

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 945**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)
A61K 35/26 (2015.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2015** **PCT/JP2015/005080**
87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016** **WO16056228**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2015** **E 15849416 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 3205720**

54 Título: **Vector de expresión de un RAQ y células T que expresan un RAQ**

30 Prioridad:

09.10.2014 JP 2014208200

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

02.04.2020

73 Titular/es:

YAMAGUCHI UNIVERSITY (100.0%)
1677-1, Yoshida Yamaguchi-shi
Yamaguchi 753-8511, JP

72 Inventor/es:

TAMADA, KOJI;
SAKODA, YUKIMI y
ADACHI, KEISHI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 751 945 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

Vector de expresión de un RAQ y células T que expresan un RAQ.

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona a un vector de expresión de un RAQ, una célula T que expresa un RAQ introducido con el vector de expresión de un RAQ y un agente anticancerígeno que comprende a la célula T que expresa un RAQ.

10 Antecedentes de la técnica

Un receptor de antígeno quimérico (en lo sucesivo, también denominado "RAQ") es una proteína quimérica artificial en la cual un anticuerpo de cadena sencilla que reconoce a un antígeno de superficie celular en una célula cancerígena se fusiona con una región de transducción de señal que induce la activación de una célula T. Como se muestra en la Figura 1, la transferencia de un gen que codifica para un RAQ a una célula T de sangre periférica normal no tumoral (linfocitos T de sangre periférica) permite la preparación a gran escala de una célula T que expresa un RAQ (en lo sucesivo, también simplemente referida como "célula T-RAQ") que son capaces de expresar a un RAQ. La célula T-RAQ es reactiva a tumores y puede causar daño a una célula cancerígena sin depender de la interacción con un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

La inmunoterapia contra el cáncer mediante la administración de las células T-RAQ, más específicamente, la terapia que consiste en recolectar células T de un paciente, transferir un gen que codifica para un RAQ a las células T y transferir a las células T nuevamente al paciente (véase el documento 1 no patentado) se encuentra actualmente en ensayos clínicos en todo el mundo y que ha arrojado resultados que indican la eficacia para, por ejemplo, el tumor maligno en el órgano hematopoyético, como la leucemia o el linfoma.

En los últimos años, se han realizado investigaciones sobre diversas células T-RAQ. Se ha propuesto, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende las células T humanas autólogas modificadas que comprenden un ácido nucleico que codifica para un RAQ que consiste en una región de unión al antígeno CD19, una región transmembranal, una región de señal coestimuladora 4-1BB y una región de señal CD3ζ (véase el documento de patente 1), una o más poblaciones de las células T que expresan a el receptor de antígeno quimérico anti-etiqueta (AE-RAQ) terapéuticamente eficaces que se administran a un sujeto simultáneamente o por separado de una formulación de una o más proteínas marcadas que se unen a las células cancerígenas, en el que las poblaciones de las células T que expresan AE-RAQ se unen a las proteínas marcadas e inducen la muerte de las células cancerígenas (véase el documento de patente 2), las células que comprenden un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico que comprende un dominio de unión al antígeno del anticuerpo humano 139, un dominio de bisagra extracelular, un dominio transmembranal y un dominio de transducción de señal de las células T intracelulares (véase el documento de patente 3), células que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico, en el que el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de transducción de señal CD3ζ que comprende un dominio de unión al antígeno, un dominio transmembranal, una región de transducción de señal coestimuladora y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (véase el documento de patente 4), células T específicas de CD19 genéticamente modificadas que expresan y retienen a un receptor quimérico específico de CD19 en las membranas de su superficie celular, en el que el receptor quimérico consiste en un dominio de señalización intracelular para funciones efectoras de inmunocitos, al menos un dominio transmembranal y al menos uno dominio extracelular, y el dominio extracelular comprende un receptor específico de CD19 (véase el documento de patente 5), y células que expresan a el receptor de antígeno quimérico que albergan un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico que comprende, como dominio intracelular, un dominio intracelular de receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (RTIG) (véase el documento de patente 6).

Sin embargo, ninguna de las técnicas anteriores ha resuelto el problema de la baja eficiencia de supervivencia de las células T-RAQ *in vivo* o la activación insuficiente de las células T endógenas inducidas por las células T-RAQ o la acumulación local insuficiente de las mismas al tumor, o los problemas de señales inmunosupresoras mediadas por la vía PD-L1/PD-1, que es el mecanismo de escape inmunitario del tumor de las células cancerígenas, y la inhibición de la actividad de las células T-RAQ por factores inmunosupresores como TGF-β o IL-10 secretados en un microambiente cancerígeno. Por lo tanto, existen tipos de cáncer o casos en los que no se confirma un efecto terapéutico suficiente. Por lo tanto, se ha deseado preparar células T-RAQ más eficaces y un vector de expresión para la preparación de las células T-RAQ.

Documentos previos de la técnica

Documentos de patente

Documento de Patente 1: Publicación de Solicitud de Patente de E.U. No. 2014/0106449

Documento de patente 2: Publicación de solicitud de patente japonesa no examinada (Traducción de la solicitud PCT) No. 2014-504294

Documento de patente 3: Publicación de solicitud de patente japonesa no examinada (Traducción de la solicitud PCT)
No. 2014-516510

5 Documento de patente 4: Publicación de solicitud de patente japonesa no examinada (traducción de la solicitud PCT)
No. 2014-507118

Documento de patente 5: Publicación de solicitud de patente japonesa no examinada No. 2011-004749

10 Documento de patente 6: Publicación internacional No. WO 2013/051718

Documentos no patentados

15 Documento 1 no patentado: Yozo Nakazawa, The Shinshu Medical Journal, 61 (4): 197-203 (2013)

Sumario de la invención

Objeto para ser resuelto por la invención

20 Las células T-RAQ convencionales se han diseñado para mejorar la capacidad de activar a las células T al contener
CD28, 4-1BB, CD3 ζ o similares en la región de transducción de señal de un RAQ. Sin embargo, las células T-RAQ
convencionales no potencian suficientemente el efecto inductor de inmunidad de las células T-RAQ sobre las células
25 T endógenas o la resistencia al mecanismo inmunosupresor de un microambiente tumoral. Dichas células T-RAQ aún
no han logrado un efecto terapéutico sobre el cáncer sólido. En consecuencia, un objeto de la presente invención es
proporcionar células T-RAQ que coexpresen a un RAQ y a un factor potenciador de la función inmune de las células
T y que tengan un efecto inductor de inmunidad alto y actividad antitumoral, además de proporcionar un vector de
expresión de un RAQ para la preparación de las células T-RAQ

Formas para resolver el objeto

30 Los inventores han intentado mejorar a las células T-RAQ con el fin de lograr un mejor efecto inductor de inmunidad
o de actividad antitumoral en la inmunoterapia del cáncer utilizando células T-RAQ. Durante el curso de la misma, los
inventores se han centrado en las citoquinas, las quimiocinas y las proteínas reguladoras de señal, que son factores
que mejoran las funciones inmunes de las células T, y construyeron un vector para la coexpresión de un RAQ y los
35 factores que mejoran las funciones inmunes de las células T. Como resultado de transferir a este vector de expresión
a las células T, los inventores han descubierto que las células T-RAQ que son superiores en efecto inductor de
inmunidad y actividad antitumoral a las células T-RAQ convencionales se pueden preparar, y de esta forma
completaron la presente invención.

40 Específicamente, la presente invención es como se describe a continuación.

(1) El vector de expresión de un RAQ que comprende un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno
quimérico (RAQ) y un ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune de las células T, en
el que el ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune es un ácido nucleico que codifica
45 para la interleucina -7 y un ácido nucleico que codifica para CCL19, un ácido nucleico que codifica para una mutante
negativa dominante de SHP-1, o un ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-2.

(2) El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con (1), en el que el ácido nucleico que codifica para un factor
potenciador de la función inmune es un ácido nucleico que codifica para la interleucina-7 y un ácido nucleico que
50 codifica para CCL19.

(3) El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con (2), en el que el ácido nucleico que codifica para un RAQ y el
ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune de las células T están unidos a través de
una secuencia que codifica para un péptido de auto escisión.

55 (4) El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con (2) o (3), en el que el ácido nucleico que codifica para la
interleucina-7 y el ácido nucleico que codifica para CCL19 están unidos mediante una secuencia que codifica para un
péptido de auto escisión.

60 (5) El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4), en el que el ácido nucleico que
codifica para RAQ contiene un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de un anticuerpo de cadena sencilla
que reconoce a FITC o CD20.

65 (6) El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (5), en el que el ácido nucleico que
codifica para un RAQ contiene un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de una región transmembranal de
CD8.

(7) El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6), en el que el ácido nucleico que codifica para RAQ contiene ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de una región intracelular de CD28, una región intracelular 4-1BB y una región intracelular CD3ζ.

(8) Una célula T que expresa un RAQ con el siguiente vector (a) o (b):

(a) el vector de expresión de un RAQ de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (7);

(b) un vector de expresión de un RAQ que contiene un ácido nucleico que codifica para RAQ y un ácido nucleico que codifica para la interleucina-7, y un vector de expresión de un RAQ que contiene un ácido nucleico que codifica para un RAQ y un ácido nucleico que codifica para CCL19.

(9) Un agente anticancerígeno que comprende a la célula T que expresa un RAQ según (8) y un aditivo farmacéuticamente aceptable.

Efecto de la invención.

El uso del vector de expresión de un RAQ de la presente invención permite la preparación de las células T-RAQ que tienen toda la viabilidad, la capacidad de acumular linfocitos y la actividad citotóxica contra las células tumorales, y las células T-RAQ que tienen resistencia a la inmunosupresión en un microambiente cancerígeno. Se espera que la inmunoterapia para pacientes con cáncer que utilizan a la célula T-RAQ produzca un fuerte efecto terapéutico sobre el cáncer y que pueda servir como inmunoterapia contra el cáncer efectiva incluso para el cáncer intratable o progresivo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama que muestra la estructura de un RAQ y el sistema básico de inmunoterapia contra el cáncer utilizando células T-RAQ.

La Figura 2 es un diagrama que muestra un vector para la expresión de un RAQ, interleucina-7 (IL-7) y CCL19.

La Figura 3 es un diagrama que muestra los resultados-1 de confirmar el nivel de expresión de un RAQ en células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 por citometría de flujo. La gráfica de la izquierda muestra una muestra de un RAQ sin teñir, y el gráfico de la derecha representa una muestra de un RAQ teñida.

La Figura 4 es un diagrama que muestra los resultados-2 de confirmar el nivel de expresión de un RAQ en células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 mediante citometría de flujo.

La Figura 5 es un diagrama que muestra los resultados de confirmar el nivel de expresión de RAQ en células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano mediante citometría de flujo.

La Figura 6 es un diagrama que muestra los resultados-1 de medir las concentraciones de IL-7 y CCL19 en el sobrenadante celular de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 por ELISA.

La Figura 7 es un diagrama que muestra los resultados-2 de medir las concentraciones de IL-7 y CCL19 en el sobrenadante celular de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 por ELISA.

La Figura 8 es un diagrama que muestra los resultados de la medición de las concentraciones de IL-7 y CCL19 en el sobrenadante celular de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano mediante ELISA.

La Figura 9 es un diagrama que muestra el número celular de células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 estimuladas y cultivadas durante 3 días, 5 días o 7 días.

La Figura 10 es un diagrama que muestra la tasa de supervivencia de células T anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 estimuladas y cultivadas durante 3 días, 5 días o 7 días.

La Figura 11 es un diagrama que muestra el número celular de las células T anti-CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano estimuladas y cultivadas durante 5 días.

La Figura 12 es un diagrama que muestra los resultados-1 de una prueba de migración de células T utilizando células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19.

La Figura 13 es un diagrama que muestra los resultados-2 de la prueba de migración de células T utilizando células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19.

La Figura 14 es un diagrama que muestra los resultados de una prueba de migración de células dendríticas utilizando células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19.

5 La Figura 15 es un diagrama que muestra los resultados de una prueba de migración de células T utilizando células T anti-CD20 RAQ-IL-7/CCL19 humanas.

La Figura 16 es un diagrama que muestra los resultados de examinar el potencial proliferativo de células T de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 (día 5 después de la estimulación).

10 La Figura 17 es un diagrama que muestra los resultados de examinar el potencial proliferativo de las células T, de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 (días 3 y 7 después de la estimulación).

La Figura 18 es un diagrama que muestra los resultados de examinar la expresión de CD127 en células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19.

15 La Figura 19 es un diagrama que muestra los resultados de examinar la expresión de CCR7 en células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19.

20 La Figura 20 es un diagrama que muestra los resultados de examinar el cambio en el volumen del tumor cuando se administraron células T CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano a ratones portadores de cáncer.

La Figura 21 es un diagrama que muestra los resultados de examinar la tasa de supervivencia de ratones cuando se administraron células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano a ratones portadores de cáncer.

25 La Figura 22 es un diagrama que muestra los resultados de examinar la tasa de supervivencia en ratones cuando se administraron células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano a ratones después de la inoculación subcutánea de P815-hCD20 y a la posterior administración de ciclofosfamida.

30 La Figura 23 es un diagrama que muestra los resultados de examinar el volumen tumoral en ratón cuando se administraron células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano después de la inoculación subcutánea de P815-hCD20 y a la posterior administración de ciclofosfamida.

35 La Figura 24 es un diagrama que muestra 1/10 de los valores numéricos en la ordenada del gráfico de CPA+7x19 en la Figura 23.

La Figura 25 es un diagrama que muestra los resultados de la observación de los tejidos tumorales por tinción de H&E cuando células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano se administraron a ratones después de la inoculación subcutánea de P815-hCD20.

40 La Figura 26 es un diagrama que muestra los resultados del análisis inmunohistoquímico de tejidos tumorales cuando se administraron células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano a ratones después de la inoculación subcutánea de P815-hCD20.

45 La Figura 27 es un diagrama que muestra los resultados de la cuantificación de la región positiva marcada por la tinción fluorescente en la Figura 26.

50 La Figura 28 es un diagrama que muestra los resultados de examinar el volumen tumoral cuando las células T expresan CD20 RAQ-IL-7 anti-humano, células T que expresan CD20 RAQ-CCL19 anti-humano, o las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano se administraron a ratones después de la inoculación subcutánea de P815-hCD20.

55 La Figura 29(a) es un diagrama que muestra un vector para la expresión de un RAQ y una mutante negativa dominante de SHP1 (fosfatasa-1 que contiene el dominio de la región 2 de homología con Src). La Figura 29(b) es un diagrama que muestra un vector para la expresión de un RAQ y una mutante negativa dominante de SHP2 (fosfatasa-2 que contiene el dominio de la región 2 de homología con Src).

La Figura 30(a) es un diagrama que muestra los resultados de una prueba de actividad citotóxica utilizando células T que expresan CD20 RAQ-SHP1DN anti-humano. La Figura 30(b) es un diagrama que muestra una prueba de actividad citotóxica utilizando células T que expresan CD20 RAQ-SHP2DN anti-humano.

60 La Figura 31 es un diagrama que muestra los resultados de examinar la actividad citotóxica contra las células tumorales mezclando P815-hCD20 en presencia de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 y rituximab unido a FITC.

65 La Figura 32 es un diagrama que muestra los resultados de examinar la actividad citotóxica contra las células tumorales mezclando P815-hCD20 con células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano.

La Figura 33 es un diagrama que muestra los resultados del análisis de CD4, CD8, CD44 y CD62L para los fenotipos superficiales de leucocitos mediante citometría de flujo cuando se administraron células T CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano a ratones después de la inoculación subcutánea de P815-hCD20.

La Figura 34 es un diagrama que muestra los resultados de examinar la proliferación de las células T por citometría de flujo cuando los leucocitos del bazo fueron estimulados por cultivo con P815-hCD20 durante 4 días tratadas con mitomicina C.

Formas para llevar a cabo la invención

El vector de expresión de un RAQ de la presente invención no está particularmente limitado siempre que el vector de expresión de un RAQ comprenda un ácido nucleico que codifique para un receptor de antígeno quimérico (RAQ) y un ácido nucleico que codifique para un factor potenciador de la función inmune de las células T, en el que el un ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune es un ácido nucleico que codifica para interleucina-7 y un ácido nucleico que codifica para CCL19, un ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-1, o un ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-2. El receptor de antígeno quimérico significa una proteína quimérica artificial en la que un anticuerpo de cadena sencilla que reconoce un antígeno de superficie celular en una célula cancerígena se fusiona con una región de transducción de señal que induce la activación de una célula T, a través de una región transmembranal.

En la presente invención, el ácido nucleico que codifica para un RAQ no está particularmente limitado siempre que el ácido nucleico codifique para un polipéptido que constituye un RAQ. El ácido nucleico que codifica para un RAQ comprende ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de un anticuerpo de cadena sencilla que reconocen un antígeno de superficie celular en una célula cancerígena, una región transmembranal y una región de transducción de señal que induce la activación de una célula T.

El anticuerpo de cadena sencilla en un RAQ consiste en una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada (Fvcs) derivada del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo monoclonal. Ejemplos de los mismos pueden incluir a un oligopéptido o a un polipéptido en el que se coloca un péptido conector entre la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada.

El antígeno de la superficie celular en una célula cancerígena que es reconocido por el anticuerpo de cadena sencilla puede ser una molécula biológica expresada específicamente en una célula cancerígena y una célula progenitora de la misma, una molécula biológica que se expresa nuevamente debido a la transformación maligna de una célula, o una molécula biológica cuyo nivel de expresión aumenta en una célula cancerígena en comparación con una célula normal. Los ejemplos de los mismos pueden incluir CD20, EGFR, FITC, CD19, CD22, CD33, PSMA, GD2, variantes de EGFR, ROR1, c-Met, HER2, CEA, mesotelina, GM2, CD7, CD10, CD30, CD34, CD38, CD41, CD44, CD74, CD123, CD133, CD171, MUC16, MUC1, CS1 (CD319), IL-13Ra2, BCMA, Lewis Y, cadena de IgG kappa, receptor de folato alfa, PSCA y EpCAM.

La región de transducción de señal de activación de las células T es una región que es capaz de transducir señales intracelularmente cuando el anticuerpo de cadena sencilla reconoce el antígeno de la superficie celular en una célula cancerígena. La región de transducción de señal de activación de las células T comprende preferiblemente al menos uno o más polipéptidos seleccionados de polipéptidos de CD28, 4-1BB (CD137), RTIG, CD27, OX40, HVEM, CD3ζ y regiones intracelulares de la cadena y asociadas al receptor de Fc y más preferiblemente comprende polipéptidos de tres regiones intracelulares de CD28, 4-1BB y CD3ζ.

Estos polipéptidos de las regiones intracelulares se pueden unir mediante un conector oligopeptídico o un conector polipeptídico que consta de 2 a 10 aminoácidos. Los ejemplos de dicha secuencia conectora pueden incluir secuencias consecutivas de glicina-serina.

Los ejemplos de la región transmembranal según la presente invención pueden incluir polipéptidos de regiones transmembranales derivadas de CD8, cadenas α y β de receptor de células T, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154 y RTIG y pueden incluir preferiblemente un polipéptido de una región transmembranal de CD8 humana. Un RAQ está anclado a las membranas celulares de una célula T por esta región transmembranal.

La región transmembranal puede comprender una región bisagra que consiste en un oligopéptido o un polipéptido arbitrario y tiene una longitud de 1 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 70 aminoácidos. Los ejemplos de la región bisagra pueden incluir una región bisagra CD8 humana.

Una región espaciadora que consiste en un oligopéptido o un polipéptido arbitrario puede ubicarse entre el anticuerpo de cadena sencilla que reconoce un antígeno de superficie celular en una célula cancerígena y la región transmembranal o entre la región transmembranal y la región de transducción de señal de activación de las células T.

Los ejemplos de la longitud de la región espaciadora pueden incluir de 1 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 10 a 50 aminoácidos. Los ejemplos de dicha región espaciadora pueden incluir secuencias consecutivas de glicina-serina.

En la presente invención, el ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función de las células T no está particularmente limitado siempre que el ácido nucleico sea un ácido nucleico que codifique para IL-7 y un ácido nucleico que codifique para CCL19 (en lo sucesivo, también denominado colectivamente como "el presente ácido nucleico 1"), un ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-1 (en lo sucesivo, también denominado "el presente ácido nucleico 2"), o un ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-2 (en lo sucesivo, también denominado "el presente ácido nucleico 3"). El ácido nucleico puede comprender una pluralidad de ácidos nucleicos seleccionados de los presentes ácidos nucleicos 1 a 3 y puede comprender específicamente el presente ácido nucleico 1 y el presente ácido nucleico 2, el presente ácido nucleico 1 y el presente ácido nucleico 3, el presente ácido nucleico 2 y el presente ácido nucleico 3, el presente ácido nucleico 1 y el presente ácido nucleico 2 y el presente ácido nucleico 3.

El ácido nucleico que codifica para IL-7 y el ácido nucleico que codifica para CCL19 en el presente ácido nucleico 1 puede comprender un ácido nucleico que codifica para IL-7 y un ácido nucleico que codifica para CCL19, y el ácido nucleico que codifica para CCL19 puede ubicarse río arriba o río abajo del ácido nucleico que codifica para IL-7.

El ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP1 no está particularmente limitado siempre que el ácido nucleico codifique para una mutante de SHP1 que funcione de forma dominante sobre SHP1 y pueda inhibir el efecto de SHP1. Los ejemplos de los mismos pueden incluir un ácido nucleico que codifica para una mutante que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de SHP1 mediante la sustitución de al menos un aminoácido por otro aminoácido y que puede inhibir el efecto de SHP1. El ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP2 no está particularmente limitado siempre que el ácido nucleico codifique para una mutante de SHP2 que funcione de forma dominante sobre SHP2 y pueda inhibir el efecto de SHP2. Los ejemplos del mismo pueden incluir un ácido nucleico que codifica para una mutante que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de SHP2 mediante la sustitución de al menos un aminoácido por otro aminoácido y que puede inhibir el efecto de SHP2.

El vector de expresión de un RAQ de la presente invención puede comprender un ácido nucleico arbitrario entre el ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico y el ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune de las células T, entre una pluralidad de ácidos nucleicos seleccionados del presente ácido nucleico 1, el presente ácido nucleico 2 y el presente ácido nucleico 3, o entre el ácido nucleico que codifica para IL-7 y el ácido nucleico que codifica para CCL19 en el presente ácido nucleico 1 siempre que se pueda expresar cada ácido nucleico. Estos ácidos nucleicos se unen preferiblemente a través de una secuencia que codifica para un péptido de auto-escisión (péptido 2A) o SIER (sitio interno de entrada de ribozima), preferiblemente una secuencia que codifica para el péptido 2A. El enlace que utiliza esta secuencia permite la expresión eficiente de cada ácido nucleico.

El péptido 2A es un péptido de auto-escisión derivado de virus y se caracteriza en que G-P (posición de 1 residuo del extremo C) en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 se escinde en el retículo endoplásmico (Szymczak et al., Expert Opin. Biol. Ther. 5 (5): 627-638 (2005)). Por lo tanto, los ácidos nucleicos incorporados para flanquear el péptido 2A se expresan intracelularmente independientemente uno del otro.

El péptido 2A es preferiblemente un péptido 2A derivado de picornavirus, rotavirus, virus de insecto, *Aphthovirus* o virus de *Trypanosoma*, más preferiblemente un péptido 2A derivado de picornavirus (F2A) que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

El ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico se puede preparar mediante una técnica conocida en la técnica, tal como un método de síntesis química o un método de amplificación por PCR, sobre la base de secuencias de nucleótidos que codifican para los polipéptidos del anticuerpo de cadena sencilla contra un antígeno de superficie celular en una célula cancerígena, la región transmembranal y la región de transducción de señal de activación de las células T. Los codones seleccionados para codificar aminoácidos pueden modificarse para optimizar la expresión del ácido nucleico en una célula huésped de interés.

La información sobre las secuencias de nucleótidos que codifican para los polipéptidos del anticuerpo de cadena sencilla contra un antígeno de superficie celular en una célula cancerígena, la región transmembranal y la región de transducción de señal de activación de las células T puede obtenerse apropiadamente de documentos conocidos en la técnica o por una búsqueda en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) o similares.

Por ejemplo, la información sobre secuencias de nucleótidos que codifican para polipéptidos de las regiones transmembranales CD28, 4-1BB y CD3 ζ en la región de transducción de señal de activación de las células T puede obtenerse apropiadamente mediante una búsqueda en la base de datos de NCBI o similares. Ejemplos de los mismos pueden incluir secuencias registradas bajo GenBank No: NM_006139.2 (fecha actualizada: 10 de mayo de 2014) para CD28 humano, GenBank No: NM_001561.5 (fecha actualizada: 16 de marzo de 2014) para 4-1BB humano y GenBank No: NM_000734.3 (fecha actualizada: 12 de agosto de 2014) para CD3 ζ humano.

La información sobre una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de una región transmembranal de CD8 humana puede obtenerse apropiadamente mediante una búsqueda en la base de datos de NCBI o similares. Ejemplos de los mismos pueden incluir una secuencia registrada bajo GenBank No: NM_001768.6 (fecha actualizada: 10 de mayo de 2014).

La información sobre la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido del anticuerpo de cadena sencilla también se puede obtener preparando un anticuerpo monoclonal que reconoce el antígeno de la superficie celular diana, determinando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal mediante un método conocido en la técnica como el método de Edman, y adquiriendo la información sobre la base de la secuencia de aminoácidos. Los ejemplos del método para preparar a el anticuerpo monoclonal pueden incluir un método de preparación utilizando hibridomas, un método de preparación que implica transformar a un huésped con un vector de expresión que contiene a el gen del anticuerpo mediante un enfoque de ingeniería genética, y un método de preparación que implica inmunizar a un animal transgénico con el antígeno deseado.

El ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune de las células T, es decir, el ácido nucleico que codifica para IL-7 y el ácido nucleico que codifica para CCL19, el ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-1, o el ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-2, puede prepararse mediante un procedimiento conocido en la técnica, tal como un método de síntesis química o un método de amplificación por PCR, con base a sus respectivas secuencias de nucleótidos. Los codones seleccionados para codificar a los aminoácidos pueden modificarse para optimizar la expresión de ácido nucleico en una célula huésped de interés.

La información sobre el ácido nucleico que codifica para IL-7 y el ácido nucleico que codifica para CCL19, el ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-1, o el ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-2 puede obtenerse apropiadamente de documentos conocidos en la técnica o por una búsqueda en bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) o similares.

El ácido nucleico que codifica para IL-7 se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el tipo de célula a la que se va a transferir el vector de expresión de un RAQ de la presente invención. Ejemplos de los mismos pueden incluir a un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de IL-7 humana. Se puede utilizar una secuencia de nucleótidos que tiene 80% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más, más preferiblemente 95% o más, lo más preferiblemente 98% o más de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 siempre que se mantenga el efecto potenciador de la tasa de proliferación celular de IL-7.

El ácido nucleico que codifica para CCL19 se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el tipo de célula a la que se va a transferir el vector de expresión de un RAQ de la presente invención. Ejemplos de los mismos pueden incluir a un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de CCL19 humano. Se puede utilizar una secuencia de nucleótidos que tiene 80% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más, más preferiblemente 95% o más, lo más preferiblemente 98% o más de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 mientras se mantenga el efecto quimioatrayente de CCL19 en una célula T.

El ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-1 puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el tipo de célula a la que se va a transferir el vector de expresión de un RAQ de la presente invención. Ejemplos de los mismos pueden incluir a un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de una mutante negativa dominante de SHP-1 humano. Una secuencia de nucleótidos que tiene 80% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o puede utilizarse una identidad superior, más preferiblemente del 95% o superior, lo más preferiblemente del 98% o más de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, siempre que la mutante negativa dominante de SHP-1 pueda inhibir el efecto de SHP-1. En la SEQ ID NO: 5, la serina en la posición 453 es un sitio mutado.

El ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-2 puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el tipo de célula a la que se va a transferir el vector de expresión de un RAQ de la presente invención. Ejemplos de los mismos pueden incluir a un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de una mutante negativa dominante de SHP-2 humano. Una secuencia de nucleótidos que tiene 80% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o mayor, más preferiblemente 95% o más, lo más preferiblemente 98% o más de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 6 se puede utilizar siempre que la mutante negativa dominante de SHP-2 pueda inhibir el efecto de SHP-2. En la SEQ ID NO: 6, la serina en la posición 459 es un sitio mutado.

El vector de expresión de un RAQ de la presente invención puede ser lineal o circular y puede ser un vector no viral tal y como un plásmido, un vector viral o un vector basado en un transposón. Tal vector puede contener secuencias de control tales como un promotor y un terminador, y una secuencia de marcador selectivo tal y como un gen de resistencia a fármacos o un gen indicador. El ácido nucleico que codifica para un RAQ o el ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune de las células T se encuentra operativamente río abajo de la secuencia

promotora para que cada ácido nucleico pueda transcribirse de manera eficiente. Además, la expresión del ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico se puede confirmar fácilmente debido al gen marcador contenido en el mismo.

El vector de expresión de un RAQ de la presente invención puede contener un ácido nucleico que codifica para un gen suicida. La posición del gen suicida no está particularmente limitada, y el gen suicida puede localizarse, a través de una secuencia que codifica para el péptido 2A o SIER, río abajo del promotor para la expresión del ácido nucleico que codifica para IL-7, el ácido nucleico que codifica para CCL19, el ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-1, o el ácido nucleico que codifica para una mutante negativa dominante de SHP-2 y río arriba o río abajo de cada uno de estos ácidos nucleicos, o puede estar ubicado río abajo de un promotor adicional. El vector de expresión de un RAQ de la presente invención que contiene a el ácido nucleico que codifica para un gen suicida permite el control del número de las células T que expresan a un RAQ *in vivo* mediante la administración de un fármaco que activa las funciones del gen suicida de acuerdo con el curso del tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, cuando el tumor ha desaparecido.

Los ejemplos del gen suicida pueden incluir timidina quinasa del virus del herpes simple (VHS-TK) y genes de caspasa 9 inducibles descritos en los documentos que se proporcionan a continuación. Los ejemplos de fármacos que activan las funciones de estos genes pueden incluir ganciclovir para el primero y un compuesto AP1903 CID (inducción química de dimerización) para el segundo (Cooper LJ., Et al., *Cytotherapy*. 2006; 8 (2): 105- 17; Jensen MC et al., *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Sep; 16 (9): 1245-56; Jones BS. *Front Pharmacol*. 2014 Nov 27; 5: 254; Minagawa K., *Pharmaceuticals* (Basilea). 2015 May 8; 8 (2): 230-49; y Bole-Richard E., *Front Pharmacol*. 2015 25 Aug; 6: 174).

Los ejemplos del vector viral pueden incluir vectores de retrovirus, vectores de lentivirus, vectores de adenovirus y vectores de virus adenoasociados y pueden incluir preferiblemente vectores de retrovirus, más preferiblemente un vector pMSGV (Tamada k et al., *Clin Cancer Res* 18: 6436 -6445 (2002)) y un vector pMSCV (fabricado por Takara Bio Inc.). Mediante el uso de un vector de retrovirus, un transgen se integra en los genomas de una célula huésped y, por lo tanto, puede expresarse de manera estable durante un período prolongado.

La célula T que expresa a un RAQ de la presente invención no está particularmente limitada siempre que la célula T que expresa a un RAQ sea una célula T obtenida mediante la transferencia de (a) el vector de expresión de un RAQ de la presente invención o una célula T obtenida mediante la transferencia de (b) al menos dos vectores: un vector de expresión de un RAQ que contiene a un ácido nucleico que codifica para un RAQ y un ácido nucleico que codifica para interleucina-7 (vector de expresión de un RAQ-IL-7) y un vector de expresión de un RAQ que contiene a un ácido nucleico que codifica para un RAQ y un ácido nucleico que codifica para CCL19 (vector de expresión de un RAQ-CCL19). Los ejemplos del método para transferir el vector de expresión de un RAQ de la presente invención o el vector de expresión de un RAQ-IL-7 y el vector de expresión de un RAQ-CCL19 a una célula T pueden incluir, pero no se limitan a, métodos de transferencia mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal y como el método de infección viral, el método de fosfato de calcio, lipofección, microinyección y electroporación y puede incluir preferiblemente un método de infección viral. El vector de expresión de un RAQ-IL-7 puede contener a el ácido nucleico que codifica para un RAQ y el ácido nucleico que codifica para interleucina-7. El vector de expresión de un RAQ-CCL19 puede contener a el ácido nucleico que codifica para un RAQ y el ácido nucleico que codifica para CCL19. Al igual que con el vector de expresión de un RAQ de la presente invención, estos vectores de expresión pueden contener cada uno un ácido nucleico adicional tal y como un ácido nucleico que codifica para el péptido 2A, SIER o un gen suicida, siempre que cada ácido nucleico pueda expresarse.

Los ejemplos del método de infección viral pueden incluir un método que implica transfectar a una célula de empaquetamiento tal y como la célula GP2-293 (fabricada por Takara Bio Inc.), la célula Plat-GP (fabricada por Cosmo Bio Co., Ltd.), la célula PG13 (ATCC CRL-10686), o la célula PA317 (ATCC CRL-9078) con el vector de expresión de un RAQ de la presente invención y un plásmido de empaquetamiento para preparar a virus recombinantes e infectar a una célula T con los virus recombinantes. El método de infección viral se puede realizar utilizando un kit comercialmente disponible, como Retrovirus packaging Kit Eco (fabricado por Takara Bio Inc.).

La transferencia del vector de expresión de un RAQ de la presente invención a la célula T se puede confirmar examinando la expresión del RAQ mediante citometría de flujo, transferencia *Northern*, transferencia *Southern*, PCR tal y como RT-PCR, ELISA o transferencia *Western*, o examinar la expresión de un gen marcador insertado en el vector.

Los ejemplos de la célula T pueden incluir a una célula T derivada de humano y una célula T derivada de un mamífero no humano (por ejemplo, perro, gato, cerdo o ratón). Alternativamente, la célula T puede se puede obtener mediante aislamiento y purificación de un fluido corporal tal y como fluido sanguíneo o de médula ósea, tejidos del bazo, timo, ganglios linfáticos o similares, o inmunocitos que se infiltran en los tejidos cancerígenos del tumor primario, tumor metastásico, ascitis cancerígena, o similares. Los ejemplos de tales células T pueden incluir células $\alpha\beta$ T, células $\gamma\delta$ T, células T CD8⁺, células T CD4⁺, células T infiltrantes de tumores, células T de memoria, células T ingenuas y células TAN.

El anticuerpo de cadena sencilla expresado por las células T que expresan a un RAQ de la presente invención, está posicionado extracelularmente. La célula T que expresa un RAQ y tiene este anticuerpo de cadena sencilla es capaz de reconocer a un antígeno asociado a tumor (AAT) expresado en la superficie de la célula cancerígena.

- 5 Las células T que expresan un RAQ de la presente invención pueden albergar a un vector que contiene un ácido nucleico que codifica para un gen suicida además del vector de expresión de un RAQ de la presente invención.

10 El agente anticancerígeno de la presente invención no está particularmente limitado siempre que el agente anticancerígeno comprenda a la célula T que expresa un RAQ de la presente invención y un aditivo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos del aditivo pueden incluir solución salina, solución salina tamponada, medios de cultivo celular, dextrosa, agua inyectable, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos, estabilizadores, solubilizantes y tensioactivos, tampones y antisépticos, agentes de tonicidad, rellenos y lubricantes.

15 El agente anticancerígeno de la presente invención puede administrarse a un sujeto de prueba que necesite tratamiento contra el cáncer utilizando un método conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos del método de administración pueden incluir inyección intravenosa, intratumoral, intracutánea, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intramedular, intracardiaca, intraarticular, intrasinovial, intracraneal, intratecal y subaracnoidal (líquido cefalorraquídeo).

20 La cantidad de las células T que expresan un RAQ de la presente invención contenidas en el agente anticancerígeno que se va a administrar, puede ajustarse adecuadamente de acuerdo con el tipo, la posición y la gravedad del cáncer, la edad, el peso corporal y el estado del sujeto de prueba para recibir tratamiento, etc. Los ejemplos de los mismos pueden incluir preferiblemente 1×10^4 a 1×10^{10} células, preferiblemente 1×10^5 a 1×10^9 células, más preferiblemente 5×10^6 a 5×10^8 células, en una sola dosis.

25 El agente anticancerígeno que se va a administrar puede administrarse independientemente 4 veces, 3 veces, dos veces o una vez al día, en un intervalo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días o 5 días, una vez a la semana, en intervalos de 7 días, 8 días o 9 días, dos veces a la semana, una vez al mes o dos veces al mes.

30 Los ejemplos del cáncer para el agente anticancerígeno de la presente invención o un método para tratar el cáncer mencionado más adelante pueden incluir: cánceres tales como adenocarcinoma, cáncer de células escamosas, cáncer adenosquámico, cáncer indiferenciado, cáncer de células grandes, células pequeñas cáncer, cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer vaginal, cáncer de cuello, cáncer uterino, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de bazo, cáncer de pulmón, cáncer de tráquea, cáncer bronquial, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de testículos y cáncer de ovario; cánceres de tejidos óseos, tejidos de cartilago, tejidos grasos, tejidos musculares, tejidos vasculares y tejidos hematopoyéticos; sarcomas como condrosarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma y sarcoma de tejidos blandos; blastomas tales como hepatoblastoma, meduloblastoma, nefroblastoma, neuroblastoma, pancreatoblastoma, blastoma pleuropulmonar y retinoblastoma; tumor de células embrionarias; linfoma y leucemia

45 El agente anticancerígeno de la presente invención se puede utilizar en combinación con un agente anticancerígeno adicional. Los ejemplos del agente anticancerígeno adicional pueden incluir: agentes alquilantes tales como ciclofosfamida, bendamustina, ifosfamida y dacarbazina; antimetabolitos tales como pentostatina, fludarabina, cladribina, metotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina y encitabina; fármacos de direccionamiento molecular tales como rituximab, cetuximab y trastuzumab; inhibidores de quinasas tales como imatinib, gefitinib, erlotinib, afatinib, dasatinib, sunitinib y trametinib; inhibidores de proteasoma tales como bortezomib; inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina y tacrolimus; antibióticos anticancerígenos tales como idarubicina, doxorubicina mitomicina C; alcaloides vegetales tales como irinotecán y etopósido; fármacos que contienen platino como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; terapias hormonales tales como tamoxifeno y bicalutamida; y fármacos inmunorreguladores tales como interferón, nivolumab y pembrolizumab, y pueden incluir preferiblemente agentes alquilantes y antimetabolitos, más preferiblemente ciclofosfamida.

55 El método para "utilizar el agente anticancerígeno de la presente invención en combinación con el agente anticancerígeno adicional" puede incluir un método que utiliza el agente anticancerígeno adicional en el tratamiento, seguido del uso del agente anticancerígeno de la presente invención, un método que al mismo tiempo que utiliza el agente anticancerígeno de la presente invención y el agente anticancerígeno adicional, y un método que utiliza el agente anticancerígeno de la presente invención en el tratamiento, seguido del uso del agente anticancerígeno adicional y puede incluir preferiblemente un método que utiliza el agente anticancerígeno adicional en el tratamiento, seguido del uso del agente anticancerígeno de la presente invención. El uso combinado del agente anticancerígeno de la presente invención y el agente anticancerígeno adicional mejora aún más los efectos terapéuticos sobre el cáncer y también puede reducir los efectos adversos de cada agente anticancerígeno al disminuir la frecuencia de administración o la dosis del agente anticancerígeno. Además, el agente anticancerígeno adicional puede estar contenido en el agente anticancerígeno de la presente invención.

65

Los ejemplos del aspecto alternativo 1 de la presente invención pueden incluir 1) un método para tratar el cáncer, que comprende administrar a la célula T que expresa un RAQ de la presente invención a un paciente que necesita tratamiento contra el cáncer, 2) la expresión una célula T que expresa un RAQ de la presente invención para su uso como agente anticancerígeno, y 3) uso de una célula T que expresa un RAQ de la presente invención para la preparación de un agente anticancerígeno.

Los ejemplos del aspecto alternativo 2 de la presente invención pueden incluir un kit para la preparación de las células T que expresan un RAQ, que comprende el vector de expresión de un RAQ de la presente invención. El kit no está particularmente limitado siempre que comprenda el vector de expresión de un RAQ de la presente invención. El kit puede comprender un manual de instrucciones para la preparación de las células T que expresan un RAQ, y un reactivo para utilizar en la transferencia del vector de expresión de un RAQ de la presente invención a las células T.

Ejemplo 1

[Preparación de las células T que expresan IL-7 y CCL19]

(Selección del factor potenciador de la función inmune de las células T)

Al menos varios cientos de diferentes tipos de moléculas que pueden controlar las funciones de las células T están presentes *in vivo*. Los inventores seleccionaron primero a IL-7 y CCL19 entre una enorme cantidad de combinaciones con base en los hallazgos o experimentos anteriores, como moléculas de control para mejorar aún más el efecto antitumoral de las células T-RAQ, y también seleccionaron la combinación de estas dos moléculas, es decir, la combinación de IL-7 y CCL19, no cada una sola. Los inventores prepararon un vector para la coexpresión de estos factores potenciadores de la función inmune de las células T y del RAQ.

La IL-7 es una citoquina esencial para la supervivencia de las células T y es producida por células no hematopoyéticas, como las células estromales de la médula ósea, el timo y los órganos o tejidos linfáticos. Por otro lado, difícilmente se encuentra que las células T tengan la capacidad de producir IL-7.

CCL19 se produce principalmente a partir de células dendríticas o macrófagos de ganglios linfáticos y tiene la función de evocar la migración de las células T, células B o células dendríticas maduras a través de su receptor CCR7.

(Preparación del vector de expresión anti-FITC RAQ para la expresión de IL-7 y CCL19)

Un fragmento de ADN anti-FITC RAQ (SEQ ID NO: 7) que codifica para anti-FITC RAQ que consiste en un Fvcs anti-FITC, una región transmembranal CD8 de ratón y motivos de señal intracelular CD28-4-1BB-CD3ζ de ratón, un fragmento de ADN F2A-SMC (SEQ ID NO: 8) que codifica para el péptido 2A (F2A) que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y un sitio múltiple de clonación (SMC) que sigue al péptido, y un fragmento de ADN IL-7-F2A-CCL19 (SEQ ID NO: 9) codificando para IL-7 de ratón (sin un codón de paro) y F2A y CCL19 de ratón siguiendo a la IL-7 de ratón, se sintetizaron artificialmente. En la SEQ ID NO: 7, las posiciones 1 a 819 representan una secuencia que codifica para el polipéptido del Fvcs anti-FITC, las posiciones 829 a 1074 representan una secuencia que codifica para el polipéptido de la región transmembranal CD8 de ratón, las posiciones 1075 a 1197 representan una secuencia que codifica para polipéptido de la región intracelular CD28 de ratón, las posiciones 1198 a 1332 representan una secuencia que codifica para el polipéptido de la región intracelular 4-1BB, y las posiciones 1333 a 1674 representan una secuencia que codifica para el polipéptido de la región intracelular CD3ζ. En la SEQ ID NO: 9, las posiciones 1 a 462 representan una secuencia que codifica para IL-7, las posiciones 463 a 537 representan una secuencia que codifica para el F2A, y las posiciones 538 a 864 representan una secuencia que codifica para CCL19.

Para preparar un vector RAQ para la expresión de RAQ, IL-7 y CCL19, el fragmento de ADN anti-FITC RAQ y el fragmento de ADN F2A-SMC se unieron para preparar una construcción anti-FITC RAQ-F2A-SMC. Posteriormente, la construcción preparada se clonó en un vector de expresión de retrovirus pMSGV (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18: 6436-6445 (2002)) para preparar un vector pMSGV que contiene anti-FITC RAQ-F2A-SMC. El fragmento de ADN IL-7-F2A-CCL19 se insertó en el SMC del vector pMSGV mediante tratamiento con enzimas de restricción (NsiI y Sall) y ligación para obtener un vector pMSGV que contiene anti-FITC RAQ-F2A-IL-7-F2A-CCL19 (vector de expresión IL-7/CCL19 anti-FITC RAQ). El mapa del vector obtenido se muestra en la Figura 2. Además, el fragmento de ADN anti-FITC RAQ se clonó en un vector de expresión de retrovirus pMSGV para preparar un vector pMSGV que contiene anti-FITC RAQ como control (vector de control anti-FITC RAQ).

(Preparación de retrovirus que alberga IL-7/CCL19 vector de expresión-anti-FITC RAQ)

Para la transducción de las células T de ratón, se preparó un retrovirus. Una línea celular de empaquetamiento GP2-293 (fabricada por Takara Bio Inc.) se transfectó con el vector de expresión IL-7/CCL19 anti-FITC RAQ mencionado anteriormente o con el vector control anti-FITC RAQ y un plásmido pCL-Eco (fabricado por Imgenex Corp.) utilizando Lipofectamine 2000 o 3000 (fabricado por Life Technologies Corp.) para preparar a un retrovirus que alberga a el vector de expresión IL-7/CCL19 anti-FITC RAQ o el vector control anti-FITC RAQ. Después de 48 horas de la transfección, se recuperó un sobrenadante que contenía a el retrovirus.

Se utilizó DMEM suplementado con FCS al 10%, penicilina a 100 U/ml y estreptomicina a 100 mg/ml como medio de cultivo para las células GP2-293. Se utilizó RPMI-1640 suplementado con FCS al 10%, penicilina a 100 U/ml, estreptomicina a 100 mg/ml, 2-mercaptoetanol 50 mM y L-glutamina 2 mM como medio de cultivo para las células T utilizadas en los ejemplos mencionados más adelante.

(Transducción de las células T de ratón)

Para la transducción de las células T de ratón, se activaron 3×10^6 células T de ratón purificadas derivadas del bazo y de los ganglios linfáticos durante 48 horas con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 inmovilizado (3 µg/ml), anticuerpo monoclonal anti-CD28 (1 µg/ml) e IL-2 (100 UI/ml). Posteriormente, el sobrenadante que contenía a el retrovirus así preparado que albergaba a el vector de expresión IL-7/CCL19 anti-FITC RAQ o el vector control anti-FITC RAQ se mezcló con las células T de ratón activadas (1×10^6 células/ml) en una placa recubierta con 25 µg/ml de RetroNectin® (fabricado por Takara Bio Inc.). Después de la centrifugación a 1500 rpm durante 2 horas, las células se cultivaron durante 6 horas en presencia de IL-2 (100 UI/ml). Para eliminar el retrovirus del medio de cultivo, se recuperaron las células T de ratón, se transfirieron a un medio de cultivo de crecimiento fresco (RPMI) que contenía IL-2 (100 UI/ml) y se cultivaron durante 42 horas para obtener células T de ratón que albergan a el vector de expresión IL-7/CCL19 anti-FITC RAQ (células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19) o células T de ratón que albergan a el vector control anti-FITC RAQ (células T que expresan anti-FITC RAQ).

(Preparación del vector de expresión de un RAQ anti-CD20 para la expresión de IL-7 y CCL19)

Se preparó un vector pMSGV que contenía CD20 RAQ-F2AIL-7-F2A-CCL19 anti-humano (IL-7/CCL19 CD20 RAQ anti-humano) de la misma manera que en la preparación del vector de expresión IL-7/CCL19 anti-FITC RAQ descrito anteriormente, excepto que la secuencia de la región del Fvcs anti-FITC contenida en la secuencia representada por la SEQ ID NO: 7 fue reemplazada por una secuencia del Fvcs anti-CD20 humano (SEQ ID NO: 10) sintetizado por Life Technologies Corp. sobre la base de la secuencia de rituximab. Del mismo modo, se preparó un vector pMSGV que contenía CD20 RAQ anti-humano (vector CD20 RAQ anti-humano de control) de la misma manera que en la preparación del vector de control RAQ anti-FITC descrito anteriormente, excepto que la secuencia del Fvcs anti-FITC de la región contenida en la secuencia representada por SEQ ID NO: 7 se reemplazó con la secuencia del Fvcs CD20 anti-humano (SEQ ID NO: 10). El vector de expresión IL-7/CCL19 CD20 anti-humano RAQ o el vector control CD20 anti-humano RAQ se transfirió a células T de ratón de la misma manera que se mencionó anteriormente para preparar a las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano o células T anti-CD20 que expresan un RAQ.

Ejemplo 2

[Ensayo de expresión de un RAQ por citometría de flujo]

(Análisis por citometría de flujo)

El nivel de expresión de un RAQ que reconoce FITC como antígeno modelo se analizó mediante citometría de flujo de dos colores. Las células T preparadas que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 se cultivaron en presencia de dextrano unido a FITC y un anticuerpo monoclonal anti-CD8 unido a alofococianina (APC) (53-6.7 fabricado por Affymetrix, Inc.). Se utilizó EC800 (fabricado por Sony Corp.) en la citometría de flujo, y los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (fabricado por Tree Star, Inc.).

El nivel de expresión de un RAQ humano que reconoce a CD20 también se analizó mediante citometría de flujo de dos colores. Las células T preparadas que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano se analizaron utilizando proteína L biotinilada y estreptavidina unida a APC.

(Resultados)

Los resultados se muestran en las Figuras 3 a 5. En la Figura 3, la gráfica de la izquierda muestra los resultados sobre una muestra de RAQ sin teñir (no se añadió dextrano unido a FITC) de células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19, y la gráfica de la derecha representa los resultados sobre una muestra de RAQ teñida (se añadió dextrano unido a FITC) de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19. En la Figura 4, "transducción (-)" muestra los resultados sobre las células T no transducidas, "Cont." representa los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ, y "7x19" representa los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19. En la Figura 5, "transducción (-)" representa los resultados sobre las células T no transducidas, "Cont." representa los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano, y "7x19" representa los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano. Los valores numéricos en estas figuras representan el porcentaje de cada población. Como se muestra en las Figuras 3 a 5, la expresión de un RAQ se confirmó en las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 y en las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano.

Ejemplo 3

[Secreción de IL-7 y CCL19]

(Medición de las concentraciones de IL-7 y CCL19 en sobrenadante de cultivo de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 - 1)

Las células T preparadas que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 o las células T que expresan anti-FITC RAQ se estimularon con trastuzumab inmovilizado unido a FITC 1 µg/ml y se cultivaron durante 3 días. Se recuperó el sobrenadante y se midieron las concentraciones de IL-7 y CCL19 utilizando un kit ELISA disponible comercialmente (fabricado por R&D systems, Inc.). Los resultados se muestran en la Figura 6.

(Resultados)

Como se muestra en la Figura 6, en el sobrenadante del cultivo, se detectó IL-7 a 300 pg/ml o mayor, y CCL19 a 75 pg/ml o mayor. Por lo tanto, se confirmó que: las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 expresan IL-7 y CCL19; e IL-7 y CCL19 expresadas se secretan al exterior de las células. IL-7 y CCL19 de las células T de control anti-FITC que expresan RAQ cayeron por debajo del límite de detección (Sin detección).

(Medición de las concentraciones de IL-7 y CCL19 en el sobrenadante del cultivo de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 - 2)

Las concentraciones de IL-7 y CCL-19 después del cultivo durante 3, 5 o 7 días con o sin estimulación con trastuzumab inmovilizado unido a FITC o un anticuerpo monoclonal anti-CD3 se midieron utilizando un kit ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 7. En la Figura 7, la columna abierta muestra los resultados obtenidos sin estimulación, la columna gris muestra los resultados obtenidos con estimulación con trastuzumab unido a FITC, y la columna llena muestra los resultados obtenidos con estimulación con un anticuerpo monoclonal anti-CD3. "Cont." representa los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ y "7x19" representa los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19.

(Resultados)

Como es evidente a partir de la Figura 7, se demostró que las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 secretan IL-7 y CCL-19 al exterior de las células mediante cultivo no solo durante 3 días sino también por 5 días o 7 días.

(Medición de las concentraciones de IL-7 y CCL19 en el sobrenadante del cultivo de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano)

En cuanto a las células T preparadas que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano o las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano, las concentraciones de IL-7 y CCL-19 después del cultivo durante 3 días o 5 días con o sin simulación con mastocitoma P815 tratado con mitomicina C, mastocitoma P815 recombinado genéticamente para expresar CD20 humano (P815-hCD20), o un anticuerpo monoclonal anti-CD3 inmovilizado se midieron de manera similar utilizando un kit ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 8. En la Figura 8, la columna abierta muestra los resultados obtenidos sin estimulación, la columna sombreada en diagonal muestra los resultados obtenidos con estimulación con P815 tratado con mitomicina C, la columna llena muestra los resultados obtenidos con estimulación con P815-hCD20, y la columna gris muestra los resultados obtenidos con la estimulación con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 inmovilizado. "Cont." representa los resultados sobre las células T CD20 anti-humano que expresan un RAQ, y "7x19" describe los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano.

(Resultados)

Como es evidente a partir de la Figura 8, también se demostró que las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano también secretan IL-7 y CCL-19 al exterior de las células.

Ejemplo 4

[Número celular y tasa de supervivencia de las células T que expresan un RAQ]

(Número celular y tasa de supervivencia de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19)

Se realizó un estudio sobre si IL-7 o CCL19 producidas por las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 ejercerían funciones biológicas y exhibirían un efecto inductor de la inmunidad. Las células T preparadas que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 o las células T que expresan anti-FITC RAQ se estimularon con 1 µg/ml de trastuzumab unido a FITC inmovilizado y se cultivaron durante 3 días, 5 días o 7 días, y se recuperaron las células y el sobrenadante. El número celular y la tasa de supervivencia se analizaron mediante tinción con azul de tripano. Los

resultados se muestran en las Figuras 9 y 10. En las Figuras 9 y 10, la columna llena muestra los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19, la columna abierta muestra los resultados sobre las células T que expresan RAQ anti-FITC y la abscisa muestra el número de días de cultivo. La diferencia estadísticamente significativa se estudió mediante la prueba t de Student (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005, †p <0.001).

(Resultados)

Como se muestra en las Figuras 9 y 10, la proliferación celular y la tasa de supervivencia de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 fueron potenciadas, lo que demuestra que IL-7 y CCL19 producidas por las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 ejercen funciones biológicas.

(Número celular de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano)

Una muestra que contiene a las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano (4×10^5 células) se coestimuló con mitomicina C y P815-hCD20 en presencia de un control de isotipo IgG2a de rata, un anticuerpo neutralizante monoclonal anti-CD127, o un anticuerpo neutralizante monoclonal anti-CCR7. Las células se cultivaron durante 5 días y se examinó el número absoluto de células vivas utilizando azul de tripano. CD127 es un receptor de IL-7 y CCR7 es un receptor de CCL19. Los resultados se muestran en la Figura 11. En la Figura 11, "Iso.Cntrl" representa los resultados obtenidos por la estimulación con P815-hCD20 en presencia del control de isotipo IgG2a de rata, "anti-CD127" representa los resultados obtenidos por la estimulación con P815-hCD20 en presencia del anticuerpo neutralizante monoclonal anti-CD127, y "anti-CCR7" representa los resultados obtenidos por la estimulación con P815-hCD20 en presencia del anticuerpo monoclonal neutralizante anti-CCR7. En la Figura 11, la columna llena muestra los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano, y la columna abierta muestra los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano. Cada dato fue indicado por media $\pm$ desviación estándar de 3 pocillos. *: P <0.05, †: P <0.001.

(Resultados)

Como se muestra en la Figura 11, el número celular de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano también se incrementó, y su tasa de proliferación celular se mejoró mientras que la proliferación celular fue inhibida por anti-CD127, demostrando que la mejora en la tasa de proliferación celular funciona a través del receptor de IL-7 CD127.

Ejemplo 5

[Prueba de migración de células T]

(Prueba de migración de células T utilizando células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19)

El efecto quimioatrayente de CCL19 se estudió mediante una prueba de migración celular utilizando Transwell. Las propiedades de migración de las células T respondedoras se midieron mediante la migración a través de un filtro de policarbonato que tiene un tamaño de poro de 5 μ m utilizando cámaras Transwell (R) de 96 pocillos (Costar, fabricado por Corning, Inc.). Específicamente, las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 o las células T que expresan anti-FITC RAQ se estimularon durante 3 días con 1 μ g/ml de trastuzumab inmovilizado unido a FITC en la cámara inferior. Las células T respondedoras se prepararon a partir del bazo o de los ganglios linfáticos mediante selección negativa utilizando MACS (R) (fabricado por Miltenyi Biotec GmbH). Las células T que respondieron se marcaron con azul CytoTell (fabricado por AAT Bioquest, Inc.) y se cultivaron durante 3 horas en la capa superior. La migración desde la cámara superior a la cámara inferior se examinó mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 12. En la Figura 12, la columna llena muestra los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19, la columna abierta muestra los resultados sobre las células T anti-FITC que expresan un RAQ, y la ordenada muestra el número absoluto de las células T respondedoras que migraron a la cámara inferior (lo mismo es cierto para las Figuras 13 y 14 que se muestran a continuación). La diferencia estadísticamente significativa se estudió mediante la prueba t de Student (* p <0.05).

(Resultados)

Como se muestra en la Figura 12, las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 permitieron que un mayor número de las células T migraran a la cámara inferior en comparación con las células T que expresan anti-FITC RAQ. En la terapia de transferencia de linfocitos (por ejemplo, células T que expresan un RAQ), el daño a las células cancerígenas por parte de las células T administradas es importante por supuesto, y además, es importante activar a las células T endógenas (= inmunocitos del huésped) originalmente presentes en un paciente con cáncer y, por lo tanto, recluta a estas células como células que atacan a las células cancerígenas. Para este propósito, se prefiere no solo transferir linfocitos que tienen actividad antitumoral adicional, sino también evocar la interacción activa entre las células T transferidas y las células T endógenas mediante algún enfoque para que las células T endógenas se acumulen localmente al cáncer, desde el punto de vista de la mejora de los efectos inmunoterapéuticos. Como se observa en los resultados de la Figura 12, las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 tenían la capacidad

de acumular células T intrínsecas, lo que demuestra que la interacción activa entre las células T transferidas y las células T endógenas puede ser inducido.

(Prueba de migración de las células T o células dendríticas utilizando células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19)

Una muestra que contenía a las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 o las células T que expresan anti-FITC RAQ (5×10^5 células) se estimuló con trastuzumab inmovilizado unido a FITC o un anticuerpo monoclonal anti-CD3 en la cámara inferior de Transwell. El día 3, se colocaron 4×10^5 células T teñidas con azul CytoTell en la cámara superior y se incubaron durante 3 horas o 5 horas. Asimismo, cada muestra se estimuló con trastuzumab inmovilizado unido a FITC. En el día 3, se colocaron 4×10^5 células dendríticas teñidas con azul CytoTell en la cámara superior y se incubaron durante 3 horas. Las células respondedoras de cada tipo que migraron desde la cámara superior a la cámara inferior se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en las Figuras 13 y 14. En las Figuras 13 y 14, la columna llena muestra los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19, y la columna abierta muestra los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ. En las Figuras 13 y 14 y en la Figura 15 mencionadas más adelante, cada dato se indicó mediante una desviación estándar media de 3 pocillos. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, †: $P < 0.001$, ††: $P < 0.00001$, ‡: $P < 5 \times 10^{-5}$.

(Resultados)

Los resultados de las Figuras 13 y 14 demostraron que las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 tienen la alta capacidad de acumular células T intrínsecas y células dendríticas.

(Prueba de migración de células T utilizando células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano)

Una muestra que contenía las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano (1×10^5 células) se cocultivó con P815-hCD20 tratado con mitomicina C en la cámara inferior de Transwell. El día 3, 4×10^5 células T teñidas con azul CytoTell se colocaron en la cámara superior y se incubaron durante 3 horas en presencia de un control de isotipo IgG2a de rata, un anticuerpo monoclonal anti-CD127 o un anticuerpo monoclonal anti-CCR7. Las células T respondedoras que migraron desde la cámara superior a la cámara inferior se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 15. En la Figura 15, "Iso.Cntrl." representa los resultados obtenidos por la estimulación con P815-hCD20 en presencia del control de isotipo IgG2a de rata, "anti-CD127" representa los resultados obtenidos por la estimulación con P815-hCD20 en presencia del anticuerpo neutralizante monoclonal anti-CD127, y "anti-CCR7" representa los resultados obtenidos por la estimulación con P815-hCD20 en presencia del anticuerpo monoclonal neutralizante anti-CCR7. En la Figura 15, la columna llena muestra los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano, y la columna abierta muestra los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano.

(Resultados)

Como se observa a partir de los resultados de la Figura 15, las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano también tenían la alta capacidad de acumular células T intrínsecas, y la acumulación de las células T intrínsecas fue inhibida por anti-CCR7, lo que demuestra que la acumulación de las células T intrínsecas funciona a través del receptor de CCL19 CCR7.

Los resultados de las Figuras 9 a 15 demostraron que las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 y las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano poseen efectos importantes, indispensables para la inducción de la inmunidad, de proliferar eficazmente por IL-7, que tiene una alta tasa de supervivencia, y acumulando localmente células T o células dendríticas al cáncer a través de CCL19, y tienen un excelente efecto inductor de inmunidad. En resumen, se demostró que la expresión de las dos moléculas de control, es decir, "IL-7" y "CCL19", en las células T que expresan un RAQ, permite una mejora en el potencial proliferativo, la tasa de supervivencia y el efecto inductor de inmunidad de las células T.

Ejemplo 6

[Potencial proliferativo de las células T]

Una muestra que contenía a las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 o las células T de control que expresan anti-FITC RAQ (5×10^5 células) se teñió con azul CytoTell (fabricado por AAT Bioquest, Inc.), estimulado con trastuzumab inmovilizado unido a FITC, y luego analizado por citometría de flujo. Los resultados en el día 5 después del inicio de la estimulación se muestran en la Figura 16, y los resultados en los días 3 y 7 después del inicio de la estimulación se muestran en la Figura 17. En la Figura 16, los valores numéricos en los histogramas representan el número de la división celular. En las Figuras 16 y 17, los valores numéricos en las gráficas circulares representan la relación de cada fracción cerrada (0, 1, 2, 3 o 4 > el número de división celular) a una población de leucocitos.

(Resultados)

Los resultados de las Figuras 16 y 17 demostraron que el potencial proliferativo de las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 aumenta en comparación con las células T que expresan anti-FITC RAQ.

5 Ejemplo 7

[Expresión de CD127 o CCR7 en células T, células dendríticas y células T que expresan un RAQ]

Células T del bazo no estimuladas (células T ingenuas), células T del bazo estimuladas por cultivo durante 2 días con un anticuerpo monoclonal anti-CD3, un anticuerpo monoclonal anti-CD28 e IL-2 (células T activadas), células dendríticas de bazo no estimulado (células dendríticas) y células T que expresan anti-FITC RAQ (Cont.) y células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 (7x19) preparadas por activación de la misma manera que en " Transducción de las células T de ratón" del Ejemplo 1 se analizaron por citometría de flujo y se examinaron para determinar la expresión de CD127 o de CDR7. Las células T eran una población CD3⁺ CD19⁻, las células T que expresan anti-FITC RAQ y las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 eran poblaciones positivas para perlas de dextrano unidas a FITC y las células dendríticas eran una población CD11c⁺. Los resultados de examinar la expresión de CD127 se muestran en la Figura 18, y los resultados de examinar la expresión de CCR7 se muestran en la Figura 19. En estos dibujos, los valores numéricos representan el % de células positivas, "Cont." representa los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ y "7x19" representa los resultados sobre las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19.

(Resultados)

Como se muestra en la Figura 18, la expresión de CD127 se redujo evidentemente en las células T activadas en comparación con las células T ingenuas, pero se demostró que era más grande en las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 que en las células T activadas y para ser restauradas cubren a las células T ingenuas. Como se muestra en la Figura 19, la expresión de CCR7 se redujo mediante la activación en las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19, pero se demostró que se mantuvo tan alta como aproximadamente el 67% de la expresión en las células T ingenuas. Hasta ahora se sabía que la expresión de CD127 o CCR7 se reduce a aproximadamente 1/2 a 1/3 por la activación de las células T. Por lo tanto, incluso si se preparan células T que expresan un RAQ que expresan IL-7 o CCL19, se considera que los efectos de IL-7 y CCL19 se reducen mediante la activación de las células T que expresan un RAQ. Por lo tanto, generalmente, no puede esperarse que la expresión de IL-7 y CCL19 en células T que expresan un RAQ aumente el efecto inductor de inmunidad o la actividad antitumoral de las células T que expresan un RAQ. También en esta prueba, se pudo confirmar que la expresión de CD127 o CCR7 se redujo temporalmente en el día 2 después de la activación de las células T del bazo. No obstante, se demostró que la expresión de CD127 o CCR7 se restableció en el día 4 en las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19. Esto indica que la expresión de IL-7 y CCL19 en las células T que expresan un RAQ es útil para potenciar su efecto inductor de inmunidad o su actividad antitumoral.

40 Ejemplo 8

Efecto terapéutico en modelos de tumor de ratón.

(Administración de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano a ratones)

Se inocularon subcutáneamente 5×10^5 células de mastocitoma P815 genéticamente recombinadas para expresar CD20 humano (P815-hCD20) a cada ratón portador de cáncer (ratón DBA/2). Después de 3 días, 3×10^6 células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano o células T que expresan CD20 RAQ anti-humano se administraron por vía intravenosa al ratón. Se estableció un grupo sin tratamiento como control al inocular el mastocitoma P815 a cada ratón y no realizar el tratamiento posterior (sin la administración de las células T que expresan un RAQ). El volumen del tumor de ratón y la tasa de supervivencia se midieron dos veces por semana. En el análisis del volumen tumoral, se calculó la desviación estándar para cada grupo experimental. La diferencia estadísticamente significativa entre los 3 grupos se estudió mediante la prueba t de Student para el análisis de volumen tumoral y la prueba de log-rank para el examen de la tasa de supervivencia (* P <0.05, ** P <0.01).

Los resultados de examinar el cambio en los volúmenes tumorales de los ratones se muestran en la Figura 20, y los resultados de examinar la tasa de supervivencia de los ratones se muestran en la Figura 21. En las Figuras 20 y 21, el círculo abierto representa los resultados obtenidos por la administración de las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano, el círculo lleno representa los resultados obtenidos por la administración de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano, y el romboide abierto representa los resultados obtenidos sin la administración de las células T que expresan un RAQ en el grupo sin tratamiento. En la Figura 20, la abscisa muestra días después de la administración intravenosa de las células a los ratones, y la ordenada muestra el volumen del tumor (mm³). En la Figura 21, la abscisa muestra semanas después de la administración intravenosa de las células a los ratones, y la ordenada muestra la tasa de supervivencia (%).

(Resultados)

Como se muestra en las Figuras 20 y 21, se confirmó que la administración de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano exhibe el efecto de disminuir un volumen tumoral y mejorar la tasa de supervivencia (efecto de prolongación del período de supervivencia) en comparación con la administración de las células T anti-CD20 que expresan un RAQ humano o ninguna administración de las células T que expresan un RAQ. Por lo tanto, se demostró que las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano tienen una excelente actividad antitumoral.

(Inoculación de un agente anticancerígeno y células T CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano a ratones)

Se inocularon subcutáneamente 5×10^5 células P815-hCD20 en cada ratón. En el día 10 después de la inoculación, se administró por vía intraperitoneal un agente anticancerígeno ciclofosfamida (CPA, 100 mg/kg), y el día 14, 1×10^6 de células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano o células T que expresan CD20 RAQ anti-humano se administraron por vía intravenosa a los mismos. Los resultados de examinar la tasa de supervivencia de los ratones se muestran en la Figura 22, y los resultados de examinar sus volúmenes tumorales se muestran en las Figuras 23 y 24. En las Figuras 22 a 24, la abscisa muestra días después de la inoculación subcutánea de P815-hCD20 (la fecha de inoculación subcutánea de P815-hCD20 a los ratones se definió como el día 0), y la ordenada muestra la tasa de supervivencia (Figura 22) o el volumen del tumor (Eje mayor del tumor X (Eje menor del tumor)² / 2 (mm³)) (Figuras 23 y 24). "sin tratamiento" representa los resultados obtenidos en un grupo no tratado, "CPA" representa los resultados obtenidos en un grupo que recibió solo CPA, "CPA + Cont." representa los resultados obtenidos en el grupo que recibió las células T CD20 anti-humano que expresan un RAQ después de la administración de CPA, "CPA + 7x19" muestra los resultados obtenidos en el grupo que recibió a las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano después de la administración de CPA, y † representa la muerte de un ratón. La Figura 24 es un diagrama que muestra 1/10 de valores numéricos en la ordenada de la gráfica de CPA + 7x19 en la Figura 23.

(Resultados)

Como se muestra en la Figura 22, el uso combinado de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano de la presente invención y el agente anticancerígeno mostraron una tasa de supervivencia muy alta. Como se muestra en las Figuras 23 y 24, se demostró que el uso combinado de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano de la presente invención y el agente anticancerígeno logran la desaparición completa del tumor. Como se muestra en la Figura 24, el volumen del tumor fue mayor en el día 10 después de la inoculación subcutánea de P815-hCD20. A este respecto, el eje menor era de 4.86 mm a 7.25 mm, el eje mayor era de 5.92 mm a 8.39 mm y el volumen del tumor era de 69.91 mm³ a 220.50 mm³ con un promedio de 140.02 mm³. Los resultados descritos anteriormente también indicaron que el tumor que proliferaba desapareció temporalmente por el tratamiento con las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano. En el caso de utilizar a las células T que expresan un RAQ de la presente invención en combinación con un agente anticancerígeno adicional, se prefiere, para potenciar aún más la actividad antitumoral de las células T que expresan un RAQ de la presente invención, para disminuir primero el número celular de linfocitos mediante el uso del agente anticancerígeno adicional y posteriormente administrar a las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano, como en el método descrito anteriormente. Tal método puede potenciar la homeostasis *in vivo* de las células T que expresan un RAQ.

Ejemplo 9

[Efecto de infiltrarse en los tejidos tumorales]

Se inocularon subcutáneamente 5×10^5 células P815-hCD20 a cada ratón. En el día 3 después de la inoculación, se administraron 1×10^6 de células T CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano a los mismos. El día 21 después de la inoculación, se cortaron los tejidos tumorales. El tejido de cada ratón se dividió en dos porciones. Una de estas dos porciones se tiñó con hematoxilina-eosina (H&E), y la otra porción se utilizó en análisis inmunohistoquímicos. El análisis inmunohistoquímico se realizó utilizando la combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 o la combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-DEC205 como anticuerpos primarios. Se utilizaron IgG2a anti-rata unidos a Alexa Fluor (R) 488 (verde) y IgG2b anti-rata unido a Alexa Fluor (R) 647 (rojo) como anticuerpos secundarios. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul). Las muestras teñidas con H&E y los fragmentos inmunomarcados se observaron microscópicamente con un aumento de x100 o x200. CD4 y CD8 son marcadores para células T, y DEC205 es un marcador para células dendríticas. Los resultados de la tinción de H&E se muestran en la Figura 25, y los resultados del análisis inmunohistoquímico se muestran en las Figuras 26 (a) y 26 (b). Los resultados de cuantificar la región positiva marcada por cada tinción fluorescente (tinción CD4 (rojo), tinción CD8 (verde), tinción CD3 (rojo), tinción DEC205 (verde) y la coexistencia de CD3 y DEC205 (amarillo)) en los datos de las Figuras 26 (a) y 26 (b) utilizando el programa Hybrid Cell Count (fabricado por Keyence Corp.) se muestran en las Figuras 27 (a) y 27 (b), respectivamente. En las Figuras 25 a 27, "sin tratamiento" o "sin trat." representa los resultados obtenidos en un grupo no tratado, "Cont." representa los resultados obtenidos en el grupo tratado con las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano, y 7x19 representa a el grupo tratado con las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano.

(Resultados)

A partir de los resultados de la Figura 25, el tratamiento con las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano, aceleró la necrosis (regiones indicadas por las flechas), y se observaron regiones donde desaparecieron los núcleos. Los resultados de las Figuras 26 (a) y 27 (a) demostraron que las células T se infiltran en los tejidos cancerígenos mediante el tratamiento con las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano. Los resultados de las Figuras 26 (b) y 27 (b) demostraron que las células dendríticas junto con las células T se infiltran en los tejidos cancerígenos mediante el tratamiento con las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano.

Ejemplo 10

[Efecto terapéutico provocado por la combinación de IL-7 y CCL19 sobre el tumor]

Se inocularon subcutáneamente 5×10^5 células P815-hCD20 a cada ratón DBA/2. En el día 3 después de la inoculación, 1×10^6 células T que expresan CD20 anti-humano, células T que expresan CD20 RAQ-IL-7 anti-humano que expresan IL-7 solo como el factor potenciador de la función inmune (que no expresa CCL19), células T que expresan CD20 RAQ-CCL19 anti-humano que expresan CCL19 solo como factor potenciador de la función inmune (que no expresa IL-7), o células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano que expresan IL-7 y CCL19, se administraron por vía intravenosa a los mismos. Se estableció un grupo de ratón control sin la administración de las células T que expresan un RAQ que no expresaban IL-7 ni CCL19. En el día 10 después de la administración, se midieron el eje mayor y el eje menor del tumor, y el volumen del tumor (mm^3) se calculó de la misma manera que anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 28. En la Figura 28, "Sin tratar" representa los resultados obtenidos sin la administración de las células T que expresan un RAQ, "Control RAQ" representa los resultados obtenidos por la administración de CD20 RAQ anti-humano, "IL-7 RAQ" representan los resultados obtenidos por la administración de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7 anti-humano, "CCL19 RAQ" representan los resultados obtenidos por la administración de células T que expresan CD20 RAQ-CCL19 anti-humano, y "RAQ IL-7/CCL19" representa los resultados obtenidos por la administración de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano.

Las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7 anti-humano se obtuvieron preparando un vector pMSGV que contiene CD20 RAQ-F2A-IL-7 CD20 anti-humano (vector de expresión IL-7 CD20 RAQ anti-humano) y transfiriendo este vector a células T de ratón de la misma manera que en "Transducción de células T de ratón" del Ejemplo 1. Del mismo modo, las células T que expresan CD20 RAQ-CCL19 anti-humano se obtuvieron preparando un vector pMSGV que contiene CD20 RAQ-F2A-CCL19 anti-humano (vector de expresión CCL19 CD20 RAQ anti-humano) y transfiriendo este vector a las células T de ratón de la misma manera que en "Transducción de células T de ratón" del Ejemplo 1. La preparación de cada vector se realizó de acuerdo con el método de "Preparación del vector de expresión de un RAQ anti-CD20 para la expresión de IL-7 y CCL19" o "Preparación del vector de expresión de un RAQ anti-CD20 para la expresión de IL-7 y CCL19" del Ejemplo 1. Una secuencia de posiciones 1 a 462 y un codón de paro que sigue estas posiciones en la SEQ ID NO: 9 se utilizó como una secuencia que codifica para IL-7. Se utilizó una secuencia de posiciones 538 a 864 en la SEQ ID NO: 9 como una secuencia que codifica para CCL19. Los resultados se muestran en la Figura 28.

(Resultados)

Como se muestra en la Figura 28, la administración de las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7 anti-humano o las células T que expresan CD20 RAQ-CCL19 anti-humano simplemente exhibieron un efecto inhibitor del crecimiento tumoral equivalente o ligeramente menor que mediante la administración de las células T anti-CD20 humanas que expresan un RAQ control, mientras que el tumor casi desapareció por la administración de las células T anti-CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano. Por lo tanto, aunque IL-7 o CCL19 apenas tiene un efecto inhibitor del crecimiento tumoral, se demostró que la combinación de IL-7 y CCL19 produce un efecto inhibitor muy alto del crecimiento tumoral.

Ejemplo 11

[Actividad citotóxica contra las células tumorales en el ensayo de liberación de ^{51}Cr - 1]

(Selección del factor potenciador de la función inmune de las células T)

En el microambiente de los tejidos cancerígenos, las señales inhibitoras se transducen a los inmunocitos de modo que se inhibe la respuesta inmune antitumoral para atenuar así el efecto de la inmunoterapia. Las señales inhibitoras a los inmunocitos son transducidas por SHP-1 o SHP-2. Por lo tanto, en la terapia con células T contra el cáncer, el efecto antitumoral puede potenciarse al permitir que las células T produzcan una mutante negativa dominante que inhiba el efecto de SHP-1 o SHP-2. En consecuencia, se preparó un vector para la coexpresión de una mutante negativa dominante que inhibe los efectos de SHP-1 o SHP-2, y un RAQ, y se examinó la actividad citotóxica contra las células tumorales.

(Preparación del vector de expresión de un RAQ para la expresión de la mutante negativa dominante de SHP1 o SHP2)

Se preparó un fragmento de ADN que codifica para una mutante negativa dominante de SHP1 de ratón (SHP1DN) que contiene una mutación de un residuo de cisteína catalítica en la posición 453 a serina (C453S) mediante

mutagénesis sitio dirigida mediada por PCR. Se sintetizó por Life Technologies Corp. Y se utilizó un fragmento de ADN que codifica para una mutante negativa dominante de SHP2 de ratón (SHP2DN) que contiene una mutación de un residuo de cisteína catalítica en la posición 459 a serina (C459S). Se muestra una secuencia de nucleótidos que codifica para el SHP1DN de ratón en la SEQ ID NO: 11, y una secuencia de nucleótidos que codifica para el SHP2DN de ratón se muestra en la SEQ ID NO: 12. 3 bases en las posiciones 1357 a 1359 en la SEQ ID NO: 11 y en las posiciones 1375 a 1377 en la SEQ ID NO: 12 son sitios mutados. El fragmento de ADN que codifica para SHP1DN o SHP2DN se insertó en el SMC del vector pMSGV que contiene CD20 Fvcs RAQ-F2A-SMC anti-humano en el curso de la preparación del vector de expresión CD20 RAQ anti-humano de IL-7/CCL19 en el Ejemplo 2 para obtener un vector de expresión SHP1DN CD20 RAQ anti-humano y un vector de expresión SHP2DN CD20 RAQ anti-humano, respectivamente. Los mapas de los vectores obtenidos se muestran en la Figura 29.

(Transducción de las células T de ratón)

El vector de expresión CD20 RAQ anti-humano SHP1DN o vector de expresión CD20 RAQ anti-humano SHP2DN se transfirió a células T de ratón de la misma manera que en el Ejemplo 1 para obtener células T que expresan CD20 RAQ-SHP1DN anti-humano y células T que expresan CD20 RAQ-SHP2DN anti-humano, respectivamente. Las células T CD20 RAQ anti-humano preparadas en el Ejemplo 1 se utilizaron como control.

(Actividad citotóxica contra células tumorales en el ensayo de liberación de ^{51}Cr)

La actividad citotóxica de las células T que expresan un RAQ contra el tumor se midió mediante el ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr de 4 horas. P815 que expresa CD20 humano (P815-hCD20) se utilizó como células tumorales diana. Las células tumorales se colectaron, se cultivaron a 37°C durante 1 hora en presencia de 100 μCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, y luego se lavaron tres veces. Posteriormente, las células tumorales se cultivaron conjuntamente con las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano, las células T que expresan CD20 RAQ-SHP1DN anti-humano o las células T que expresan CD20 RAQ-SHP2DN anti-humano como células T efectoras. La proporción efector/diana se ajustó a 0.6, 1.25, 2.5, 5 o 10. La liberación máxima y la liberación espontánea de las células diana se midieron cultivando a las células en un medio de cultivo que contenía Triton-X al 10% (fabricado por Sigma- Aldrich Co. LLC.) o el medio de cultivo solo. La liberación de ^{51}Cr del sobrenadante se midió utilizando el contador de centelleo TopCount (fabricado por PerkinElmer, Inc.). El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó de acuerdo con la ecuación: Citotoxicidad específica (%) = [(Liberación de prueba - Liberación espontánea) / (Liberación máxima - Liberación espontánea)] x 100. Los resultados se muestran en la Figura 30. En la Figura 30 (a), el círculo abierto representa los resultados sobre las células T CD20 RAQ anti-humano, y el círculo lleno muestra los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ-SHP1DN anti-humano. En la Figura 30 (b), el círculo abierto representa los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano, y el círculo lleno muestra los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ-SHP2DN anti-humano. La abscisa indica la proporción entre el efector (células T) y la diana (células tumorales) por una proporción E/D, y la ordenada muestra la citotoxicidad específica (%). La diferencia estadísticamente significativa se estudió mediante la prueba t de Student (* p < 0.05).

Como se muestra en la Figura 30, las células T que expresan CD20 RAQ-SHP1DN anti-humano y las células T que expresan CD20 RAQ-SHP2DN anti-humano mostraron una actividad citotóxica significativamente mayor contra las células tumorales que la de las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano.

Ejemplo 12

[Actividad citotóxica contra células tumorales en el ensayo de liberación de ^{51}Cr -2]

P815-hCD20 (1×10^4 células/pocillo) se mezcló con las células T que expresan anti-FITC RAQ (Cont., Círculo) o las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 (7×19 , cuadrado) en una relación efector/diana (E/D) de 0.15625, 0.3125, 0.625, 2.5, 5 o 10 en presencia de rituximab sin etiquetar (Ab, abierto) o unido a FITC (FITC-Ab, lleno). De la misma manera que anteriormente, se midió la liberación de ^{51}Cr del sobrenadante y se calculó el porcentaje de actividad citotóxica. Los resultados se muestran en la Figura 31. En la Figura 31, el "círculo lleno" representa los resultados obtenidos mediante la mezcla con las células T que expresan anti-FITC RAQ en presencia de rituximab unido a FITC, el "círculo abierto" representa el resultados obtenidos mediante la mezcla con las células T que expresan anti-FITC RAQ en presencia de rituximab sin marcar, el "cuadrado lleno" representa los resultados obtenidos mediante la mezcla con las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 en presencia de rituximab unido a FITC, y el "cuadrado abierto" representa los resultados obtenidos mediante la mezcla con las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 en presencia de rituximab no marcado.

P815-hCD20 (1×10^4 células/pocillo) se mezcló con las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano o las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano en una proporción efector/diana (E/D) de 0.3125, 0.625, 2.5, 5, 10 o 20. De la misma manera que se mencionó anteriormente, se midió la liberación de ^{51}Cr del sobrenadante y se calculó el porcentaje de actividad citotóxica. Los resultados se muestran en la Figura 32. En la Figura 32, el "círculo lleno" representa los resultados obtenidos mediante la mezcla con las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano, y el "círculo abierto" representa el resultado obtenido por la mezcla con las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano.

(Resultados)

Como se muestra en las Figuras 31 y 32, se demostró que las células T que expresan anti-FITC RAQ-IL-7/CCL19 mantienen actividad citotóxica por célula contra células tumorales al mismo nivel que células T que expresan anti-FITC RAQ. Del mismo modo, se demostró que las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano mantienen actividad citotóxica por célula contra células tumorales al mismo nivel que las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano.

Ejemplo 13

[Supervivencia *in vivo* de las células T que expresan un RAQ y diferenciación en células T de memoria]

(Análisis por citometría de flujo)

Se inocularon subcutáneamente 5×10^5 células P815-hCD20 a cada ratón DBA/2. El día 10 después de la inoculación, se administró por vía intraperitoneal un agente anticancerígeno ciclofosfamida (CPA, 100 mg/kg), y el día 14, 1×10^6 células T que expresan anti-CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano o células T que expresan CD20 RAQ se administraron por vía intravenosa a los mismos. El día 21 después de la administración de las células T que expresan un RAQ, los leucocitos se aislaron del bazo o los ganglios linfáticos regionales del tumor (área subaxilar, parte superior del brazo e ingle). Los resultados del análisis de CD4, CD8, CD44 y CD62L para los fenotipos superficiales de los leucocitos por citometría de flujo se muestran en la Figura 33. Los leucocitos del bazo fueron estimulados por cultivo durante 4 días con P815-hCD20 tratado con mitomicina C. Los resultados de la prueba de la proliferación de las células T por citometría de flujo se muestra en la Figura 34. La expresión del RAQ se confirmó utilizando proteína L biotinilada y estreptavidina unida a APC. En la Figura 33, los numerales representan las proporciones de las regiones respectivas cerradas sobre las células T CD4⁺ y las células T CD8⁺ (CD62L⁺ CD44⁻: células T ingenuas, CD62L⁺ CD44⁺: células T de memoria central, CD62L⁻ CD44⁺: células T de memoria efectora). En la Figura 34, los numerales representan la proporción de las células T positivas para proteínas L. En las Figuras 33 y 34, "Cont." representa los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ anti-humano, y "7x19" representa los resultados sobre las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano.

(Resultados)

Los resultados mostrados en las Figuras 33 y 34 demostraron que las células T de memoria aumentan en los bazos y los ganglios linfáticos de los ratones que reciben las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano, y las células T que expresan CD20 RAQ-IL-7/CCL19 anti-humano que sobreviven en los ratones, proliferan fuertemente por cocultivo con las células tumorales que expresan CD20 humano. Junto con los resultados de la tasa de supervivencia en las Figuras 21 y 22, estos resultados sugieren que las células T que expresan un RAQ de la presente invención sobreviven eficientemente *in vivo* en un destinatario y también tienen la capacidad de extinguir a las células cancerígenas y mejorar una tasa de supervivencia convirtiéndose en células T de memoria, e indicando que las células T que expresan un RAQ de la presente invención también son eficaces para la prevención de la recurrencia del cáncer.

Aplicabilidad industrial

El uso del vector de expresión de un RAQ de la presente invención permite la preparación de las células T-RAQ que tienen viabilidad y capacidad de acumular linfocitos, y las células T-RAQ que tienen resistencia a la inmunosupresión en un microambiente cancerígeno. Por lo tanto, el vector de expresión de un RAQ de la presente invención es aplicable al campo de la inmunoterapia contra el cáncer.

Listado de secuencias

<110> Universidad de Yamaguchi

<120> Vector de expresión de un RAQ y células T que expresan RAQ

<130> FH26-030WO

<150> JP 2014-208200

<151> 2014-10-09

<160> 12

<170> Patente Internacional 3.1

<210> 1

<211> 8
 <212> PRT
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> Región de escisión peptídica 2A
 10 <220>
 <223> Inventor: Tamada, Koji
 15 Inventor: Sakoda, Yukimi
 Inventor: Adachi, Keishi
 <220>
 20 <221> Característica miscelánea
 <222> (2)..(2)
 25 <223> Val o Ile
 <220>
 <221> Característica miscelánea
 30 <222> (4)..(4)
 <223> cualquier aminoácido
 35 <400> 1

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1 5

<210> 2
 40 <211> 25
 <212> PRT
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> péptido 2A (F2A)
 50 <400> 2

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20 25

55 <210> 3
 <211> 177

<212> PRT

<213> artificial

5

<220>

<223> IL-7 humana

10 <400> 3

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
50 55 60

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175

His

<210> 4

15

<211> 98

ES 2 751 945 T3

<212> PRT

<213> artificial

5 <220>

<223> CCL19 humana

<400> 4

10

Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Leu Trp Thr Ser Pro
1 5 10 15

Ala Pro Thr Leu Ser Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser
20 25 30

Val Thr Gln Lys Pro Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr
35 40 45

Leu Leu Ile Lys Asp Gly Cys Arg Val Pro Ala Val Val Phe Thr Thr
50 55 60

Leu Arg Gly Arg Gln Leu Cys Ala Pro Pro Asp Gln Pro Trp Val Glu
65 70 75 80

Arg Ile Ile Gln Arg Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg
85 90 95

Ser Ser

<210> 5

15 <211> 595

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> SHP1DN humano

25 <400> 5

ES 2 751 945 T3

Met Val Arg Trp Phe His Arg Asp Leu Ser Gly Leu Asp Ala Glu Thr
1 5 10 15

Leu Leu Lys Gly Arg Gly Val His Gly Ser Phe Leu Ala Arg Pro Ser
20 25 30

Arg Lys Asn Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser Val Arg Val Gly Asp Gln
35 40 45

Val Thr His Ile Arg Ile Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60

Gly Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu Leu Val Glu Tyr Tyr Thr
65 70 75 80

ES 2 751 945 T3

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

ES 2 751 945 T3

Gln Met Ala Trp Gln Glu Asn Ser Arg Val Ile Val Met Thr Thr Arg
 340 345 350
 Glu Val Glu Lys Gly Arg Asn Lys Cys Val Pro Tyr Trp Pro Glu Val
 355 360 365
 Gly Met Gln Arg Ala Tyr Gly Pro Tyr Ser Val Thr Asn Cys Gly Glu
 370 375 380
 His Asp Thr Thr Glu Tyr Lys Leu Arg Thr Leu Gln Val Ser Pro Leu
 385 390 395 400
 Asp Asn Gly Asp Leu Ile Arg Glu Ile Trp His Tyr Gln Tyr Leu Ser
 405 410 415
 Trp Pro Asp His Gly Val Pro Ser Glu Pro Gly Gly Val Leu Ser Phe
 420 425 430
 Leu Asp Gln Ile Asn Gln Arg Gln Glu Ser Leu Pro His Ala Gly Pro
 435 440 445
 Ile Ile Val His Ser Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Thr Ile Ile
 450 455 460
 Val Ile Asp Met Leu Met Glu Asn Ile Ser Thr Lys Gly Leu Asp Cys
 465 470 475 480
 Asp Ile Asp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Met Val Arg Ala Gln Arg Ser
 485 490 495
 Gly Met Val Gln Thr Glu Ala Gln Tyr Lys Phe Ile Tyr Val Ala Ile
 500 505 510
 Ala Gln Phe Ile Glu Thr Thr Lys Lys Lys Leu Glu Val Leu Gln Ser
 515 520 525
 Gln Lys Gly Gln Glu Ser Glu Tyr Gly Asn Ile Thr Tyr Pro Pro Ala
 530 535 540
 Met Lys Asn Ala His Ala Lys Ala Ser Arg Thr Ser Ser Lys His Lys
 545 550 555 560
 Glu Asp Val Tyr Glu Asn Leu His Thr Lys Asn Lys Arg Glu Glu Lys
 565 570 575
 Val Lys Lys Gln Arg Ser Ala Asp Lys Glu Lys Ser Lys Gly Ser Leu

580

585

590

Lys Arg Lys
595

- 5 <210> 6
- <211> 593
- <212> PRT
- 10 <213> artificial
- <220>
- <223> SHP2DN
- 15 <400> 6

ES 2 751 945 T3

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

ES 2 751 945 T3

Leu Val Glu His Tyr Lys Lys Asn Pro Met Val Glu Thr Leu Gly Thr
 195 200 205
 Val Leu Gln Leu Lys Gln Pro Leu Asn Thr Thr Arg Ile Asn Ala Ala
 210 215 220
 Glu Ile Glu Ser Arg Val Arg Glu Leu Ser Lys Leu Ala Glu Thr Thr
 225 230 235 240
 Asp Lys Val Lys Gln Gly Phe Trp Glu Glu Phe Glu Thr Leu Gln Gln
 245 250 255
 Gln Glu Cys Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Lys Glu Gly Gln Arg Gln Glu
 260 265 270
 Asn Lys Asn Lys Asn Arg Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe Asp His Thr
 275 280 285
 Arg Val Val Leu His Asp Gly Asp Pro Asn Glu Pro Val Ser Asp Tyr
 290 295 300
 Ile Asn Ala Asn Ile Ile Met Pro Glu Phe Glu Thr Lys Cys Asn Asn
 305 310 315 320
 Ser Lys Pro Lys Lys Ser Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Cys Leu Gln Asn
 325 330 335
 Thr Val Asn Asp Phe Trp Arg Met Val Phe Gln Glu Asn Ser Arg Val
 340 345 350
 Ile Val Met Thr Thr Lys Glu Val Glu Arg Gly Lys Ser Lys Cys Val
 355 360 365
 Lys Tyr Trp Pro Asp Glu Tyr Ala Leu Lys Glu Tyr Gly Val Met Arg
 370 375 380
 Val Arg Asn Val Lys Glu Ser Ala Ala His Asp Tyr Thr Leu Arg Glu
 385 390 395 400
 Leu Lys Leu Ser Lys Val Gly Gln Gly Asn Thr Glu Arg Thr Val Trp
 405 410 415
 Gln Tyr His Phe Arg Thr Trp Pro Asp His Gly Val Pro Ser Asp Pro
 420 425 430
 Gly Gly Val Leu Asp Phe Leu Glu Glu Val His His Lys Gln Glu Ser

ES 2 751 945 T3

435					440					445					
Ile	Met	Asp	Ala	Gly	Pro	Val	Val	Val	His	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly
	450					455					460				
Arg	Thr	Gly	Thr	Phe	Ile	Val	Ile	Asp	Ile	Leu	Ile	Asp	Ile	Ile	Arg
465						470					475				480
Glu	Lys	Gly	Val	Asp	Cys	Asp	Ile	Asp	Val	Pro	Lys	Thr	Ile	Gln	Met
				485					490					495	
Val	Arg	Ser	Gln	Arg	Ser	Gly	Met	Val	Gln	Thr	Glu	Ala	Gln	Tyr	Arg
			500					505					510		
Phe	Ile	Tyr	Met	Ala	Val	Gln	His	Tyr	Ile	Glu	Thr	Leu	Gln	Arg	Arg
		515					520					525			
Ile	Glu	Glu	Glu	Gln	Lys	Ser	Lys	Arg	Lys	Gly	His	Glu	Tyr	Thr	Asn
	530					535					540				
Ile	Lys	Tyr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gln	Thr	Ser	Gly	Asp	Gln	Ser	Pro	Leu
545						550					555				560
Pro	Pro	Cys	Thr	Pro	Thr	Pro	Pro	Cys	Ala	Glu	Met	Arg	Glu	Asp	Ser
				565					570					575	
Ala	Arg	Val	Tyr	Glu	Asn	Val	Gly	Leu	Met	Gln	Gln	Gln	Lys	Ser	Phe
			580					585					590		

Arg

<210> 7

5 <211> 1674

<212> ADN

<213> artificial

10

<220>

<223> anti-FITC RAQ

15

<400> 7

ES 2 751 945 T3

atggagttgc ctgttaggtt gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat	60
gtcgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc	120
tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacac agtaatggaa acacctatctt acgttggtac	180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaaggctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240
ggggtcccag acagggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caagatcagc	300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tggtccgtgg	360
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaaagtagtg ctgatgatgc taagaaggat	420
gctgctaaga aggatgatgc taagaaggat gatgctaaga aggatggtga ggtgaagctg	480
gatgagactg gaggaggctt ggtgcaacct gggaggcca tgaaactctc ctgtgttgcc	540
tctggattca cttttagtga ctactggatg aactgggtcc gccagtctcc agagaaagga	600
ctggagtggg tagcacaat tagaaacaaa ccttataatt atgaaacata ttattcagat	660
tctgtgaaag gcagattcac catctcaaga gatgattcca aaagtagtgt ctacctgcaa	720
atgaacaact taagagttga agacatgggt atctattact gtacgggttc ttactatggt	780
atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctccg cggccgcagt cgtgccagtc	840
cttcagaaag tgaactctac tactaccaag ccagtgtgctc gaactccctc acctgtgcac	900
cctaccggga catctcagcc ccagagacca gaagattgtc ggccccgtgg ctcagtgaag	960
gggaccggat tggacttcgc ctgtgatatt tacatctggg cacccttggc cggaatctgc	1020
gtggccccctc tgctgtcctt gatcatcact ctcatctgct accacaggag ccgaaatagt	1080
agaaggaaca gactccttca aagtgactac atgaacatga ctccccggag gcctgggctc	1140
actcgaaagc cttaccagcc ctacgcccct gccagagact ttgcagcgta ccgccccaaa	1200
tggatcagga aaaaattccc ccacatattc aagcaaccat ttaagaagac cactggagca	1260
gctcaagagg aagatgcttg tagctgccga tgtccacagg aagaagaagg aggaggagga	1320
ggctatgagc tgagagcaaa attcagcagg agtgcagaga ctgctgcaa cctgcaggac	1380
cccaaccagc tctacaatga gctcaatcta gggcgaagag aggaatatga cgtcttgag	1440
aagaagcggg ctcggtatcc agagatggga ggcaaacagc agaggaggag gaacccccag	1500
gaaggcgtat acaatgcact gcagaaagac aagatggcag aagcctacag tgagatcggc	1560
acaaaaggcg agaggcggag aggcaagggg cacgatggcc ttaccaggg tctcagcact	1620
gccaccaagg acacctatga tgccctgcat atgcagaccc tggccccctcg ctaa	1674

<210> 8

5

<211> 146

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> F2A-SMC

<400> 8

ggaagcggag	tgaacagac	tttgaatttt	gaccttctca	agttggcggg	agacgtggag	60
tccaaccctg	gaccatgcat	aaaaagctta	aaccagttaa	ctggaaaacg	cgtaaagtcg	120
acaaaggcca	aaaaggccaa	cgtacg				146

<210> 9

<211> 864

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> ratónIL-7-F2A-ratónCCL19

<400> 9

atgttccatg	tttcttttag	atatatcttt	ggaattcctc	cactgatcct	tgttctgctg	60
cctgtcacat	catctgagtg	ccacattaaa	gacaaagaag	gtaaagcata	tgagagtgta	120
ctgatgatca	gcatcgatga	attggacaaa	atgacaggaa	ctgatagtaa	ttgcccgaat	180
aatgaaccaa	acttttttag	aaaacatgta	tgtgatgata	caaaggaagc	tgcttttcta	240
aatcgtgctg	ctcgcaagtt	gaagcaatth	cttaaaatga	atatcagtga	agaattcaat	300
gtccacttac	taacagtatc	acaaggcaca	caaacactgg	tgaactgcac	aagtaaggaa	360
gaaaaaaacg	taaaggaaca	gaaaaagaat	gacgcatgth	tcctaaagag	actactgaga	420
gaaataaaaa	cttgttggaa	taaaattttg	aagggcagta	taggaagcgg	agtgaaacag	480
actttgaatt	ttgaccttct	caagttggcg	ggagacgtgg	agtccaacct	tggacctatg	540
gccccccgtg	tgacccact	cctggccttc	agcctgctgg	ttctctggac	cttcccagcc	600
ccaactctgg	ggggtgctaa	tgatgcggaa	gactgctgcc	tgtctgtgac	ccagcgcccc	660
atccctggga	acatcgtgaa	agccttccgc	taccttctta	atgaagatgg	ctgcagggtg	720
cctgctgttg	tgttcaccac	actaaggggc	tatcagctct	gtgcacctcc	agaccagccc	780
tgggtggatc	gcatcatccg	aagactgaag	aagtcttctg	ccaagaacaa	aggcaacagc	840
accagaagga	gccctgtgtc	ttga				864

<210> 10

<211> 783

<212> ADN

<213> artificial

5 <220>

<223> anti-humanoCD20 Fvcs

<400> 10

10

```

atggactgga cctggcggat cctgttcctg gtggctgctg ctacaggcgc ccacagccag      60
atcgtgctgt ctcagtctcc cgccatcctg tctgctagcc ctggcgagaa agtgaccatg      120
acctgcagag ccagcagcag cgtgtcctac atccactggg tccagcagaa gcccggcagc      180
agccccaagc cttggatcta cgccacaagc aacctggcct ctggcgtgcc agtgcggttt      240
agcggctctg gctctggcac cagctacagc ctgaccatca gcagagtgga agccgaggac      300
gccgccacct actactgtca gcagtggacc agcaaccccc ccacattcgg cggaggcacc      360
aagctggaaa tcaagggcgg aggcggatct ggcggcggag gatctggggg aggcggctct      420
caggtgcagc tgcagcagcc tggcgctgag ctctgtgaaac ctggcgctc cgtgaagatg      480

agctgcaagg ccagcggcta caccttcaca agctacaaca tgcactgggt caagcagacc      540
cctggcagag gcctggaatg gatcggcgct atctaccccg gcaacggcga cacctcctac      600
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccctg accgccgaca agagcagcag cacagcctac      660
atgcagctgt cctccctgac cagcgaggac agcgccgtgt actactgcgc cagatctacc      720
tactacggcg gcgactggta cttcaacgtg tggggcgctg gcaccaccgt gaccgtgtct      780
gct                                                                    783

```

<210> 11

15 <211> 1788

<212> ADN

<213> artificial

20

<220>

<223> ratón AHP1DN

25 <400> 11

ES 2 751 945 T3

atggtgaggt	ggtttcaccg	ggacctcagc	gggcctgatg	cagagaccct	gctgaagggc	60
cggggagtc	ctgggagctt	cctggctcgg	cccagccgca	agaaccaggg	tgacttctcc	120
ctctcagtca	gggtggatga	tcaggtgact	catattcgga	tccagaactc	aggggacttc	180
tatgacctgt	acggagggga	gaagtttgcg	acgctgacag	agctggtcga	gtattacacg	240
cagcagcagg	gcatcctgca	ggaccgagat	ggcaccatca	tccaccttaa	gtaccactg	300
aactgctcgg	accccaccag	tgagaggtgg	taccacggcc	acatatctgg	agggcaggcg	360
gagtcactgc	tgcaggccaa	gggcgagccc	tggacatttc	ttgtgcgtga	gagtctcagc	420
caacctgggtg	atthttgtgct	ctctgtgctc	aatgaccagc	ccaaggctgg	cccaggttcc	480
ccgctcaggg	tcactcatat	caaggttatg	tgtgaggggtg	gacgctatac	tgtgggtggc	540
tcagagacgt	ttgacagcct	cacagacctg	gtggagcact	tcaagaagac	agggattgag	600
gaggcctcgg	gtgcctttgt	ctacctgcgg	cagccttact	acgctactcg	ggtaaacgca	660
gctgacattg	agaatcgggt	cttggaactg	aacaagaagc	aggagtcgga	ggacacagcc	720
aaggctggct	tctgggagga	gtttgagagt	ctacaaaagc	aggaggtaaa	gaatctacac	780
caacgtctgg	aagggcagcg	gccagagaa	aagagcaaga	accgctacaa	gaacattctt	840
ccctttgacc	acagccgagt	gatcctgcag	ggacgtgaca	gtaacatccc	aggctctgac	900
tacatcaatg	ccaactacgt	gaagaaccag	ctgctaggtc	cagatgagaa	ctctaagacc	960
tacatcgcca	gccagggctg	tctggatgcc	acagtcaatg	acttctggca	gatggcttgg	1020
caggagaaca	ctcgtgtcat	cgtcatgact	accagagagg	tggagaaaagg	ccggaacaaa	1080
tgtgtcccat	actggcccga	ggtgggcact	cagcgtgtct	atggtctcta	ctctgtgacc	1140
aacagtaggg	agcatgacac	agcagaatac	aaactgcgaa	cattacagat	ctccccacta	1200
gacaatgggg	acctggttcg	ggagatatgg	cactaccagt	acctgagctg	gcctgaccat	1260
ggggttccca	gtgagcctgg	gggtgtcctc	agctttcttg	atcagatcaa	ccagcgacag	1320
gaaagtttgc	ctcatgcagg	gcccattcatt	gtgcattcca	gcgctggcat	cggccgcacg	1380
ggcaccatca	tcgtcattga	tatgcttatg	gaaagcatct	ccaccaaggg	gctagactgt	1440
gacattgata	tccagaagac	catccagatg	gtacgagcac	agcgtccgg	catggtgcag	1500
accgaggccc	agtacaagtt	tatttacgtg	gccattgccc	agttcatcga	aacgaccaag	1560
aagaaactgg	agatcataca	atcccagaag	ggccaggagt	cggagtatgg	gaatatcacg	1620
taccctccc	ctgtgaggag	tgcccacgcc	aaagcctcgc	gtacttcctc	caagcacaag	1680
gaggaggtgt	acgaaaacgt	gcatagcaag	agcaagaagg	aagagaaagt	aaagaagcag	1740
cggtcggcag	acaaggagaa	gaacaaaggt	tctctcaaga	ggaagtga		1788

ES 2 751 945 T3

<211> 1782

<212> ADN

5

<213> artificial

<220>

10 <223> ratón SHP2DN

<400> 12

atgacatcgc	ggagatggtt	tcaccccaac	atcactggtg	tggaggcaga	gaatctcctg	60
ctgaccagag	gagtcgatgg	cagtttttta	gcaaggccca	gtaagagtaa	ccctggagac	120
ttcactctgt	ctgttagaag	aaatggagct	gttaccacaca	tcaagattca	gaacactggg	180
gactactatg	acctctatgg	tggggagaag	tttgccactt	tggctgaact	ggttcagtat	240
tacatggaac	accatgggca	gctgaaagag	aagaatggag	atgttatcga	gctcaagtac	300
ccgctgaact	gtgcagaccc	tacctctgaa	aggtggttcc	atggtcactt	gtctggaaaa	360
gaagcagaga	agctgctgac	ggagaagggc	aagcatggca	gcttcctcgt	tcgagagagc	420
cagagccacc	ccggagactt	cgttctctcc	gtgcgcactg	gtgacgacaa	aggggagagc	480
aacgacggca	agtccaaagt	gaccacgctc	atgatccgct	gtcaggagct	gaaatacgac	540
gttggtgggg	gagagcgctt	tgactctctg	acagacctgg	tggagcatta	caagaagaac	600
cccatggtgg	agacgctggg	cacagtcctg	cagctcaagc	agcccctcaa	cacaactcgt	660
atcaatgctg	ctgaaattga	aagccggggt	cgagagttaa	gcaagctggc	tgagaccaca	720
gataaagtca	agcagggctt	ttgggaagag	tttgagacgc	tccagcaaca	ggaatgcaaa	780
cttctctata	gccgaaaaga	aggacagaga	caagaaaata	aaaacaaaaa	cagatacaaa	840
aacatcctgc	cctttgatca	taccagggtc	gttctgcatg	atggggatcc	caatgagcct	900
gtttctgatt	acattaatgc	aaacatcatc	atgcctgagt	ttgagaccaa	gtgcaacaat	960
tccaaaccca	aaaagagtta	cattgccact	caaggctgcc	tgcagaacac	ggtgaatgac	1020

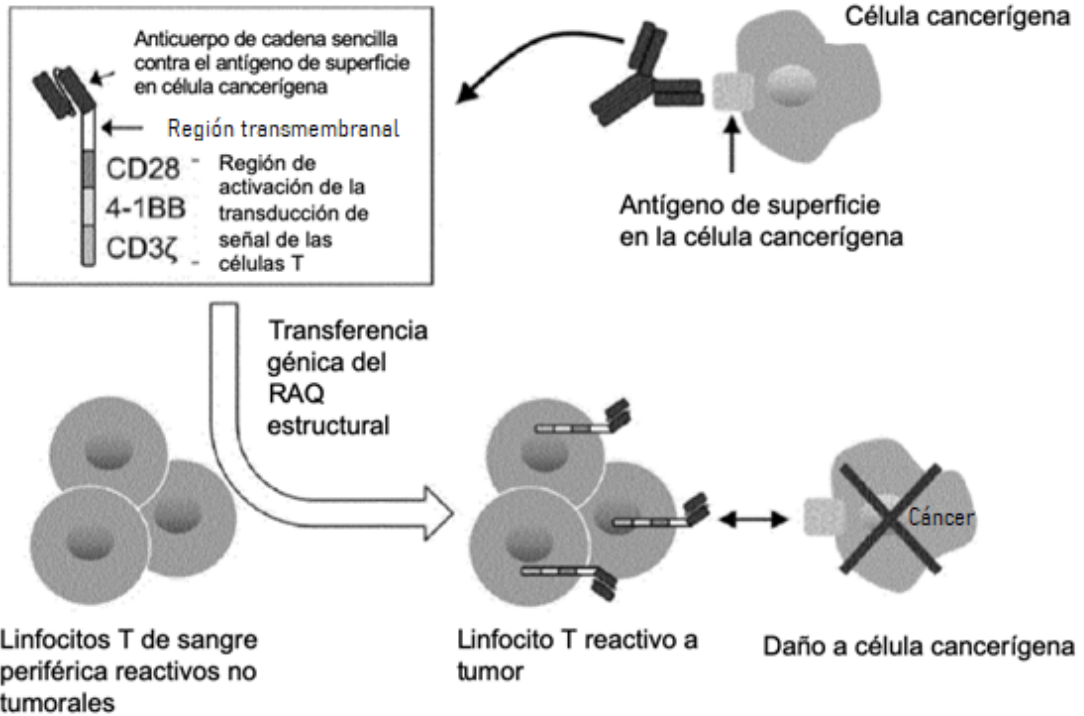
15

REIVINDICACIONES

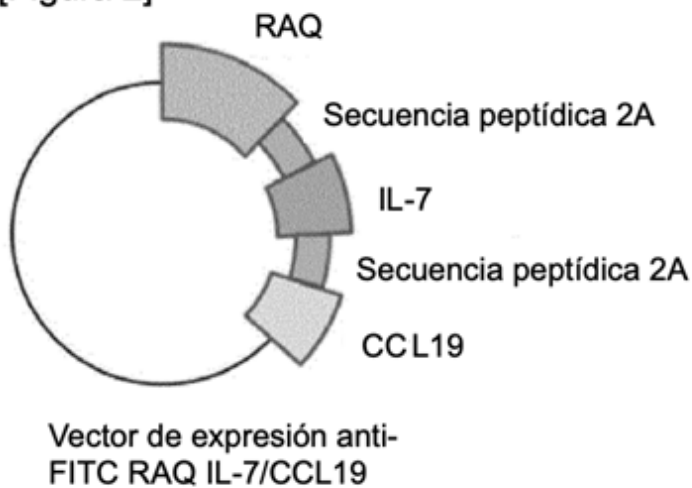
1. Un vector de expresión de un RAQ que comprende un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (RAQ) y un ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune de las células T, en el que el ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune es un ácido nucleico que codifica para interleucina-7 y un ácido nucleico que codifica para CCL19.
2. El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico que codifica para un RAQ y el ácido nucleico que codifica para un factor potenciador de la función inmune de las células T están unidos a través de una secuencia que codifica para un péptido de auto escisión.
3. El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el ácido nucleico que codifica para interleucina-7 y el ácido nucleico que codifica para CCL19 están unidos mediante una secuencia que codifica para un péptido de auto escisión.
4. El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido nucleico que codifica para un RAQ contiene un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de un anticuerpo de cadena sencilla que reconoce a FITC o a CD20.
5. El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ácido nucleico que codifica para un RAQ contiene un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de una región transmembranal de CD8.
6. El vector de expresión de un RAQ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ácido nucleico que codifica para un RAQ contiene ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de una región intracelular CD28, una región intracelular 4-1BB y una región intracelular CD3ζ.
7. Una célula T que expresa un RAQ introducido con el siguiente vector (a) o (b):
 - (a) el vector de expresión de un RAQ según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
 - (b) un vector de expresión de un RAQ que contiene un ácido nucleico que codifica para un RAQ y un ácido nucleico que codifica para interleucina-7, y un vector de expresión de un RAQ que contiene un ácido nucleico que codifica para un RAQ y un ácido nucleico que codifica para CCL19.
8. Un agente anticancerígeno que comprende a células T que expresan un RAQ de acuerdo con la reivindicación 7 y un aditivo farmacéuticamente aceptable.
9. Una célula T que expresa un RAQ, interleucina-7 y CCL19.
10. Un agente anticancerígeno que comprende a la célula T según la reivindicación 9 y un aditivo farmacéuticamente aceptable.

[Figura 1]

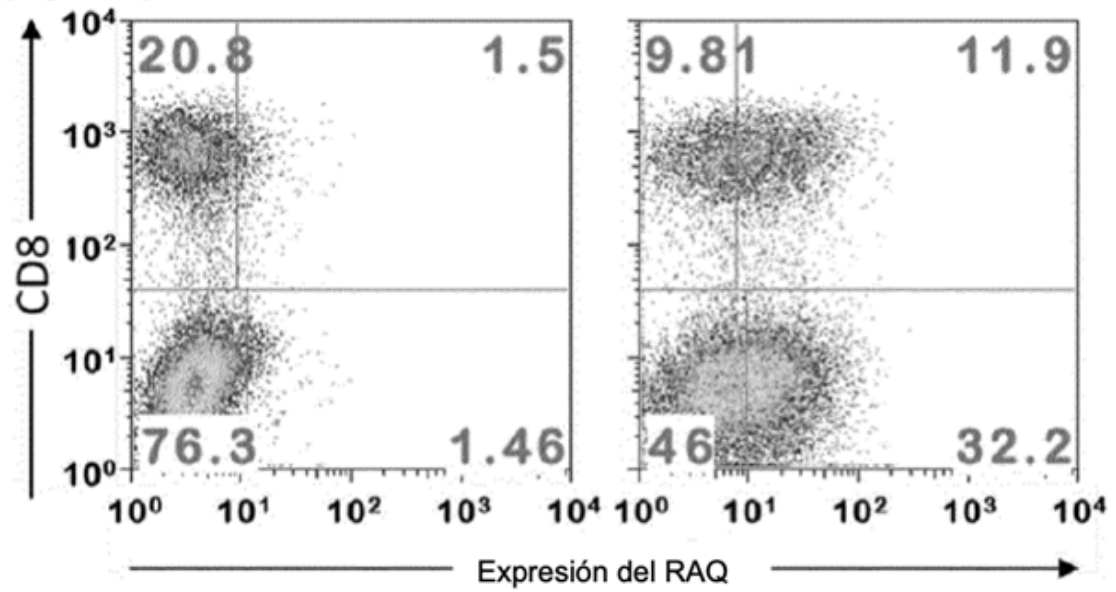
Receptor de antígeno quimérico (RAQ)



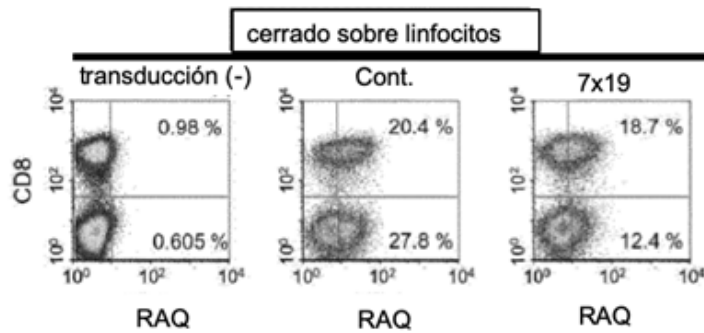
[Figura 2]



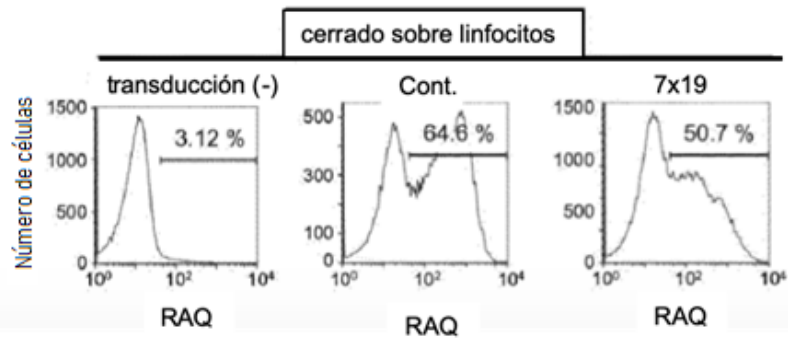
[Figura 3]



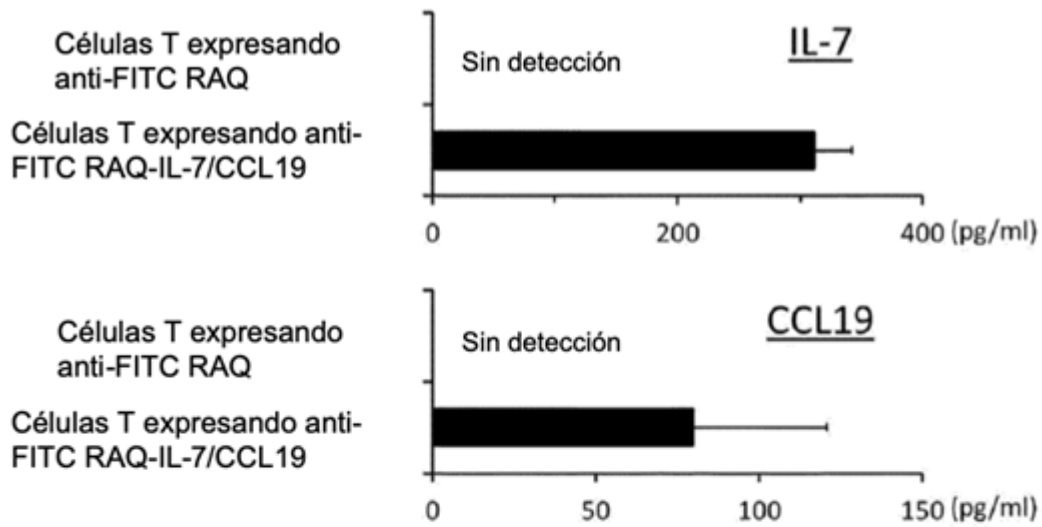
[Figura 4]



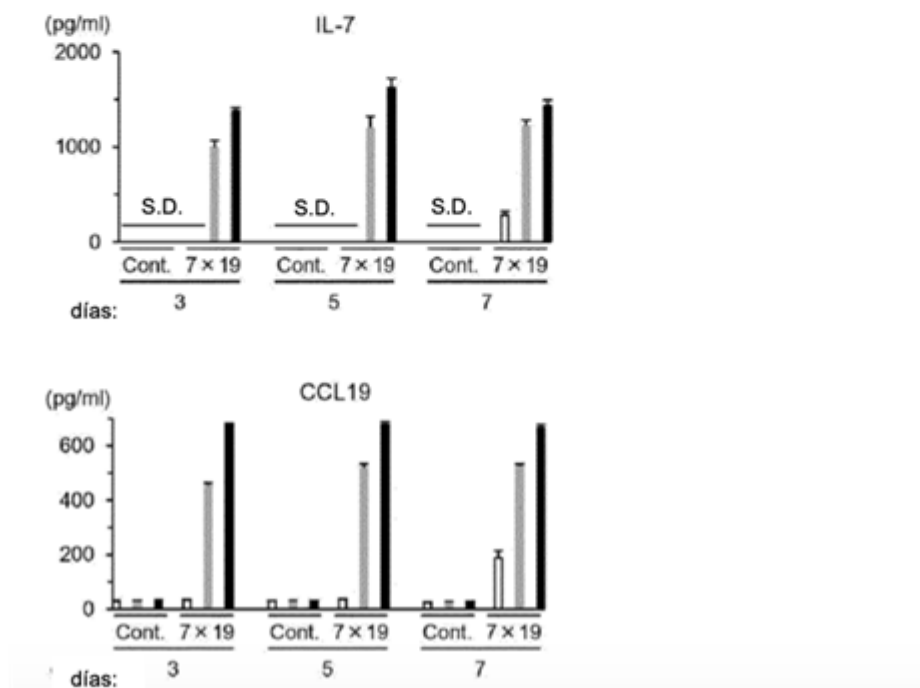
[Figura 5]



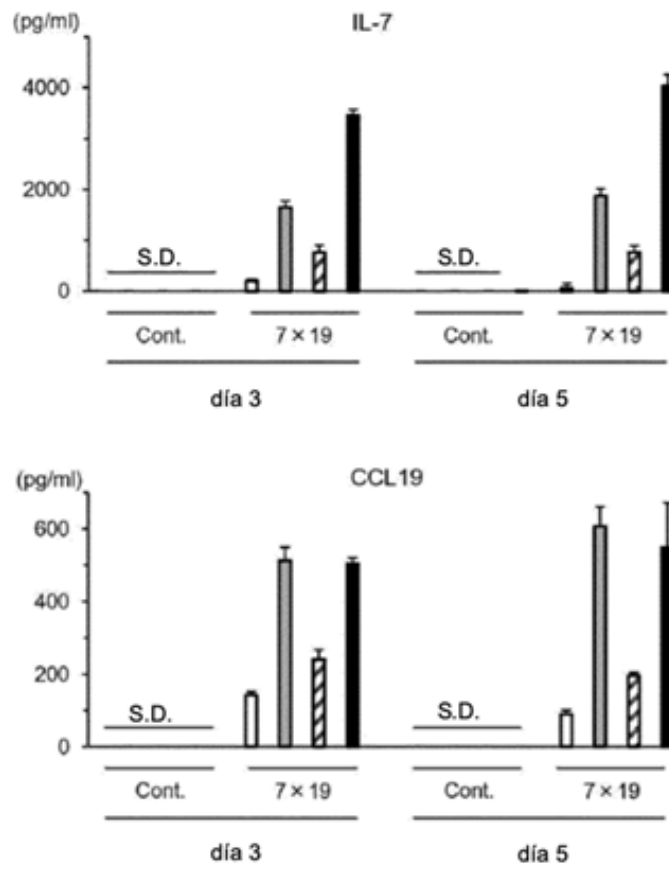
[Figura 6]



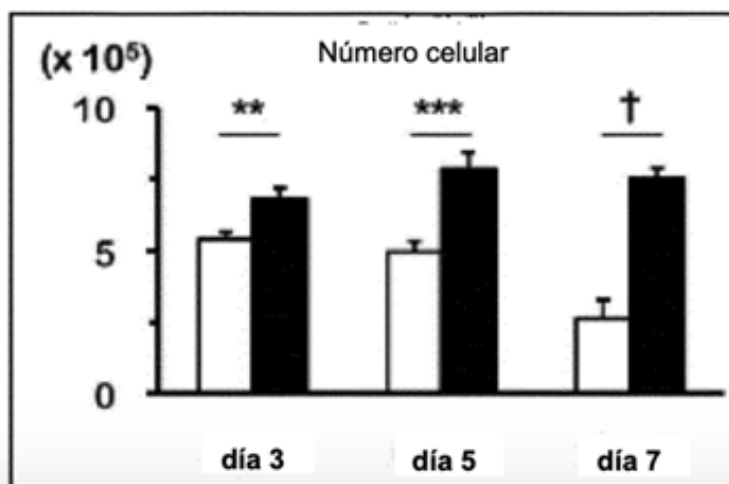
[Figura 7]



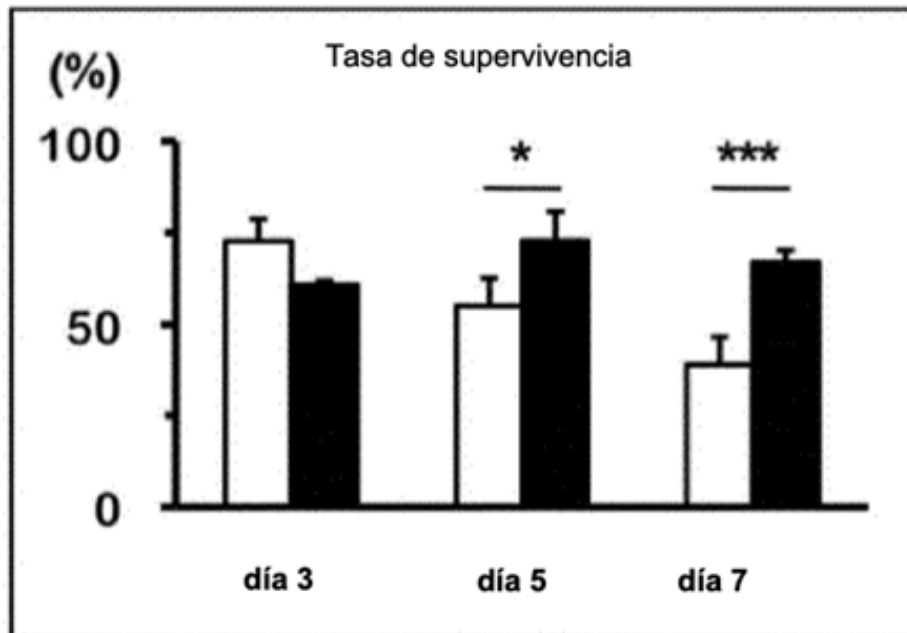
[Figura 8]



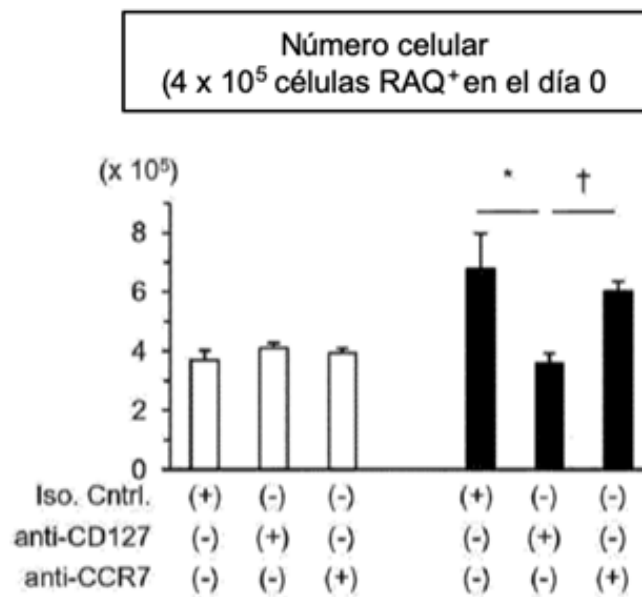
[Figura 9]



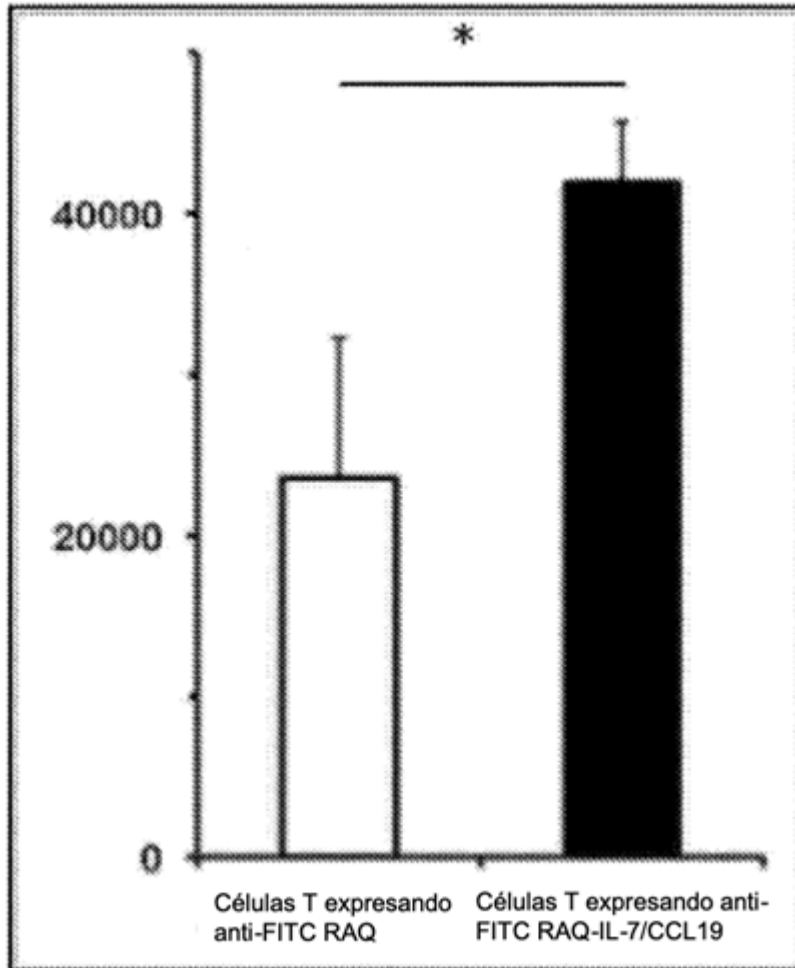
[Figura 10]



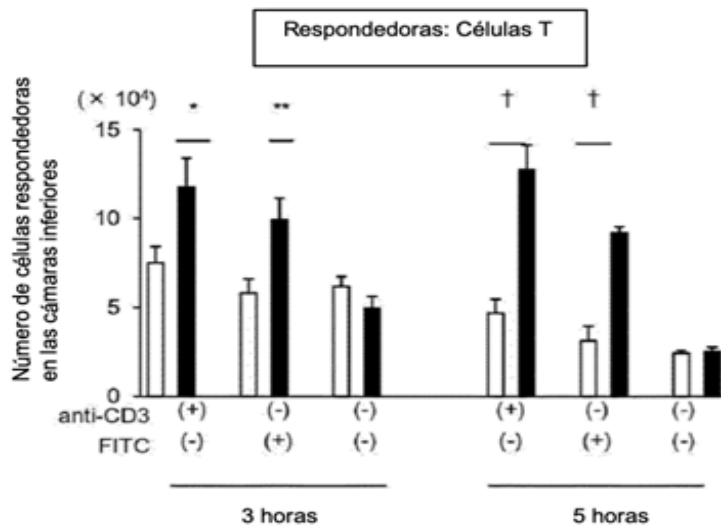
[Figura 11]



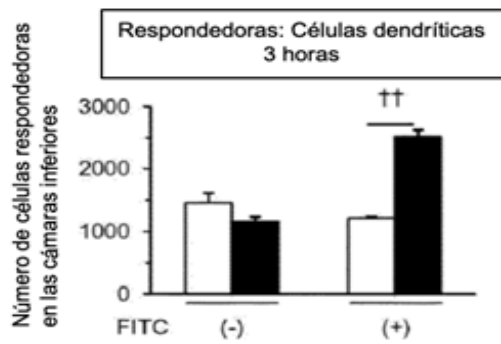
[Figura 12]



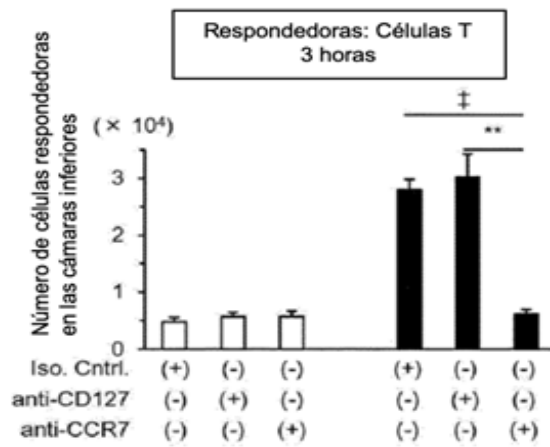
[Figura 13]



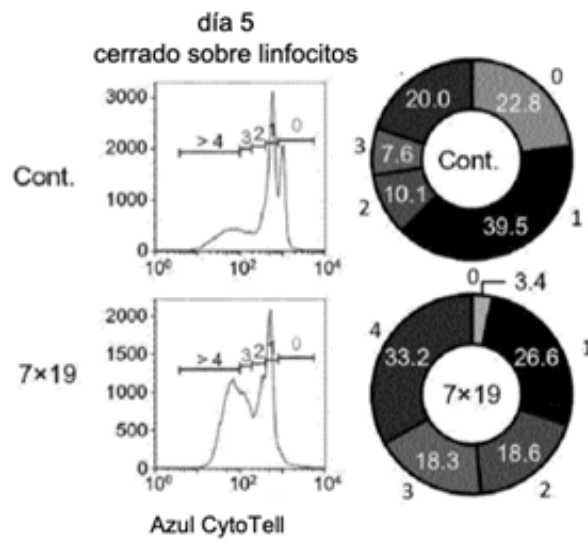
[Figura 14]



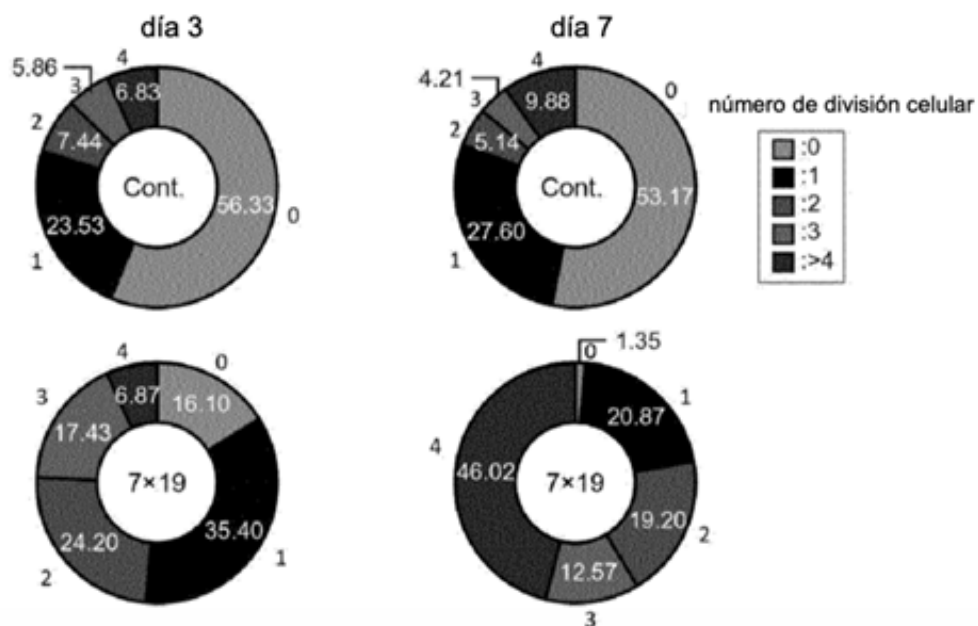
[Figura 15]



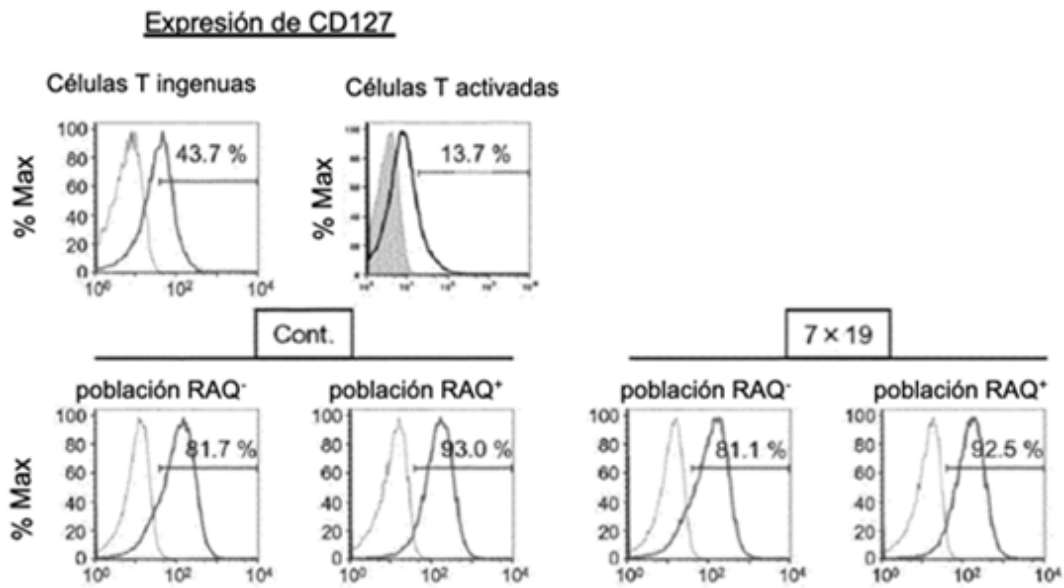
[Figura 16]



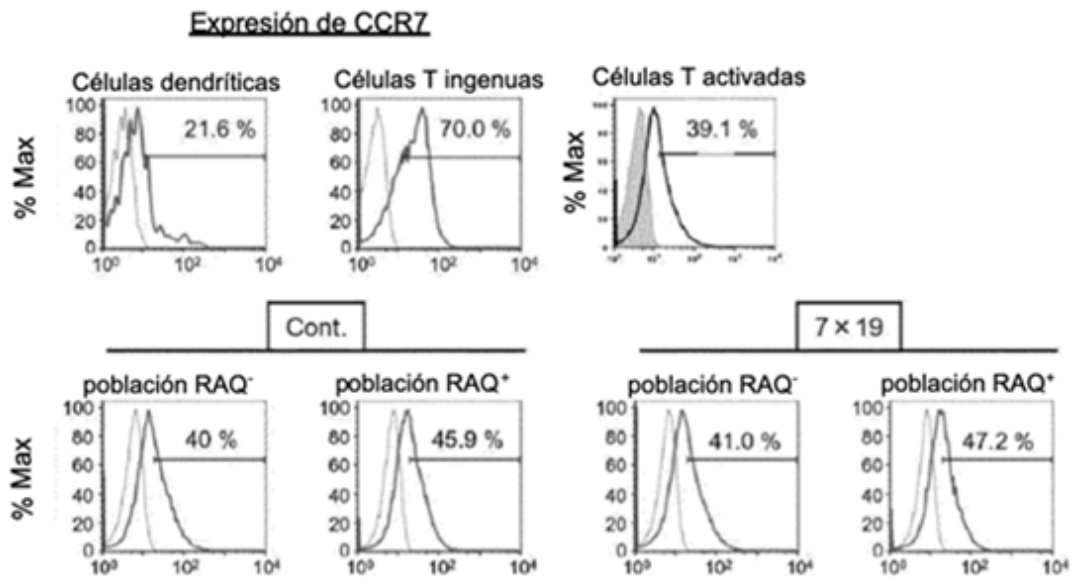
[Figura 17]



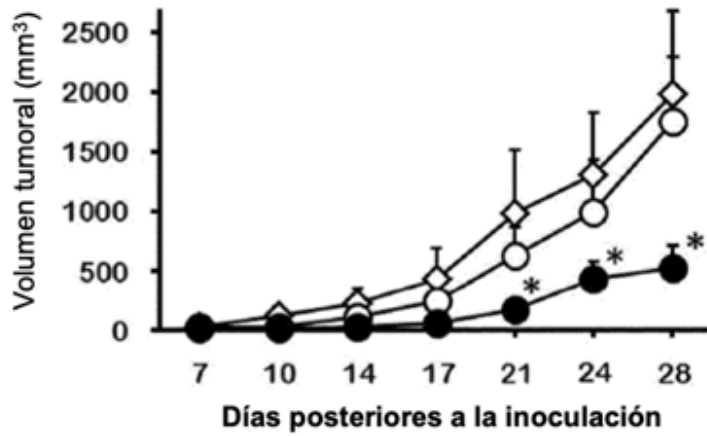
[Figura 18]



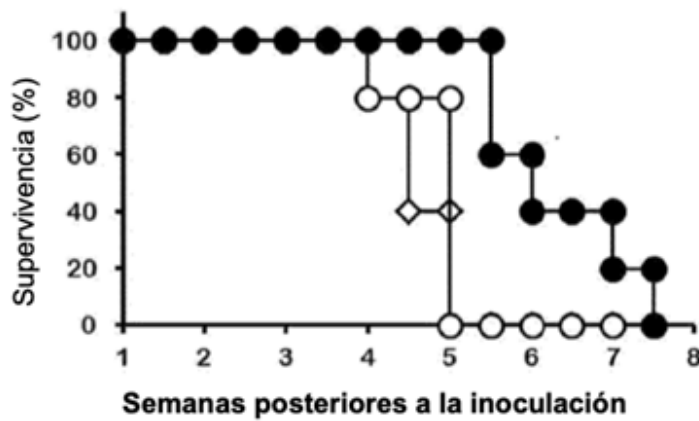
[Figura 19]



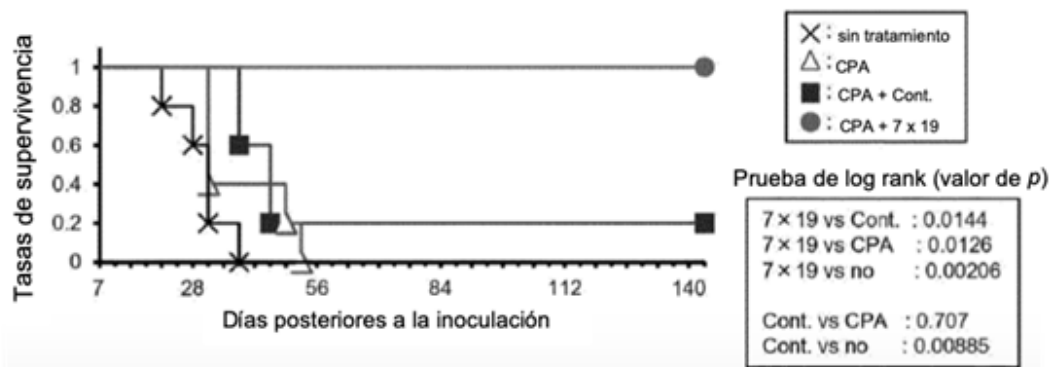
[Figura 20]



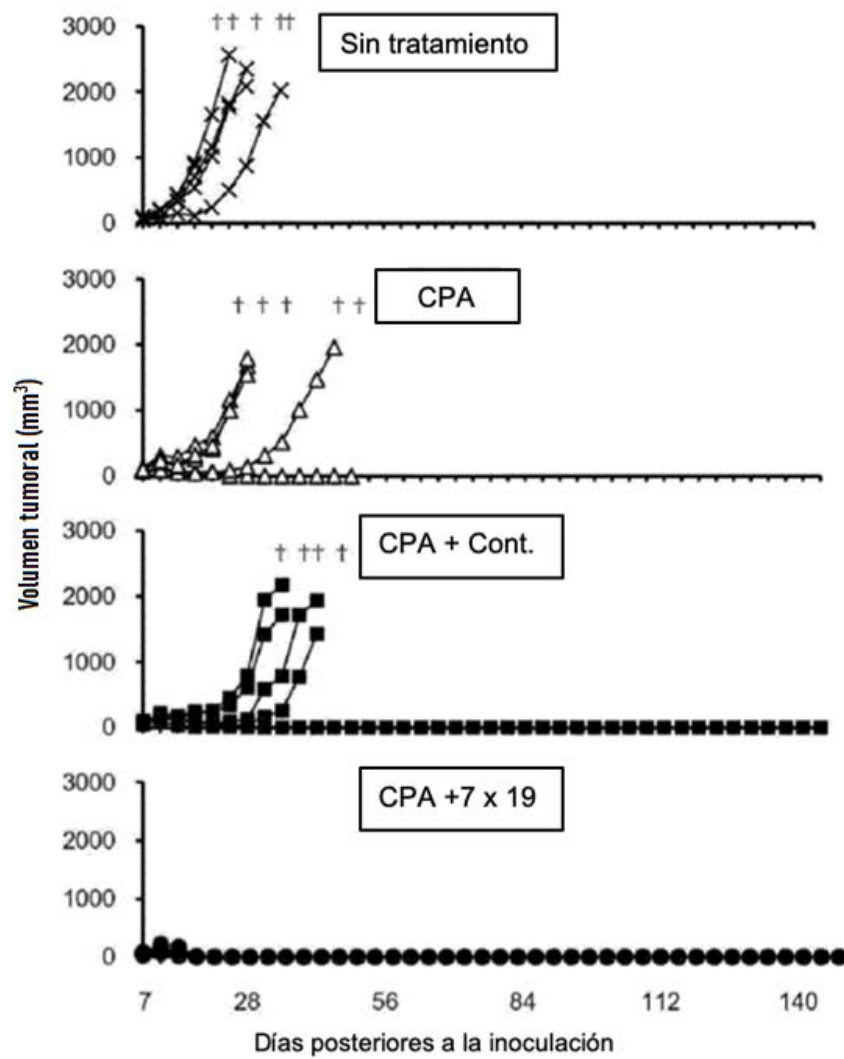
[Figura 21]



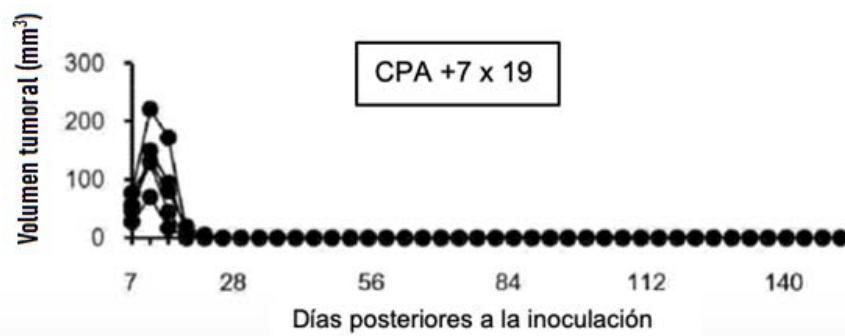
[Figura 22]



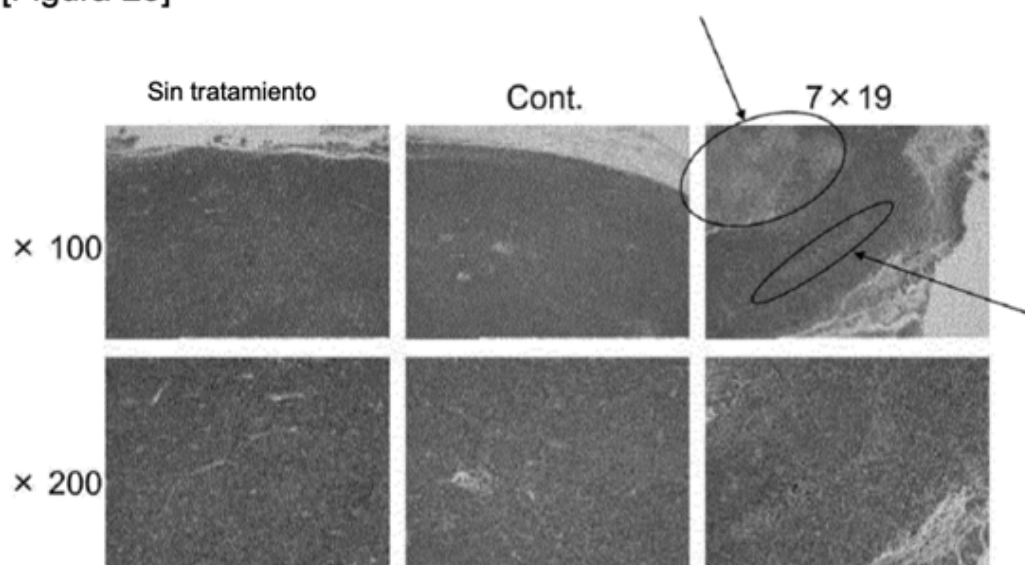
[Figura 23]



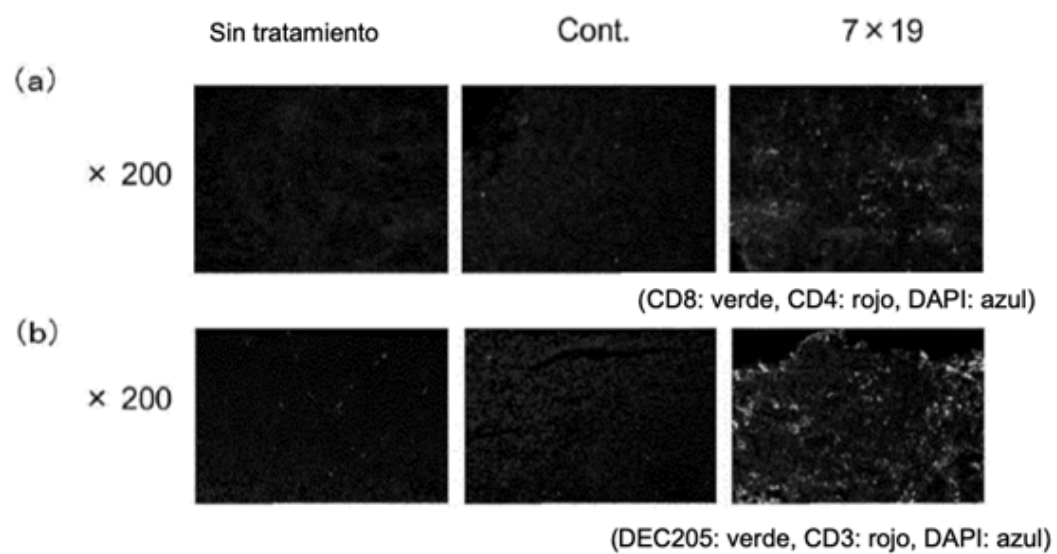
[Figura 24]



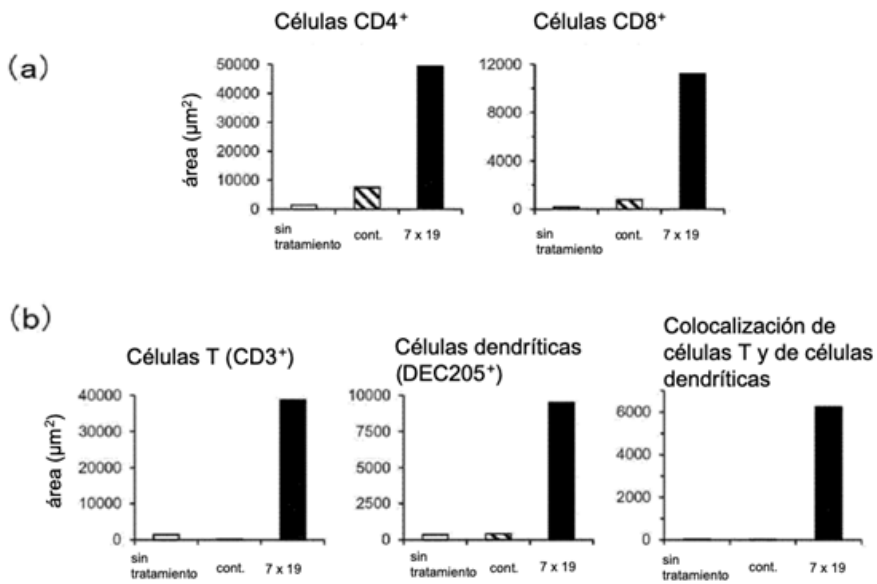
[Figura 25]



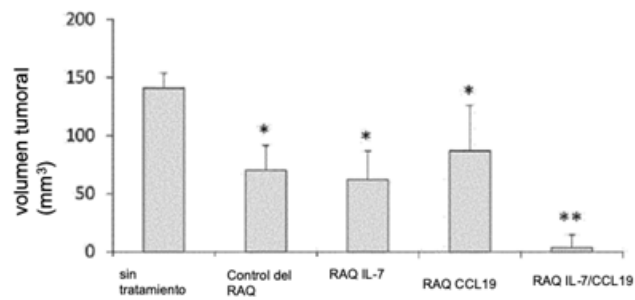
[Figura 26]



[Figura 27]



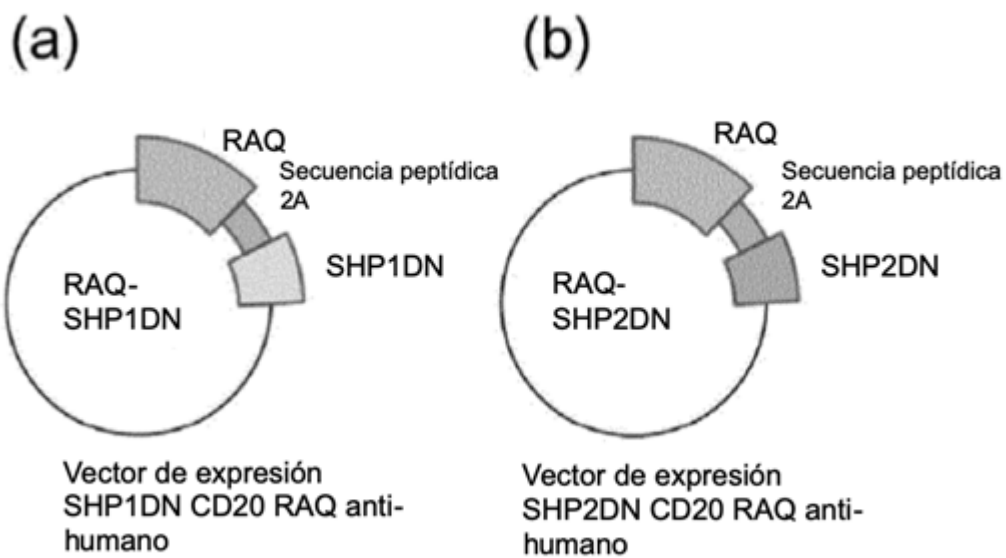
[Figura 28]



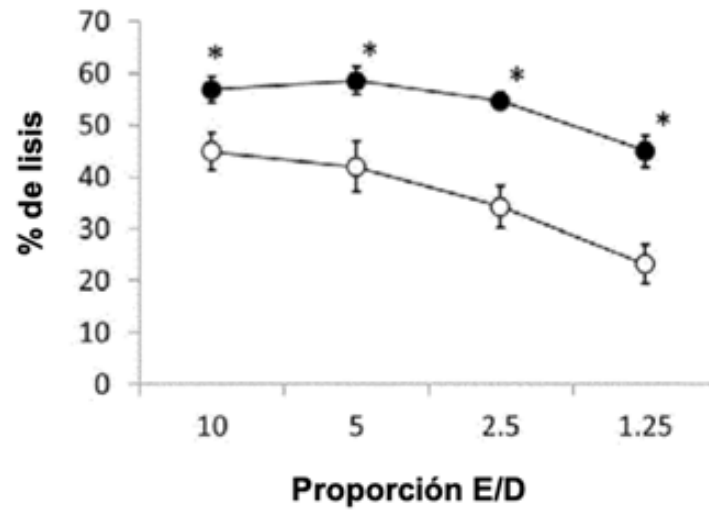
* Estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al comparar con el grupo sin tratamiento mediante la prueba t de student.

** Estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al comparar con los otros grupos mediante la prueba t de student.

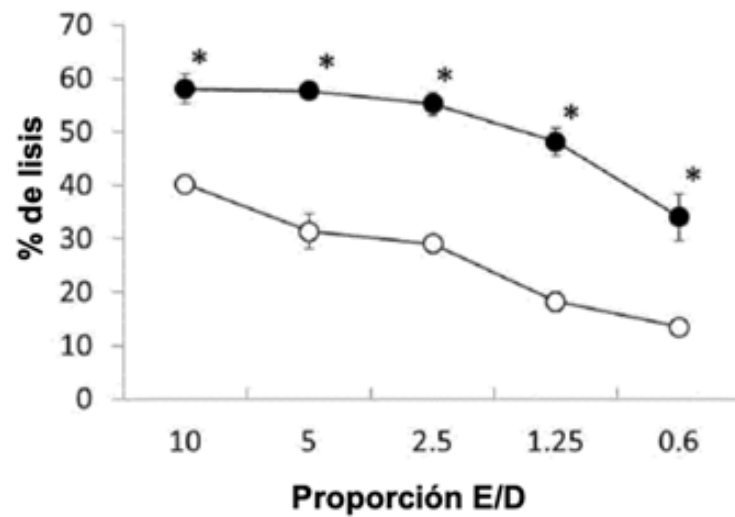
[Figura 29]



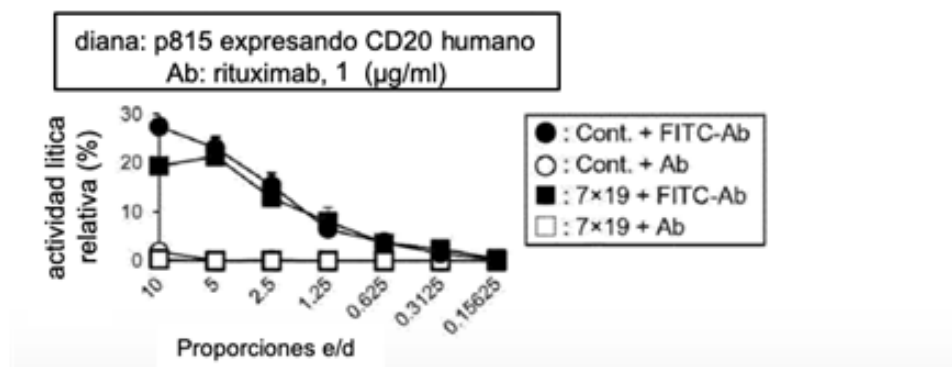
[Figura 30]
(a)



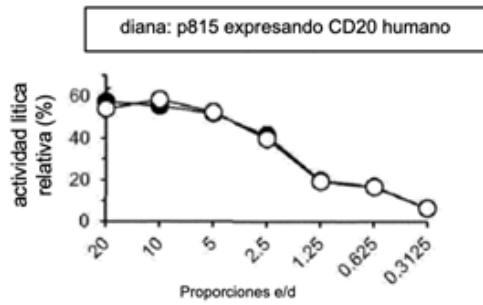
(b)



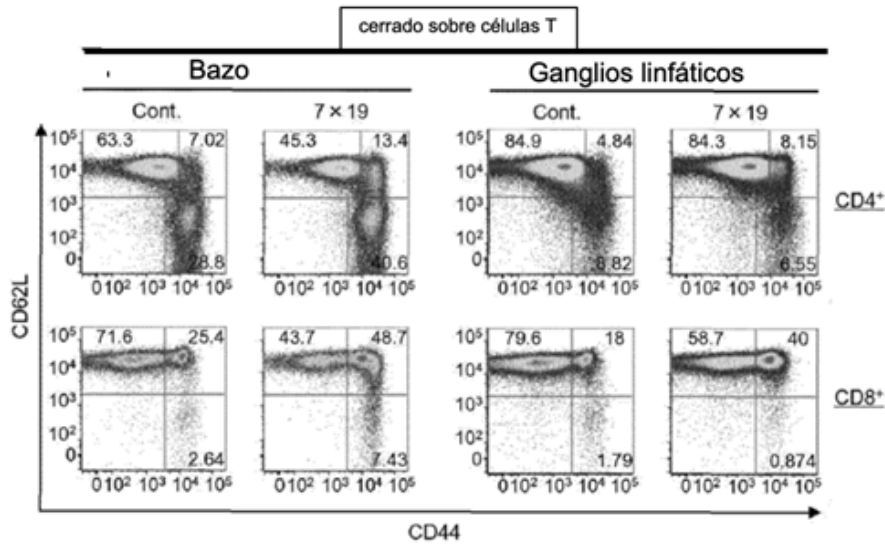
[Figura 31]



[Figura 32]



[Figura 33]



[Figura 34]

