arg Lys Glu Asn Gln Gly Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro  
 275 280 285

Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile  
 290 295 300

Thr Thr Ile Ala Gly Val Met Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe Val  
 305 310 315 320

Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp  
 325 330 335

Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp  
 340 345 350

His Gln Leu His Gly Lys Lys Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp  
 355 360 365

Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile  
 370 375 380

Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn  
 385 390 395 400

Glu Ile Gln Ser Leu Val

<211> 406

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> proteína quimérica

<400> 2

ES 2 749 903 T3

Met Gly Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val  
 1 5 10 15

Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met  
 20 25 30

Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro  
 35 40 45

Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala  
 50 55 60

Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu Val Lys Gly Lys Met Ile Met  
 65 70 75 80

Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile  
 85 90 95

Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser  
 100 105 110

Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys  
 115 120 125

Glu Pro Ala Asn Trp Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys  
 130 135 140

Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ser Val Met Leu Ile  
 145 150 155 160

Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu  
 165 170 175

Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser  
 180 185 190

Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile Glu Ile Lys Glu Glu Val Val  
 195 200 205

ES 2 749 903 T3

Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu  
 210 215 220

Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe  
 225 230 235 240

Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser  
 245 250 255

Ser Pro Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys  
 260 265 270

His Arg Lys Glu Asn Gln Gly Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro  
 275 280 285

Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile  
 290 295 300

Thr Thr Ile Ala Gly Val Met Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe Val  
 305 310 315 320

Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp  
 325 330 335

Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp  
 340 345 350

His Gln Leu His Gly Lys Lys Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp  
 355 360 365

Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile  
 370 375 380

Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn  
 385 390 395 400

Glu Ile Gln Ser Leu Val  
 405

<210> 3

5 <211> 297

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 3

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro  
 1 5 10 15

ES 2 749 903 T3

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg  
 20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu  
 35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile  
 50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile  
 65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile  
 85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu  
 100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile  
 115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser  
 130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro  
 145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn  
 165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly  
 180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile  
 195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys  
 210 215 220

Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile  
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro  
 245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu

# ES 2 749 903 T3

260

265

270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser  
275 280 285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro  
290 295

<210> 4

5 <211> 256

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CD20 truncado (dCD20)

15

<400> 4

ES 2 749 903 T3

Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile  
 1 5 10 15

Met Asn Gly Leu Phe His Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro  
 20 25 30

Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp  
 35 40 45

Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu  
 50 55 60

Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser  
 65 70 75 80

Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp  
 85 90 95

Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn  
 100 105 110

Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro  
 115 120 125

Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser  
 130 135 140

Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala  
 145 150 155 160

Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys  
 165 170 175

Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu  
 180 185 190

Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu  
 195 200 205

Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile  
 210 215 220

Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu  
 225 230 235 240

Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro  
 245 250 255

<210> 5

5 <211> 237

ES 2 749 903 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> CD20 truncado (CD20d)

<400> 5

10

```

Met Gly Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu
 1           5           10           15

Pro Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe
 20           25           30

Arg Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg
 35           40           45

Glu Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His
 50           55           60

Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro
 65           70           75

Ile Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile
 85           90           95

Ile Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys
 100          105          110

Leu Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala
 115          120          125

```



ES 2 749 903 T3

Ile Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile  
 130 135 140

Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr  
 145 150 155 160

Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys  
 165 170 175

Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu  
 180 185 190

Gly Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val  
 195 200 205

Ile Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro  
 210 215 220

Lys Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys  
 225 230 235

<210> 6

5 <211> 256

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> proteína quimérica (dCD20 P172W)

15 <400> 6

ES 2 749 903 T3

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

ES 2 749 903 T3

Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn  
 100 105 110

Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro  
 115 120 125

Ala Asn Trp Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser  
 130 135 140

Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala  
 145 150 155 160

Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys  
 165 170 175

Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu  
 180 185 190

Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu  
 195 200 205

Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile  
 210 215 220

Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu  
 225 230 235 240

Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro  
 245 250 255

<210> 7

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de epítopos que se unen a Rituximab de CD20

15

<400> 7

**Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr Gln Tyr**  
**1 5 10 15**

**Cys**

- <210> 8
- 5 <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R15-C
- 15 <400> 8

**Ala Cys Pro Tyr Ala Asn Pro Ser Leu Cys**  
**1 5 10**

- <210> 9
- 20 <211> 10
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R3-C
- 30 <400> 9

**Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys**  
**1 5 10**

- 35 <210> 10
- <211> 10
- <212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 45 <223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R7-C
- <400> 10

**Ala Cys Pro Phe Ala Asn Pro Ser Thr Cys**  
**1 5 10**

50

<210> 11  
 <211> 10  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R8-, R12-, R18-C  
 <400> 11

**Ala Cys Asn Phe Ser Asn Pro Ser Leu Cys**  
**1 5 10**

<210> 12  
 <211> 10  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R14-C  
 <400> 12

**Ala Cys Pro Phe Ser Asn Pro Ser Met Cys**  
**1 5 10**

<210> 13  
 35 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R16-C  
 45 <400> 13

**Ala Cys Ser Trp Ala Asn Pro Ser Gln Cys**  
**1 5 10**

<210> 14  
 50 <211> 10  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R17-C

5 <400> 14

**Ala Cys Met Phe Ser Asn Pro Ser Leu Cys**  
**1 5 10**

<210> 15

10

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R19-C

20

<400> 15

**Ala Cys Pro Phe Ala Asn Pro Ser Met Cys**  
**1 5 10**

25 <210> 16

<211> 10

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R2-C

<400> 16

**Ala Cys Trp Ala Ser Asn Pro Ser Leu Cys**  
**1 5 10**

40

<210> 17

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R10-C

<400> 17

Ala Cys Glu His Ser Asn Pro Ser Leu Cys  
 1 5 10

<210> 18

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> péptido cíclico 7-mero limitado por cisteína R13-C

15 <400> 18

Ala Cys Trp Ala Ala Asn Pro Ser Met Cys  
 1 5 10

<210> 19

20 <211> 12

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mimétopo de Rituximab

30 <400> 19

Gln Asp Lys Leu Thr Gln Trp Pro Lys Trp Leu Glu  
 1 5 10

35 <210> 20

<211> 142

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> dominio citoplasmático de FAS

<400> 20

ES 2 749 903 T3

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

<210> 21

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de cadena variable de cadena pesada de Rituximab

15 <400> 21



ES 2 749 903 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly  
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
 115 120

<210> 22

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> secuencia de cadena variable de cadena liviana de Rituximab

15 <400> 22

ES 2 749 903 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 23

5 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> secuencia de cadena variable de cadena pesada de Ofatumumab

15 <400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

ES 2 749 903 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 24

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de cadena variable de cadena liviana de Ofatumumab

15 <400> 24

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 25

20

<211> 1221

<212> ADN

ES 2 749 903 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de proteínas quiméricas dCD20-FAS

<400> 25

```

atgggccaga gcttcttcat ggggagagc aagaccctgg gagccgtgca gatcatgaac      60
ggcctgttcc acatcgccct gggagcgctg ctgatgatcc ctgccggcat ctacgccccca      120
atctgcgatga ccgtgtggta cccactgtgg ggaggcatca tgtacatcat cagcggcagc      180
ctgctggccg ccaccgagaa gaacagccgg aagtgcctgg tgaagggcaa gatgatcatg      240
aacagcctga gcctgttcgc cgccatcagc ggcgatgatcc tgagcatcat ggacatcctg      300
aacatcaaga tcagccactt cctgaagatg gagagcctga acttcatccg ggccccacacc      360
ccatacatca acatctacaa ctgcgagcct gccaacccca gcgagaagaa cagccccagc      420
accagtact gctacagcat ccagagcctg ttctgggca tcttgagcgt gatgctgatc      480
ttcgccttct tccaggagct ggtgatcgcc ggcacgtgg agaacgagtg gaagcggacc      540
tgcagccggc ccaagagcaa catcgtgctg ctgagcgccg aagagaagaa agagcagacc      600
atcgagatca aggaggaagt ggtgggcctg accgagacca gcagccagcc caagaacgag      660
gaggacatcg agatcatccc catccaggaa gaagaggaag aggagaccga gaccaacttc      720
cccgagccac cccaggacca ggagagcagc cctatcgaga acgacagcag ccccagcggc      780
ggcgggtggca gcgaggtaca gaaaacatgc agaaagcaca gaaaggaaaa ccaaggttct      840
catgaatctc caaccttaaa tctgaaaca gtggcaataa atttatctga tgttgacttg      900
agtaaataata tcaccactat tgctggagtc atgacactaa gtcaagttaa aggccttgtt      960
cgaaagaatg gtgtcaatga agccaaaata gatgagatca agaattgaca tgtccaagac     1020
acagcagaac agaaagtcca actgcttcgt aattggcctc aacttcatgg aaagaaagaa     1080
gcgatgaca cattgattaa agatctcaaa aaagccaatc tttgtactct tgcagagaaa     1140
attcagacta tcatoctcaa ggacattact agtgactcag aaaattcaaa cttcagaaat     1200
gaaatccaaa gcttggctctg a                                     1221

```

10

<210> 26

<211> 1221

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de proteínas quiméricas (dCD20P172W-FAS)

<400> 26

ES 2 749 903 T3

```

atggggcaga gcttcttcat gcgggagagc aagaccctgg gagccgtgca gatcatgaac      60
ggcctgttcc acatgcacct gggaggcctg ctgatgatcc ctgccggcat ctacgccccca      120
atctgcgtga ccgtgtggta cccactgtgg ggaggcatca tgtacatcat cagcggcagc      180
ctgctggccg ccaccgagaa gaacagccgg aagtgcctgg tgaagggcaa gatgatcatg      240
aacagcctga gcctgttcgc cgccatcagc ggcatgatcc tgagcatcat ggacatcctg      300

aacatcaaga tcagccactt cctgaagatg gagagcctga acttcatccg ggccccacacc      360
ccatacatca acatctacaa ctgcgagcct gccaaactgga gcgagaagaa cagccccagc      420
accagtaact gctacagcat ccagagcctg ttctctgggca tcttgagcgt gatgctgac      480
ttcgcttctc tccaggagct ggtgatcgcc ggcatcgtgg agaacgagtg gaagcggacc      540
tgcagccggc ccaagagcaa catcgtgctg ctgagcggcg aagagaagaa agagcagacc      600
atcgagatca aggaggaagt ggtgggcctg accgagacca gcagccagcc caagaacgag      660
gaggacatcg agatcatccc catccaggaa gaagaggaag aggagaccga gaccaacttc      720
cccagccac  cccaggacca ggagagcagc cctatcgaga acgacagcag ccccagcgg      780
ggcgggtggc gcgaggtaca gaaaacatgc agaaagcaca gaaaggaaaa ccaaggttct      840
catgaaatct caaccttaaa tcttgaaaca gtggcaataa atttatctga tgttgacttg      900
agtaaatata tcaccactat tgctggagtc atgacactaa gtcaagttaa aggccttgg      960
cgaagaatg  gtgtcaatga agccaaaata gatgagatca agaatgacaa tgtccaagac     1020
acagcagaac agaaagttca actgcttcgt aattggcatc aacttcatgg aaagaaagaa     1080
gcgtatgaca cattgattaa agatctcaaa aaagccaatc tttgtactct tgcagagaaa     1140
attcagacta tcatcctcaa ggacattact agtgactcag aaaattcaaa cttcagaat      1200
gaaatccaaa gcttggtctg a                                     1221

```

<210> 27

5 <211> 20

<212> PRT

10 <213> virus de la fiebre aftosa

<400> 27

```

Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu
1           5           10           15

```

```

Asn Pro Gly Pro
                20

```

15 <210> 28

<211> 20

<212> PRT

20 <213> virus de la fiebre aftosa

ES 2 749 903 T3

<400> 28

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser  
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro  
20

5 <210> 29

<211> 85

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> "dominio de muerte" de FAS

<400> 29

Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met Thr Leu Ser Gln Val  
1 5 10 15

Lys Gly Phe Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu Ala Lys Ile Asp Glu  
20 25 30

Ile Lys Asn Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu Gln Lys Val Gln Leu  
35 40 45

Leu Arg Asn Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys Glu Ala Tyr Asp Thr  
50 55 60

Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys Thr Leu Ala Glu Lys  
65 70 75 80

Ile Gln Thr Ile Ile  
85

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína quimérica que comprende una proteína transmembrana de múltiples segmentos fusionada con un endodominio FAS, en donde la proteína transmembrana de múltiples segmentos se une a un ligando extracelular, lo que lleva a la activación del endodominio FAS y en donde la proteína transmembrana de múltiples segmentos comprende CD20 o una versión truncada del mismo que carece de un endodominio amino-terminal o un endodominio carboxi-terminal.
- 10 2. Una proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un endodominio FAS fusionado al término carboxi de una versión truncada de CD20, que carece del endodominio amino-terminal.
3. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 15 4. Un constructo de ácido nucleico que comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 3 y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR).
- 20 5. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 3 o un constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una célula que expresa una proteína quimérica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 25 7. Un método para producir una célula de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende la etapa de transducir o transfectar una célula ex vivo con un vector de acuerdo con la reivindicación 5.
8. Una célula de acuerdo con la reivindicación 6 para usar en un método para tratar una enfermedad en un sujeto.
- 30 9. Un ligando extracelular para usar en un método para prevenir y/o tratar una reacción inmune patológica en un sujeto causada por la administración de una célula de acuerdo con la reivindicación 6 al sujeto, en donde el ligando extracelular es capaz de unirse a CD20.
- 35 10. Un ligando extracelular para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la reacción inmune patológica se selecciona del siguiente grupo: enfermedad de injerto versus huésped; toxicidad en el objetivo, fuera del tumor; síndrome de activación inmune; y trastornos linfoproliferativos.
- 40 11. Un ligando extracelular para uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde el ligando extracelular es Rituxumab, Ofatumumab o Veltuzumab.
- 45 12. Una célula para usar en un método para tratar una enfermedad en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el método comprende las siguientes etapas:
- (i) administrar una célula de acuerdo con la reivindicación 6 al sujeto;
- (ii) controlar al sujeto para el desarrollo de una reacción inmune patológica; y
- 50 (iii) administrar al sujeto un ligando extracelular, capaz de unirse al CD20, si el sujeto muestra signos de desarrollo o de haber desarrollado una reacción inmune patológica.
13. Una célula de acuerdo con la reivindicación 6 para uso en trasplante de células madre hematopoyéticas, infusión de linfocitos o transferencia de células adoptivas.

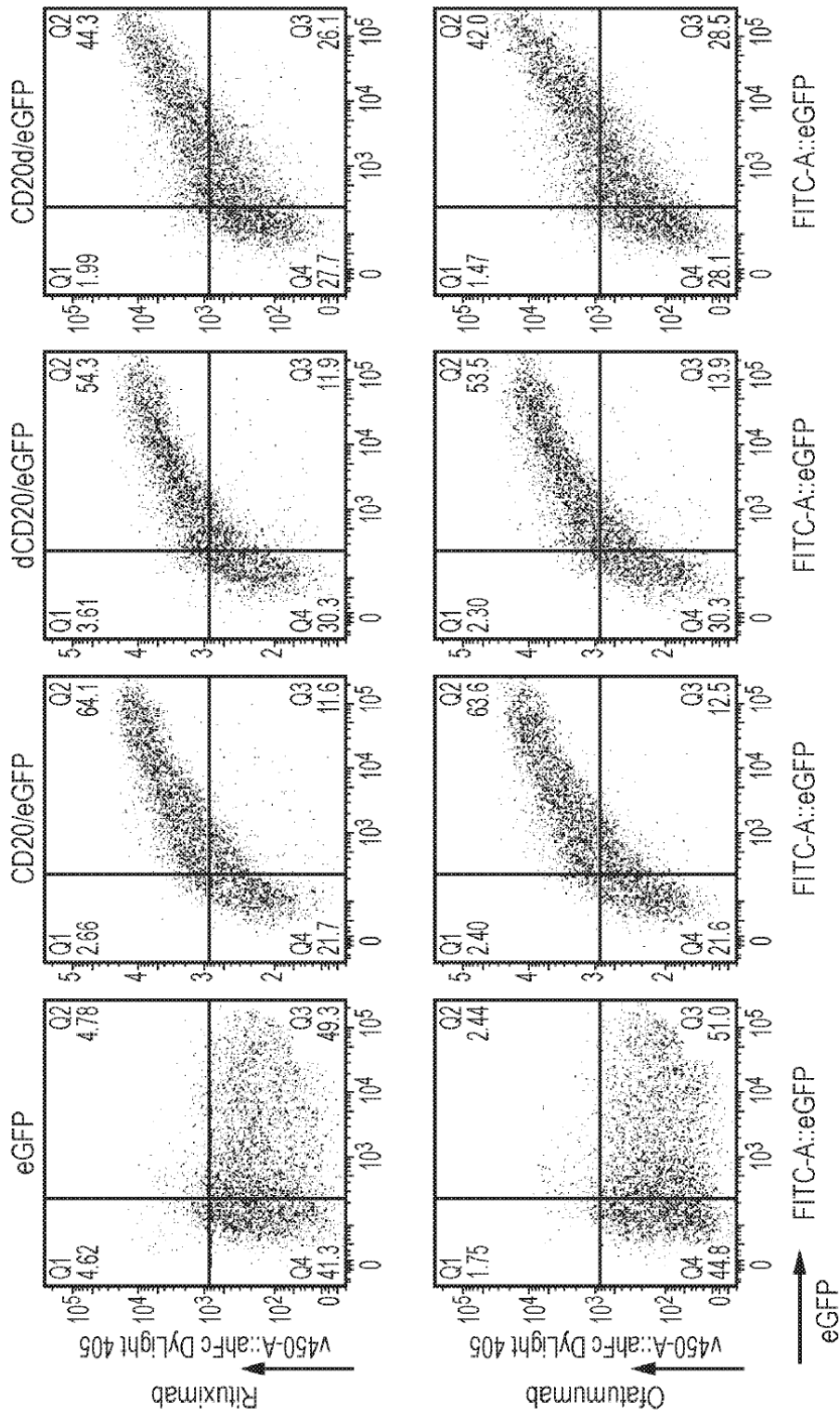


FIG. 1



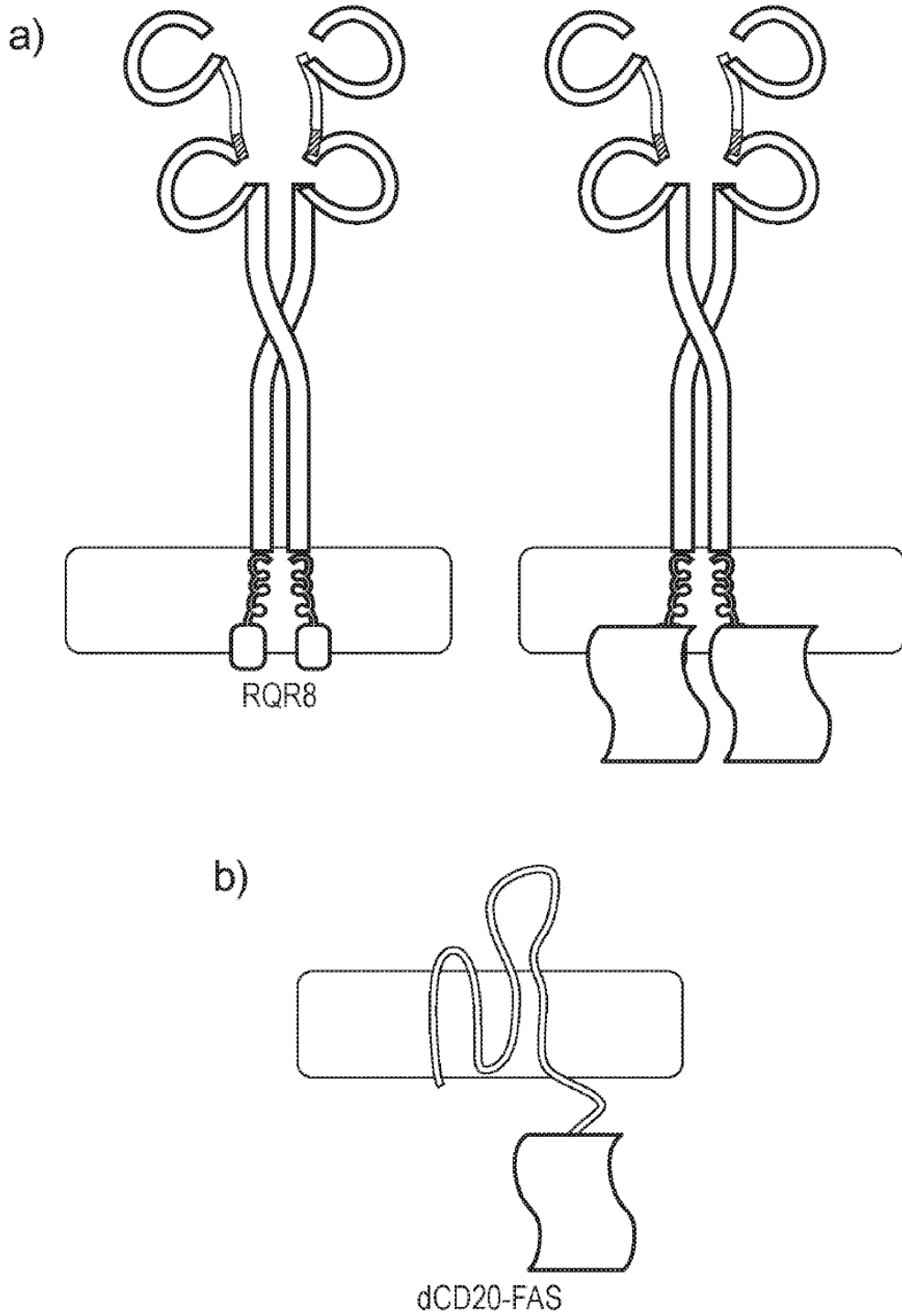


FIG. 2

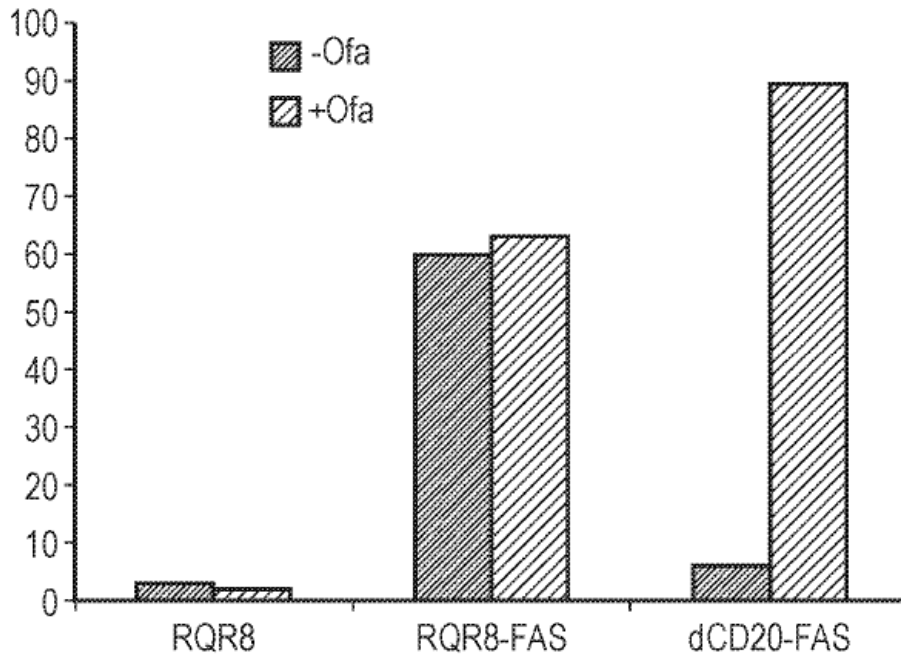


FIG. 3

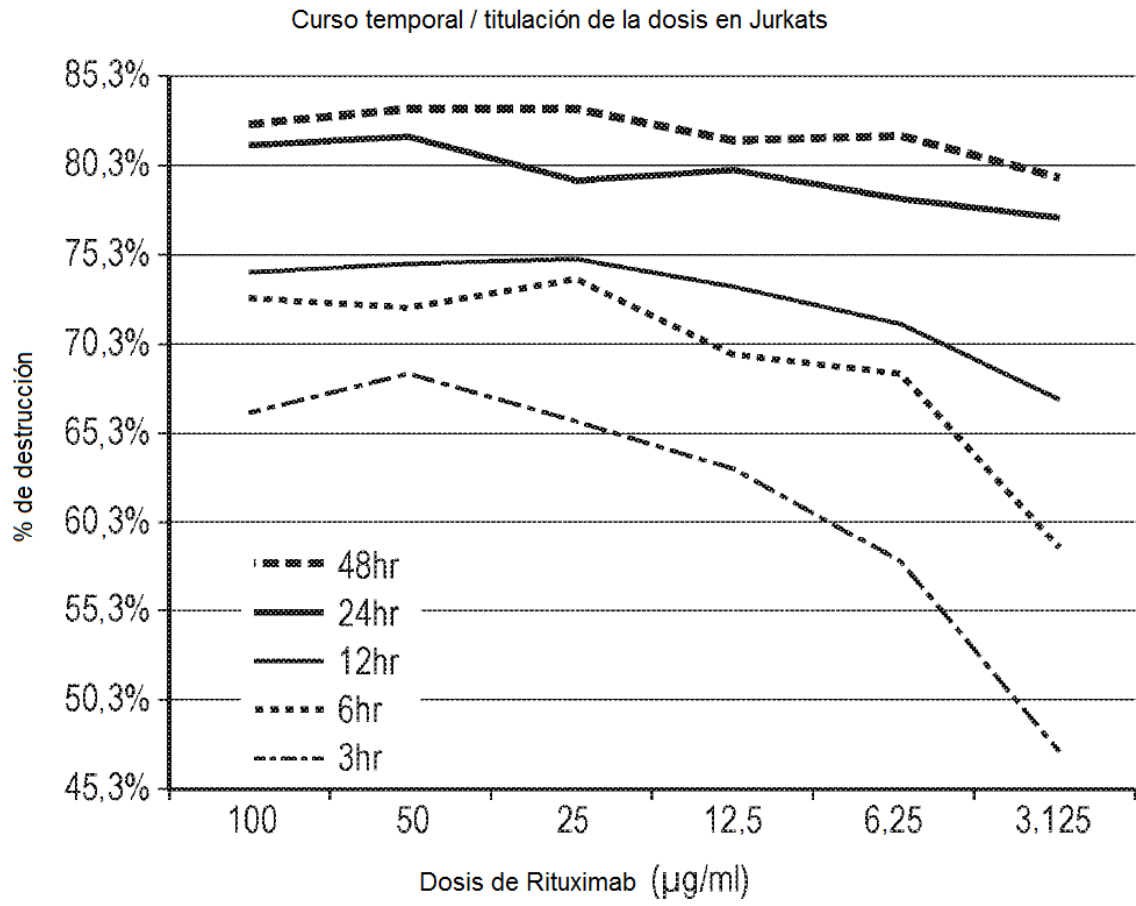
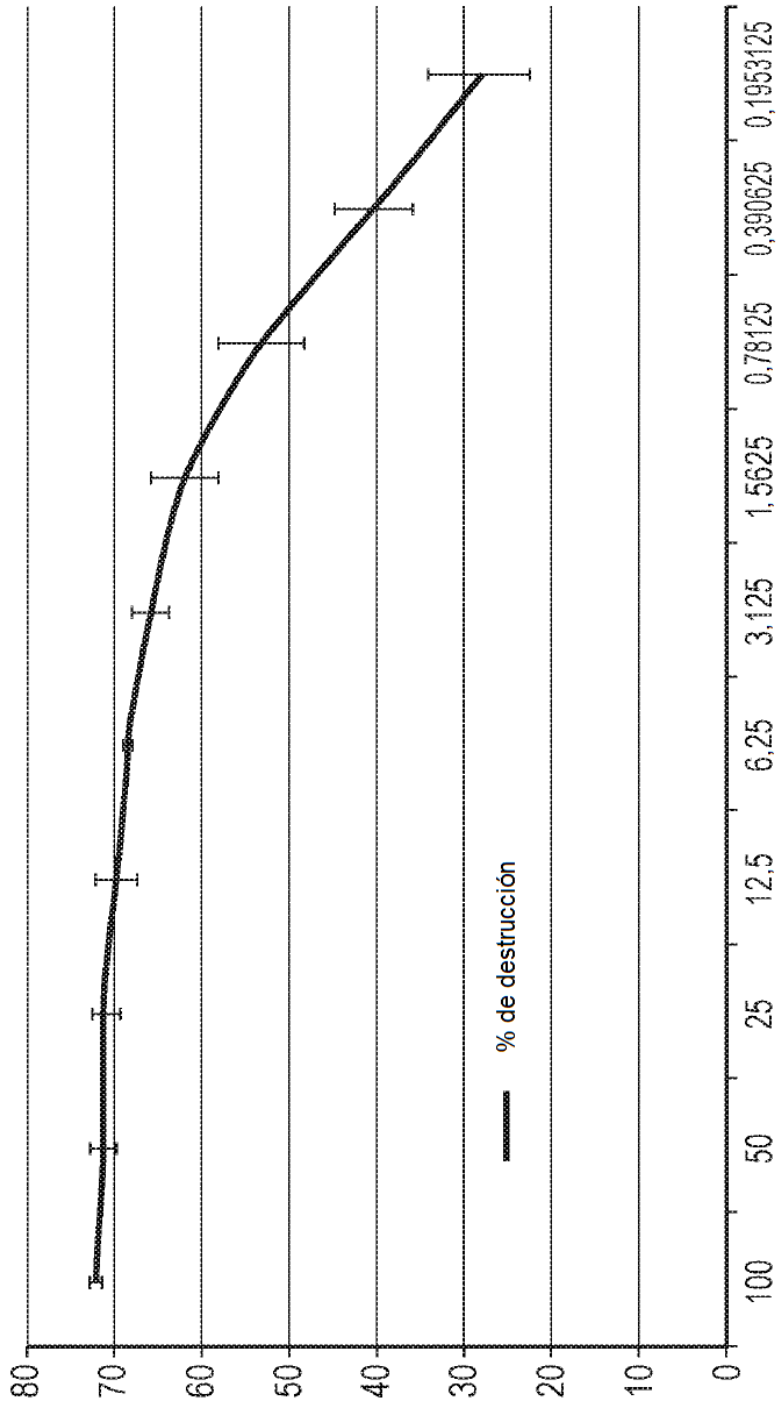


FIG. 4



Concentración de Rituximab (ug/ml)

FIG. 5

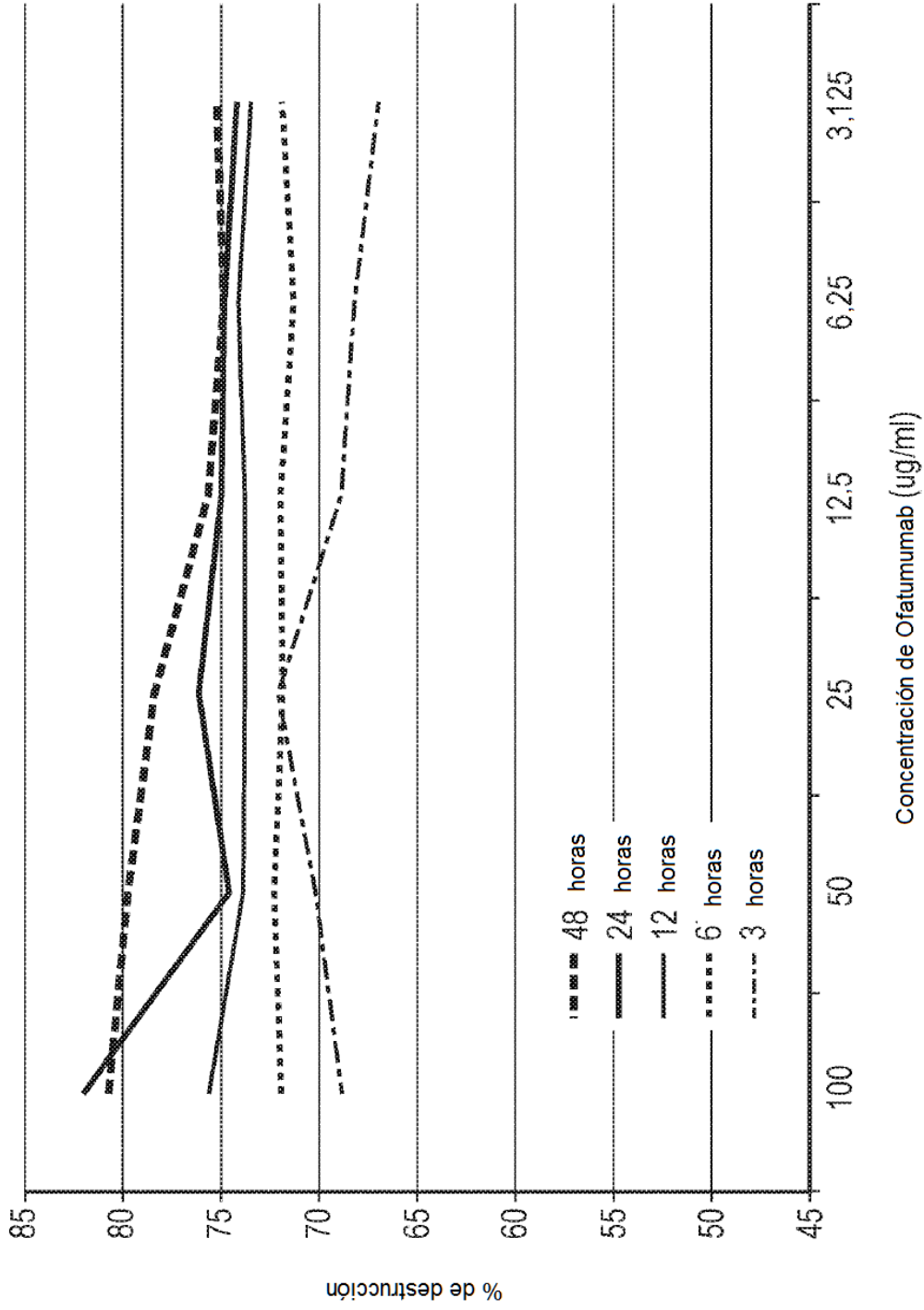


FIG. 6

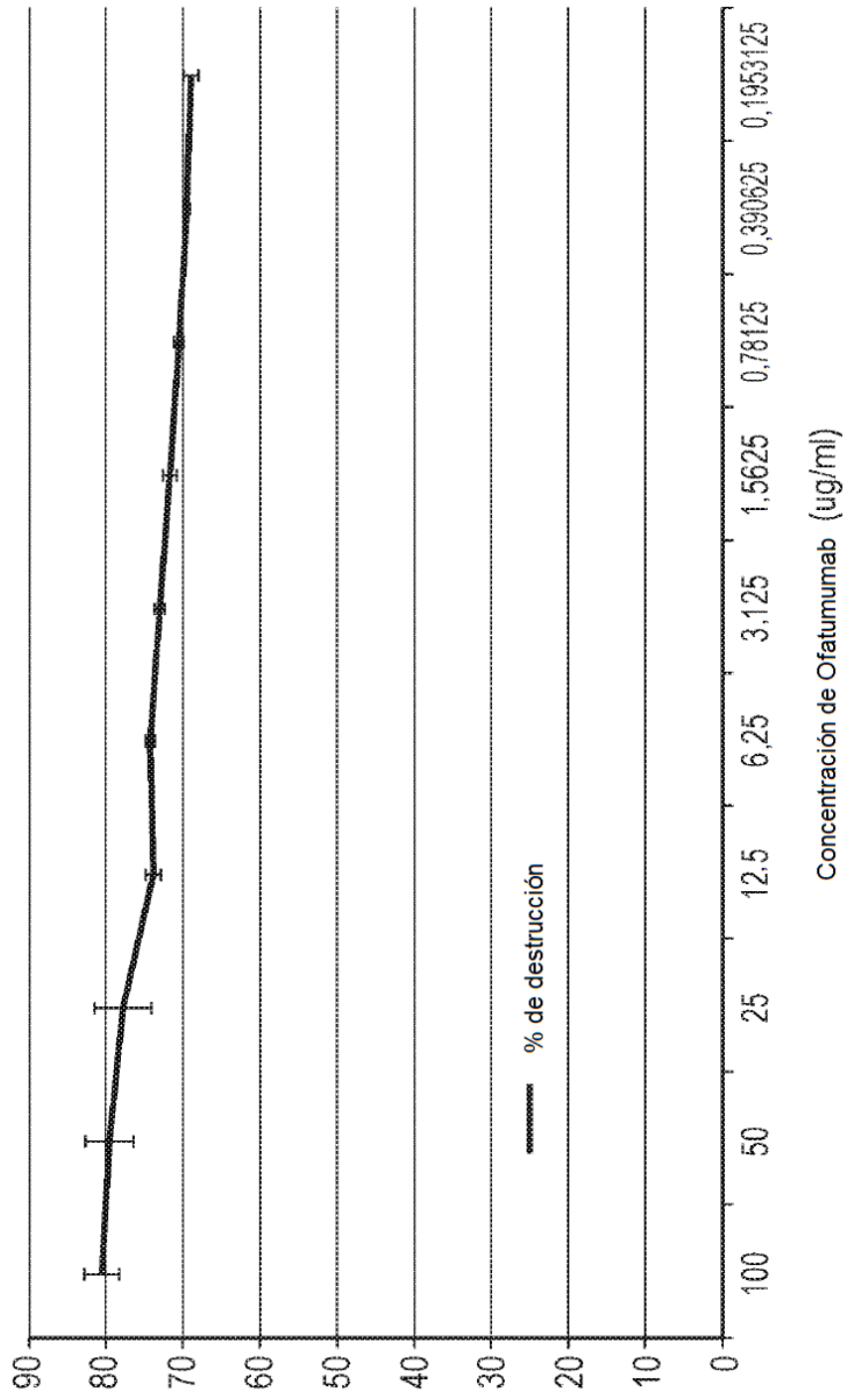


FIG. 7

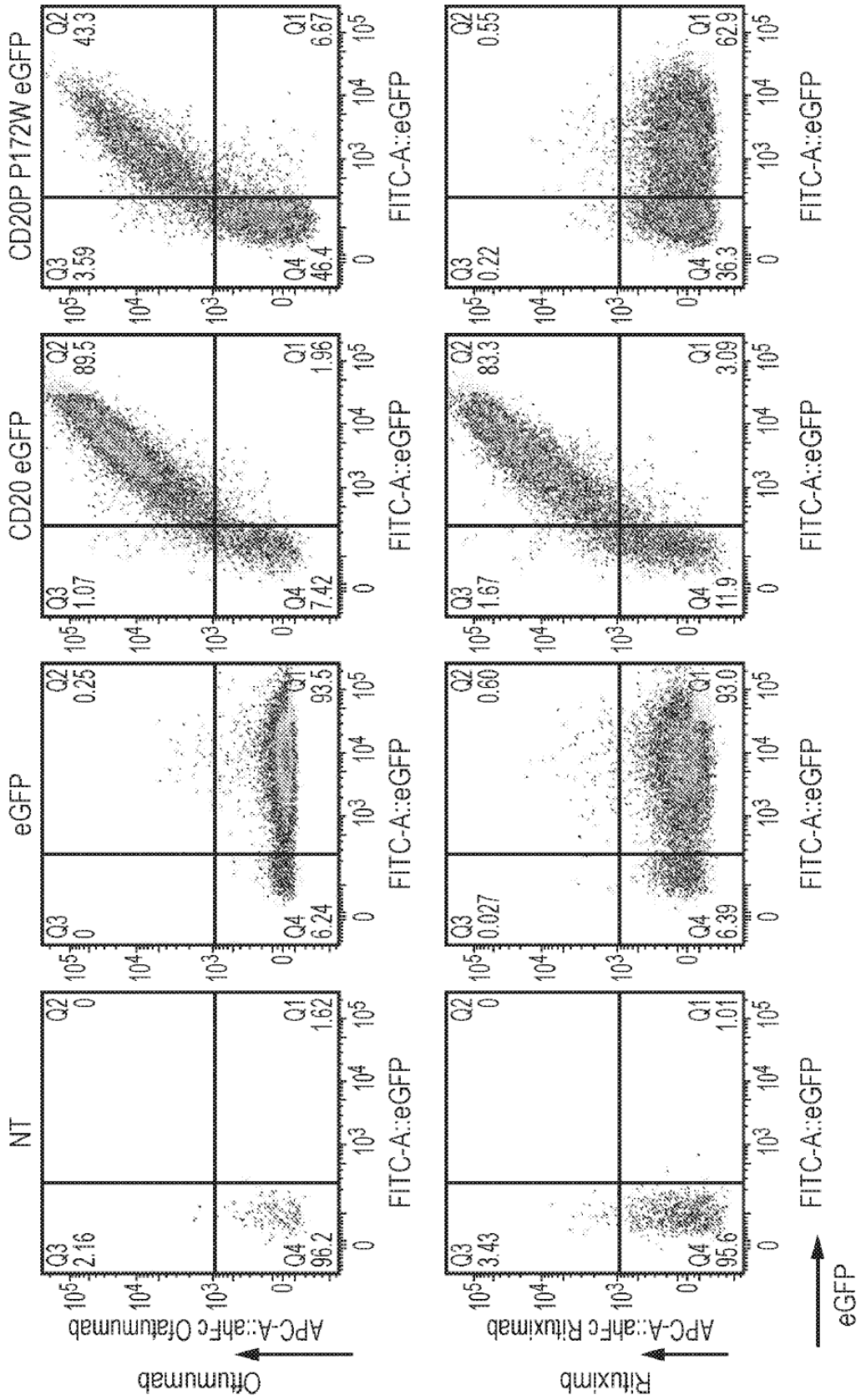


FIG. 8

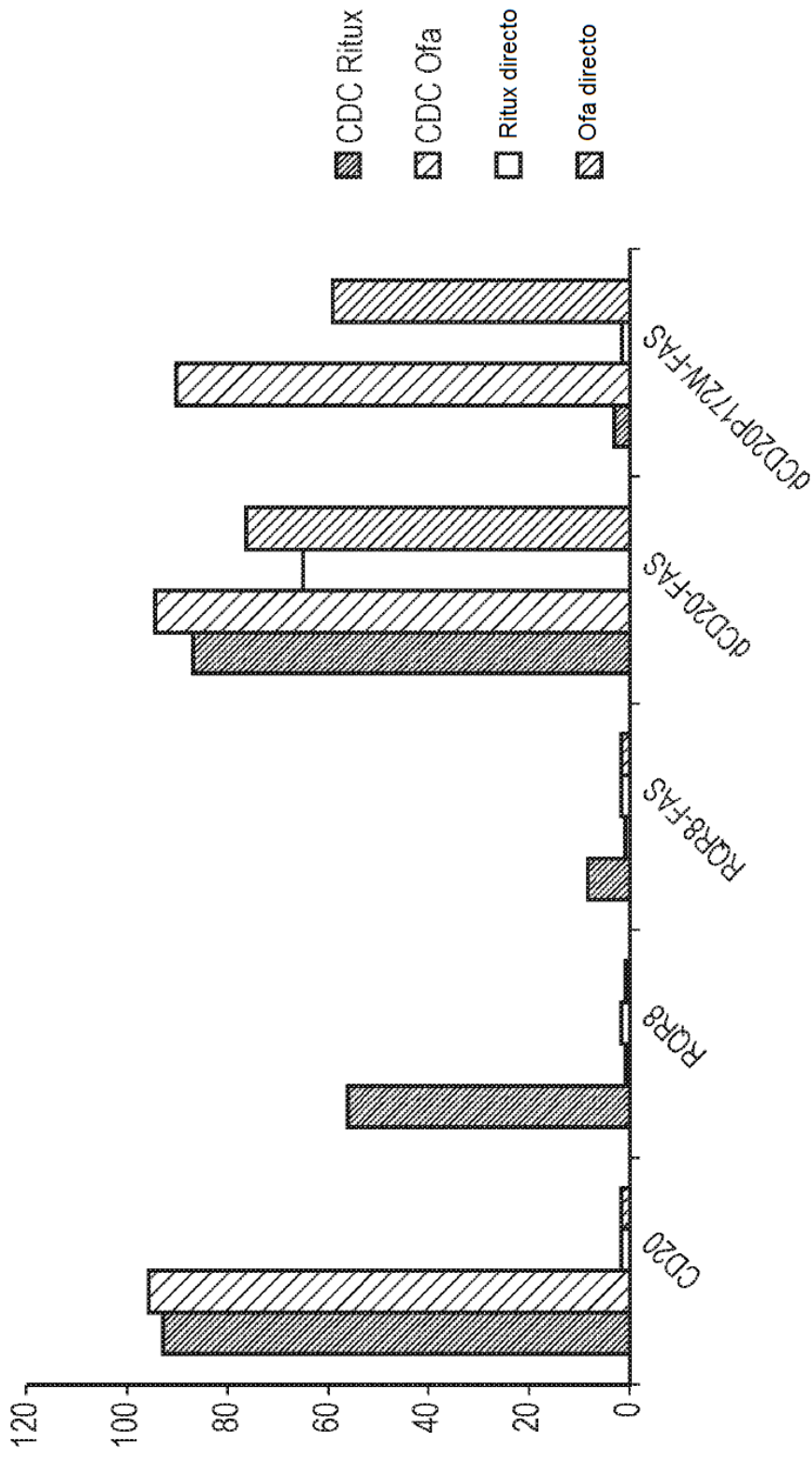


FIG. 9



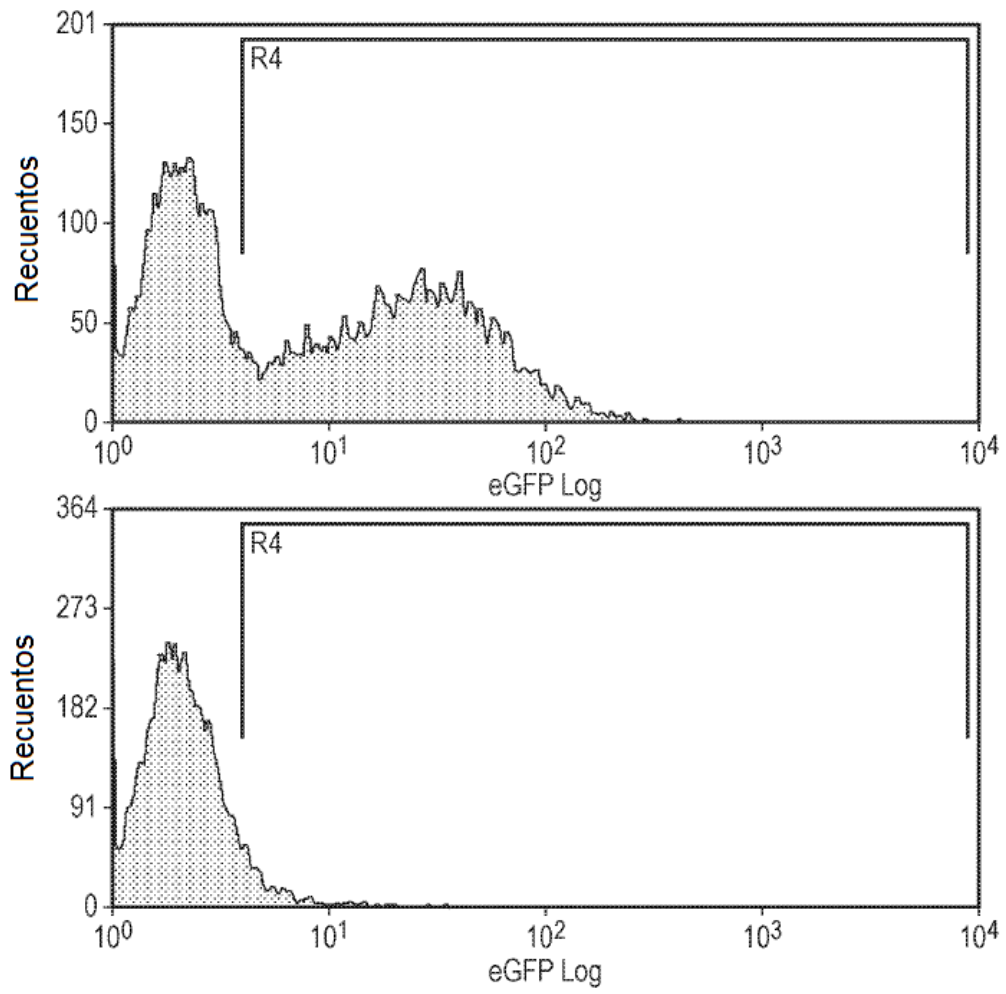


FIG. 10