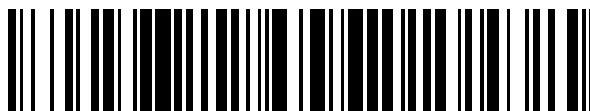


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 849**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2015** **PCT/US2015/014975**
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015** **WO15120363**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2015** **E 15746077 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 3105333**

54 Título: **Expresión de polipéptido químico con receptores de linfocitos variables en células inmunes y usos para tratar el cáncer**

30 Prioridad:

10.02.2014 US 201461938057 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2020

73 Titular/es:

EMORY UNIVERSITY (50.0%)
1599 Clifton Rd. NE 4th Floor
Atlanta, GA 30322, US y
CHILDREN'S HEALTHCARE OF ATLANTA, INC.
(50.0%)

72 Inventor/es:

SPENCER, H. TRENT;
DOERING, CHRISTOPHER B;
HERRIN, BRANTLEY R. y
COOPER, MAX DALE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 792 849 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

Expresión de polipéptido químico con receptores de linfocitos variables en células inmunes y usos para tratar el cáncer

5 Antecedentes

La quimioterapia es el estándar de atención para el tratamiento de muchos tipos de cáncer, y se necesitan métodos alternativos para tratar el cáncer en situaciones donde la quimioterapia no es efectiva. El sistema inmunitario humano a veces puede prevenir o retrasar el crecimiento de células cancerosas mediante el reconocimiento por las células T. Para mejorar la capacidad de las células inmunes de matar células cancerosas, las células T pueden aislarse de la sangre de un paciente y alterarse genéticamente para unirse específicamente a las proteínas expresadas en la superficie de las células cancerosas. Cuando se vuelven a colocar en el paciente, las células modificadas se dirigen de manera más eficiente a las células cancerosas. CD19 es una proteína expresada en células B cancerosas. Brentjens et al., informan que las células T alteradas para unirse a CD19 pueden inducir remisiones de cáncer en adultos con leucemia linfoblástica aguda refractaria a la quimioterapia. Sci Transl Med, 2013, 5 (177): 177ra38.

Los agentes de quimioterapia típicamente actúan matando las células cancerosas, pero también afectan a otras células circulantes tales como las células T. Dasgupta et al., informan la modificación de las células inmunes para hacerlas resistentes a los medicamentos contra el cáncer para prevenir la muerte de las células T y mejorar la muerte de las células tumorales durante la quimioterapia. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391 (1): 170-5.

Los seres humanos generan receptores antigénicos de células T y B principalmente mediante el ensamblaje de segmentos de genes V-(D)-J de Ig e hipermutación somática. Las lampreas y el pez bruja tienen un sistema alternativo que se basa en receptores de linfocitos variables (VLR), cuya diversidad se genera a partir de casetes de repetición ricos en leucina (LRR). Yu et al., informan la purificación e identificación de antígenos de la superficie celular usando anticuerpos monoclonales de lamprea. Immunol Methods, 2012, 386 (0): 43-49. Véase también Yu et al., A lamprey monoclonal VLR antibody recognizes a novel plasma cell antigen, The J of Immunol, 2013, 190, Abstract 114.11; Han et al., Antigen recognition by variable lymphocyte receptors, Science, 2008 321:1834-183; Hirano et al., The evolution of adaptive immunity in vertebrates, Adv Immunol, 2011, 109: 125-57; WO 2013/078425; US 2011/0230374; WO 2010/065407; y WO 2008/016854.

Las referencias citadas en el presente documento no son una admisión de la técnica anterior.

Resumen

La protección buscada para esta invención es como se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a la expresión celular recombinante de proteínas quiméricas con secuencias peptídicas derivadas de receptores de linfocitos y usos para tratar el cáncer. En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína quimérica con un segmento con una fracción de direccionamiento basada en un receptor de linfocitos variable (VLR) capaz de unir un antígeno asociado a un tumor y un segmento con una subunidad de transducción de señal de célula T. En ciertas realizaciones, los vectores recombinantes se usan en tratamientos contra el cáncer basados en inmunidad.

Los vectores recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una secuencia de direccionamiento del dominio del receptor de linfocitos variable, un dominio transmembrana, un dominio de molécula coestimuladora de células T y un componente de transducción de señales de un dominio del receptor de antígeno de célula T tal como CD3zeta (CD3Z).

En ciertas realizaciones, el dominio del receptor de linfocitos variable contiene una secuencia de polipéptidos de menos de 250 aminoácidos y 4 o 5 o más segmentos que tienen la secuencia XXLX₁LXX (SEQ ID NO: 1) en la que X puede ser cualquier aminoácido y L puede ser, individual e independientemente en cada caso, leucina o isoleucina u opcionalmente una L (leucina o isoleucina) puede ser sustituida con cualquier aminoácido.

En ciertas realizaciones, el receptor de linfocitos variable tiene una secuencia VXCXXXLXSV₁PAXIPTTTXXLXXXX₁NXITKXXPGVFDLXXLXXXXLXXNXLXXXPXGXFD (SEQ ID NO: 2) en la que X puede ser cualquier aminoácido.

En ciertas realizaciones, el receptor de linfocitos variable tiene una secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento tal como la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10 o una variante o una secuencia con más del 80, 85, 90, 95% de identidad con la mismas.

En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento tal como la SEQ ID NO: 3, 5, 7 o 9 o una variante o una secuencia con una identidad superior al 80, 85, 90, 95% con la mismas.

En ciertas realizaciones, la molécula coestimuladora se selecciona de CD28, CD80, CD86 o un fragmento o variante.

En ciertas realizaciones, el componente de transducción de señal del receptor de antígeno de células T comprende un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora con la secuencia de consenso YXXLXXXXXXXXXXYXXL (SEQ ID NO: 15) en la que X es cualquier aminoácido, L es leucina o isoleucina y opcionalmente una o dos X se eliminan opcionalmente.

En ciertas realizaciones, el vector recombinante comprende además una secuencia de interleucina tal como IL-2 o un fragmento o variante.

En ciertas realizaciones, el vector recombinante comprende además CD8 o un fragmento o variante.

En ciertas realizaciones, el vector recombinante comprende además un ácido nucleico que codifica una enzima que confiere resistencia al daño celular en presencia de un agente de quimioterapia.

En ciertas realizaciones, el vector recombinante comprende además un ácido nucleico que codifica metilguanina metiltransferasa (MGMT), dihidrofolato reductasa (DHFR), citidina desaminasa (CD) y una proteína resistente a múltiples fármacos (MDR-1) o variantes de los mismos.

En ciertas realizaciones, el vector recombinante comprende además un ácido nucleico que codifica la secuencia del receptor de linfocitos variable que se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor tal como CD5, CD19, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD152(CTLA-4), CD274(PD-L1), CD340(ErbB-2), GD2, TPBG, CA-125, CEA, MAGEA1, MAGEA3, MART1, GP100, MUC1, WT1, TAG-72, HPVE6, HPVE7, BING-4, SAP-1, receptor de laminina inmaduro, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) o receptor del factor de crecimiento epidérmico (ErbB-1).

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a células aisladas que comprenden el vector recombinante según se reivindica.

En ciertas realizaciones, las células aisladas se seleccionan de células T auxiliares, células T citotóxicas, células T asesinas naturales o células T $\gamma\delta$.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere al vector recombinante según se reivindica para su uso en un método de tratamiento del cáncer que comprende aislar células inmunes, por ejemplo, células T, células T gamma delta o células NK, y mezclando o transfiriendo un vector recombinante como se reivindica en las células en condiciones tales que el vector recombinante exprese en las células aisladas un polipéptido quimérico que comprende un dominio receptor de linfocitos variable, un dominio de molécula transmembrana, un dominio de molécula coestimuladora de células T y un componente de transducción de señal del dominio del receptor de antígeno de células T que proporciona células inmunes modificadas, células T, células T gamma delta o células NK; e implantar las células inmunes modificadas, células T, células T gamma delta o células NK en un sujeto que las necesite.

En ciertas realizaciones, el vector recombinante codifica una enzima que confiere resistencia al daño celular en presencia de un agente de quimioterapia, y una cantidad efectiva del agente de quimioterapia se administra al sujeto antes, durante o después de implantar las células en el sujeto.

En ciertas realizaciones, las células inmunes aisladas, células T, células T gamma delta o células NK se aíslan del sujeto para recibir las células modificadas implantadas.

En ciertas realizaciones, el cáncer se selecciona de neuroblastoma, glioblastoma, glioma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, leucemia, linfoma o melanoma.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a polipéptidos recombinantes, vectores recombinantes que comprenden ácidos nucleicos que codifican polipéptidos reportados en el presente documento y sistemas de expresión para producir esos polipéptidos. En particular, la invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO: 4, 6, 8 o 10, en el que el extremo terminal amino o el extremo terminal carboxilo de la secuencia de aminoácidos están unidos opcionalmente a una secuencia de aminoácidos heteróloga, marcador o molécula reportera. La invención también se refiere a un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido según se reivindica y una célula inmune que comprende el vector recombinante según se reivindica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A ilustra un ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) que codifica el receptor de linfocitos variable que se une a las células de neuroblastoma (clon 4 del VLR).

La Figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) del receptor de linfocitos variable traducido por el ácido nucleico en la Figura 1A.

La Figura 1C ilustra un ácido nucleico (SEQ ID NO: 5) que codifica un receptor de linfocitos variable que se une a las células de neuroblastoma (clon 18 del VLR).

La Figura 1D muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) del receptor de linfocitos variable traducido por el ácido nucleico en la Figura 1C.

5 La Figura 1E ilustra un ácido nucleico (SEQ ID NO: 7) que codifica el receptor de linfocitos variable que se une a las células de neuroblastoma (clon 19 del VLR).

La Figura 1F muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) del receptor de linfocitos variable traducido por el ácido nucleico en la Figura 1E.

10 La Figura 2A muestra una secuencia del VLR de codón optimizado (SEQ ID NO: 9) que codifica una proteína que se muestra que se une a CD5, el CAR que expresa esta proteína se puede usar para tratar tumores malignos de células T.

La Figura 2B muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) del receptor de linfocitos variable traducido por el ácido nucleico en la Figura 2A.

15 La Figura 3 ilustra un método para generar secuencias de VLR-CAR. Se aíslan muestras de tumor o líneas celulares tumorales (por ejemplo, neuroblastoma, células B, células T) de un paciente, por ejemplo, diagnosticado con leucemia y se inyectan en una lamprea. Los VLR específicos de tumor se identifican y se clonan en un casete del receptor de antígeno quimérico dentro de un vector lentiviral. SP se refiere al péptido señal y LTR se refiere a la repetición terminal larga. El vector se transduce en células inmunes (células T, células asesinas naturales) y se reintroduce en el mismo paciente o en otro diferente.

20 La Figura 4A muestra datos del proceso de cribado usando ensayos de presentación en levadura para el aislamiento de un VLR antitumoral específicamente para neuroblastoma. Los neuroblastomas clasificados por MACS se proporcionan en el cuadrante superior derecho (clasificación FACS). Las colonias se colocan en placas con agar, se secuencian y se clonan en un casete del CAR.

25 La Figura 4B muestra datos que evidencian la activación de células T después de la transducción usando el vector lentiviral que contiene el casete clonado de la Figura 4A.

La Figura 5 muestra un esquema del vector lentiviral utilizado para transducir células T y medir la expresión de VLR-CAR. Los anticuerpos contra el marcador Myc se usan para mostrar la expresión de la superficie celular de VLR-CAR. La Figura 6A muestra un recuento celular frente a la expresión de el marcador Myc (es decir, la expresión de VLR-CAR en la superficie celular) de células Jurkat sin modificar por FACS.

30 La Figura 6B muestra datos en los que las células Jurkat se transdujeron a una MOI 2 con el vector lentiviral mostrado en la Figura 5 y en el que las células genéticamente modificadas se identificaron para la expresión del receptor de antígeno quimérico utilizando el marcador Myc.

35 La Figura 6C muestra datos en los que las células Jurkat se transdujeron a una MOI 10 con el vector lentiviral mostrado en la Figura 5 y en el que las células genéticamente modificadas se identificaron para la expresión del receptor de antígeno quimérico utilizando el marcador Myc.

La Figura 7A muestra células Jurkat sin modificar cocultivadas con células BCL, y la activación de células T se controla por expresión de CD69.

40 La Figura 7B muestra células Jurkat transducidas con BCL-VLR-CAR cocultivadas con células BCL, transducidas a MOI 2. Las células Jurkat transducidas se incubaron con la línea celular BCL que expresa el receptor de células B objetivo y se monitorizaron mediante expresión de CD69 como una medida de activación de células T.

La Figura 7C muestra células Jurkat transducidas con BCL-VLR-CAR cocultivadas con células BCL, transducidas a MOI 10 y monitorizadas por expresión de CD69 como una medida de activación de células T.

45 La Figura 8A muestra células Jurkat transducidas con CD5-VLR-CAR activadas por células que expresan CD5 (tal como se mide por la expresión de CD69).

La Figura 8B muestra que las células que expresan GFP (control) en lugar del CD5-VLR-CAR, transducidas de manera similar a la de la Figura 8A, no se activan como se controla por la expresión de CD69.

La Figura 9A ilustra una realización de esta divulgación.

La Figura 9B ilustra una realización de esta divulgación.

50 Descripción detallada

Antes de que la presente divulgación se describa con mayor detalle, debe entenderse que esta divulgación no se limita a las realizaciones particulares descritas, y como tal, por supuesto, puede variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente divulgación estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

60 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia al que pertenece esta divulgación. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento también se puede usar en la práctica o prueba de la presente divulgación, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

65 La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente divulgación no tiene derecho a anteceder dicha publicación en virtud de la divulgación previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas podrían ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Como será evidente para los expertos en la materia al leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en este documento tiene componentes y características discretas que pueden separarse fácilmente o combinarse con las características de cualquiera de las otras diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la presente divulgación. Cualquier método mencionado se puede llevar a cabo en el orden de los eventos mencionados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Las realizaciones de la presente divulgación emplearán, a menos que se indique lo contrario, técnicas de inmunología, medicina, química orgánica, bioquímica, biología molecular, farmacología, fisiología y similares, que están dentro de las posibilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura.

Debe observarse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que se definirán para tener los siguientes significados, a menos que sea evidente una intención contraria.

Antes de describir las diversas realizaciones, se proporcionan las siguientes definiciones y deben usarse a menos que se indique lo contrario.

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos y se usan indistintamente. Un polipéptido o polinucleótido heterólogo se refiere a un polipéptido o polinucleótido derivado de una fuente o especie diferente. Por ejemplo, un polipéptido quimérico que comprende una secuencia de direccionamiento se refiere a una proteína de fusión en la cual la secuencia de direccionamiento está unida a un polipéptido diferente no asociado con la proteína natural de la que se deriva la secuencia de direccionamiento. Un polipéptido quimérico se refiere al enlace covalente de dos polipéptidos distintos heterólogos entre sí. El enlace puede ser, por ejemplo, por medios químicos o recombinantes. En algunos casos, el enlace es químico, en el que una reacción entre la fracción del anticuerpo y el compañero de fusión ha producido un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula. Se puede incluir opcionalmente un conector peptídico (secuencia peptídica corta), por ejemplo, entre la secuencia de direccionamiento y el polipéptido heterólogo.

Los términos "variante" y "mutante" cuando se usan en referencia a un polipéptido se refieren a una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más aminoácidos de otro, generalmente un polipéptido relacionado. Las variantes pueden estar en forma de fragmentos funcionales que pueden tener más de 25, 50 o 100 aminoácidos y, en algunos casos, menos de 100, 150 o 200 aminoácidos. La variante puede tener cambios "conservadores", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares. Un tipo de sustituciones conservadoras de aminoácidos se refiere a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas son glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas con hidroxilo son serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida son asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas son fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas son lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y metionina. Los grupos conservadores preferidos de sustitución de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Más raramente, una variante puede tener cambios "no conservadores" (por ejemplo, reemplazo de una glicina con un triptófano). Variaciones menores similares también pueden incluir eliminaciones o inserciones de aminoácidos (en otras palabras, adiciones), o ambas. Se puede encontrar orientación para determinar qué y cuántos residuos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o eliminar sin abolir la actividad biológica utilizando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTar. Las variantes se pueden probar en ensayos funcionales. Las variantes preferidas tienen menos del 10%, y preferiblemente menos del 5%, y aún más preferiblemente menos del 2% de cambios (ya sean sustituciones, eliminaciones, etc.).

El término "ácido nucleico" se refiere a un polímero de nucleótidos, o un polinucleótido, como se describió anteriormente. El término se usa para designar una sola molécula, o una colección de moléculas. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y pueden incluir regiones de codificación y regiones de diversos elementos de control, como se describe a continuación.

El término "una secuencia de ácido nucleico que codifica" un polipéptido especificado se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende la región codificante de un gen o, en otras palabras, la secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico. La región de codificación puede estar presente en forma de ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en forma de ADN, el oligonucleótido, el polinucleótido o el ácido nucleico pueden ser monocatenarios (es decir, la cadena sentido) o bicatenarios. Los elementos de control adecuados, tales como potenciadores/promotores, uniones de empalme, señales de poliadenilación, etc., se pueden colocar cerca de la región de codificación del gen si es necesario para permitir el inicio adecuado de la transcripción y/o el procesamiento correcto del transcrito de ARN primario. Alternativamente, la región de codificación utilizada en los vectores de expresión de la presente descripción puede contener potenciadores/promotores endógenos, uniones de empalme, secuencias

intermedias, señales de poliadenilación, etc., o una combinación de elementos de control tanto endógenos como exógenos.

El término "recombinante" cuando se usa en referencia a una molécula de ácido nucleico se refiere a una molécula de ácido nucleico que está compuesta de segmentos de ácido nucleico unidos entre sí mediante técnicas de biología molecular. El término "recombinante" cuando se usa en referencia a una proteína o un polipéptido se refiere a una molécula de proteína que se expresa usando una molécula de ácido nucleico recombinante. El término ácido nucleico recombinante se distingue de los recombinantes naturales que resultan del cruce entre cromosomas homólogos. Los ácidos nucleicos recombinantes como se usan en el presente documento son una unión no natural de ácidos nucleicos de fuentes no homólogas, generalmente de diferentes organismos.

Los términos "vector" o "vector de expresión" se refieren a un ácido nucleico recombinante que contiene una secuencia de codificación deseada y las secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia de codificación operativamente unida en un organismo huésped particular o sistema de expresión, por ejemplo, celular o sin células. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariotas generalmente incluyen un promotor, un operador (opcional) y un sitio de unión a ribosomas, a menudo junto con otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de terminación y poliadenilación.

Los "sistemas de expresión" de proteínas se refieren a sistemas *in vivo* e *in vitro* (sin células). Los sistemas para la expresión de proteínas recombinantes utilizan típicamente células que transfectan con un vector de expresión de ADN que contiene la plantilla. Las células se cultivan en condiciones tales que traducen la proteína deseada. Las proteínas expresadas se extraen para su posterior purificación. Los sistemas de expresión de proteínas *in vivo* que usan células procariotas y eucariotas son bien conocidos. Además, algunas proteínas se recuperan usando desnaturalizantes y procedimientos de replegamiento de proteínas. Los sistemas de expresión de proteínas *in vitro* (sin células) generalmente usan extractos compatibles de traducción de células enteras o composiciones que contienen componentes suficientes para la transcripción, traducción y opcionalmente modificaciones postraduccionales tales como ARN polimerasa, factores proteicos reguladores, factores de transcripción, ribosomas, cofactores de ARNt, aminoácidos y nucleótidos. En presencia de vectores de expresión, estos extractos y componentes pueden sintetizar proteínas de interés. Los sistemas libres de células generalmente no contienen proteasas y permiten la marcación de la proteína con aminoácidos modificados. Algunos sistemas libres de células incorporaron componentes codificados para la traducción en el vector de expresión. Véase, por ejemplo, Shimizu et al., Cell-free translation reconstituted with purified components, 2001, Nat. Biotechnol., 19, 751-755 y Asahara & Chong, Nucleic Acids Research, 2010, 38 (13): e141.

Un "marcador seleccionable" es un ácido nucleico introducido en un vector recombinante que codifica un polipéptido que confiere un rasgo adecuado para la selección o identificación artificial (gen informador), por ejemplo, la beta-lactamasa confiere resistencia a los antibióticos, lo que permite que un organismo exprese beta-lactamasa para sobrevivir en presencia de antibióticos en un medio de crecimiento. Otro ejemplo es la timidina quinasa, que hace que el huésped sea sensible a la selección de ganciclovir. Puede ser un marcador cribable que permite distinguir entre las células deseadas y no deseadas en función de la presencia o ausencia de un color esperado. Por ejemplo, el gen lac-z produce una enzima beta-galactosidasa que confiere un color azul en presencia de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido). Si la inserción recombinante inactiva el gen lac-z, entonces las colonias resultantes son incoloras. Puede haber uno o más marcadores seleccionables, por ejemplo, una enzima que puede complementar la incapacidad de un organismo de expresión para sintetizar un compuesto particular requerido para su crecimiento (auxotrófico) y uno capaz de convertir un compuesto en otro que sea tóxico para el crecimiento. URA3, una orotidina-5' fosfato descarboxilasa, es necesaria para la biosíntesis de uracilo y puede complementar a los mutantes de ura3 que son auxotróficos para uracilo. URA3 también convierte el ácido 5-fluoroorótico en el compuesto tóxico 5-fluorouracilo. Los marcadores seleccionables adicionales contemplados incluyen cualquier gen que imparta resistencia antibacteriana o exprese una proteína fluorescente. Los ejemplos incluyen, entre otros, los siguientes genes: el gen *amp^r*, *cam^r*, *tet^r*, *blastidicin^r*, *neo^r*, *hyg^r*, *abx^r*, neomicina fosfotransferasa tipo II (*nptII*), p-glucuronidasa (*gus*), proteína fluorescente verde (*gfp*), *egfp*, *yfp*, mCherry, p-galactosidasa (*lacZ*), *lacZa*, *lacZAM15*, cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*), fosfatasa alcalina (*phoA*), luciferasa bacteriana (*luxAB*), gen de resistencia a bialafos (*bar*), fosfomanosa isomerasa (*pmi*), xilosa isomerasa (*xylA*), arabitol deshidrogenasa (*atID*), UDP-glucosa:galactosa-1-fosfato uridiltransferasa I (*galT*), subunidad α insensible a la retroalimentación de antranilato sintasa (OASA1D), 2-desoxiglucosa (2-DOGR), benciladenina-N-3-glucurónido, treonina desaminasa de *E. coli*, glutamato 1-semialdehído aminotransferasa (GSA-AT), D-amino acidoxidasa (DAAO), gen de tolerancia a la sal (*rstB*), proteína similar a ferredoxina (*pflp*), gen de trehalosa-6-P sintasa (ATPS1), lisina racemasa (*lyr*), dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*), triptófano sintasa beta 1 (AtTSB1), deshalogenasa (*dhla*), gen de la manosa-6-fosfato reductasa (M6PR), higromicina fosfotransferasa (HPT) y D-serina amoníacoliase (*dsdA*).

En ciertas realizaciones, la "identidad" de secuencia se refiere al número de aminoácidos que coinciden exactamente (expresada como un porcentaje) en un alineamiento de secuencia entre dos secuencias del alineamiento calculadas usando el número de posiciones idénticas dividido por el mayor de la secuencia más corta o el número de posiciones equivalentes excluyendo salientes en las que los espacios internos se cuentan como una posición equivalente. Por ejemplo, los polipéptidos GGGGGG y GGGGT tienen una identidad de secuencia de 4 de 5 u 80%. Por ejemplo, los polipéptidos GGGPPP y GGGAPPP tienen una identidad de secuencia de 6 de 7 u 85%. En ciertas realizaciones,

cualquier mención de identidad de secuencia expresada en el presente documento puede ser sustituida por la similitud de secuencia. El porcentaje de "similitud" se utiliza para cuantificar la similitud entre dos secuencias de la alineación. Este método es idéntico a determinar la identidad, excepto que ciertos aminoácidos no tienen que ser idénticos para tener una coincidencia. Los aminoácidos se clasifican como coincidencias si se encuentran entre un grupo con propiedades similares de acuerdo con los siguientes grupos de aminoácidos: Aromático: F Y W; hidrófobo: A V I L; Cargado positivamente: R K H; Cargado negativamente: D E; Polar: S T N Q.

"Se une específicamente" se refiere a la capacidad de un agente de unión específico (tal como un VLR o fragmento del mismo) de la presente divulgación para reconocer y unir polipéptidos objetivo maduros, de longitud completa o de longitud parcial (en el presente documento antígeno asociado a tumor), o un ortólogo del mismo, de modo que su afinidad (según lo determinado, por ejemplo, por ELISA de afinidad o los ensayos descritos en el presente documento) es al menos 10 veces mayor, pero opcionalmente 50 veces mayor, 100, 250 o 500 veces mayor, o incluso al menos 1000 veces mayor que la afinidad del mismo por un polipéptido aleatorio de hidrofobicidad general similar.

Un "marcador" se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente a otra molécula, tal como un anticuerpo o una proteína, para facilitar la detección de esa molécula. Ejemplos específicos y no limitantes de marcadores incluyen marcadores fluorescentes, enlaces enzimáticos e isótopos radiactivos. En un ejemplo, un "receptor marcador" se refiere a la incorporación de un polipéptido heterólogo en el receptor. Un marcador incluye la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión covalente de fracciones de biotín a un polipéptido que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). Varios métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas son conocidos en la técnica y pueden usarse. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, entre otros, los siguientes: radioisótopos o radionucleótidos (tales como ³⁵S o ¹³¹I) marcadores fluorescentes (tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (tales como peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotín, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un informador secundario (tal como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos) o agentes magnéticos, tales como los quelatos de gadolinio. En algunas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

Receptor de linfocitos variable

Los vertebrados sin mandíbula, la lamprea y el pez bruja tienen un sistema inmunitario adaptativo compuesto por linfocitos clonalmente diversos que expresan receptores de linfocitos variables (VLR). El gen VLRB de la línea germinal está incompleto, y consiste en regiones constantes invariantes 5' y 3' separadas por una secuencia intermedia no codificante. La región constante 5' codifica un péptido señal y parte del LRR del extremo terminal N (LRR-NT). La región constante 3' codifica para una porción de la LRR-CT y una región de tallo invariante. El gen incompleto de la línea germinal está flanqueado por cientos de segmentos parciales del gen LRR. En los linfocitos en desarrollo, los segmentos que flanquean al gen LRR se copian aleatoria y secuencialmente en el gen VLRB incompleto. A medida que cada segmento del gen LRR se copia en el locus, reemplaza una parte de la secuencia interviniente. El mecanismo de ensamblaje continúa hasta que toda la secuencia interviniente se reemplaza con módulos LRR y se expresa un VLRB funcional. El ensamblaje del gen VLRB ocurre en un solo alelo, de modo que cada linfocito expresa un gen VLRB.

El gen VLRB maduro codifica para una proteína en forma de media luna, con diversidad de secuencia de aminoácidos concentrada en la superficie cóncava. La superficie cóncava está compuesta de cadenas β paralelas y un bucle variable del extremo terminal C. Cada subunidad LRR contribuye con una cadena β y cada cadena β tiene cinco posiciones de aminoácidos variables. Los anticuerpos VLRB también tienen números variables de subunidades LRR. Los anticuerpos VLRB más pequeños tienen 4 subunidades LRR y los más grandes tienen 11 subunidades LRR. Cada subunidad LRR aumenta la curvatura de la superficie cóncava y aumenta el área de la superficie cóncava. El LRR del extremo terminal C, LRR-CT, codifica un bucle de longitud variable y composición de secuencia que se proyecta por encima de la superficie cóncava. La inmunización con antígenos particulados, tales como el exosporio de *Bacillus anthracis* o eritrocitos humanos (RBC), induce a las células VLRB+ que se unen a los antígenos para proliferar y diferenciarse en plasmacitos. Los plasmacitos secretan anticuerpos VLRB multivalentes que circulan en la sangre. Cada anticuerpo VLRB secretado se compone de cadenas de polipéptidos VLRB idénticas dispuestas en un pentámero o tetrámero de dímeros que se mantienen unidos mediante enlaces disulfuro en el extremo terminal C de la región del tallo flexible e invariante. Debido a esta multivalencia, los anticuerpos VLRB se unen a sus antígenos con gran avidez.

Los ADNc de VLRB expresados en líneas de células de mamífero (células HEK-293T y CHO) se secretan en el sobrenadante del cultivo de tejidos como anticuerpos multivalentes unidos por disulfuro, tales como VLRB *in vivo*. Para aislar clones de VLRB específicos de antígeno, se prepara una biblioteca de ADNc de VLRB a partir de los linfocitos de lampreas inmunizadas. Los ADNc de VLRB se transfectan en HEK-293T, y los sobrenadantes de cultivo de tejidos que contienen VLRB se criban para la unión al antígeno.

Yu et al., informan la generación de paneles de anticuerpos monoclonales del VLR a partir de larvas de lamprea inmunizadas con células T humanas y el uso de un anticuerpo del VLR recombinante monoclonal para la purificación de antígenos y la identificación por espectrometría de masas. Véase J Immunol Methods, 2012, 386 (1-2): 43-9 titulado "Purification and identification of cell surface antigens using lamprey monoclonal antibodies".

En ciertas realizaciones, los vectores recombinantes contemplados comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una secuencia de direccionamiento de dominio del receptor de linfocitos variable, un dominio transmembrana, un dominio de molécula coestimuladora de células T y un componente de transducción de señal de un dominio del receptor de antígeno de células T.

Los receptores de linfocitos variables típicamente contienen una secuencia LRR del extremo terminal N, una secuencia LRR del extremo terminal C y múltiples módulos LRR interiores de aproximadamente 12-25 aminoácidos. La secuencia LRR del extremo terminal C típicamente contiene un bucle variable (inserción altamente variable). Dentro de los módulos LRR interiores, siete aminoácidos contienen típicamente una o dos leucinas o isoleucinas, si son dos, separadas por un solo aminoácido, por ejemplo, (SEQ ID NO: 1) XXLXLXX, que generalmente se encuentran en la superficie cóncava, en la que X puede ser cualquier aminoácido y L puede ser leucina o isoleucina. En algunos casos, una L (leucina o isoleucina) puede ser sustituida con cualquier aminoácido.

En ciertas realizaciones, el dominio del receptor de linfocitos variable contiene una secuencia de polipéptidos de menos de 250 aminoácidos y 4 o 5 o más segmentos que tienen la secuencia XXLXLXX (SEQ ID NO: 1) en la que X puede ser cualquier aminoácido y L puede ser, individualmente e independientemente en cada caso, leucina o isoleucina o una L (leucina o isoleucina) puede ser sustituida con cualquier aminoácido.

En ciertas realizaciones, el receptor de linfocitos variable tiene una secuencia VXCXXXLXSVPAXIPTTTXXLXXXX NXITKXXPGVFDLXXLXXXXLXXNLXXXPXGXFD (SEQ ID NO: 2) en la que X puede ser cualquier aminoácido.

Se considera que cualquiera de las variantes de receptores de linfocitos variables divulgadas en el presente documento es aquella que tienen una secuencia de aminoácidos alterada, por ejemplo, sustituciones, eliminaciones, inserciones de aminoácidos o combinaciones de los mismos en las que la secuencia alterada mantiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno de interés. Las sustituciones, eliminaciones, inserciones pueden o no estar dentro de los 4 o 5 segmentos que tienen la SEQ ID NO: 1 o un segmento que tiene la SEQ ID NO: 2.

Las variantes pueden contener 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos. Las variantes de SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8 o 10 pueden contener 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden o no estar dentro de los 4 o 5 segmentos que tienen la SEQ ID NO: 1. Las sustituciones variantes pueden ser sustituciones conservadas. Los aminoácidos pueden ser sustituciones conservadas si están entre un grupo con propiedades similares de acuerdo con los siguientes grupos de aminoácidos: Aromático: F Y W; hidrófobo: A V I L; Cargados positivamente: R K H; Cargados negativamente: D E; Polares: S T N Q.

Las variantes pueden contener 1, 2 o 3 eliminaciones de aminoácidos. Las variantes de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8 o 10 pueden contener 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 eliminaciones de aminoácidos. Las eliminaciones pueden ser eliminaciones terminales, por ejemplo, comenzando desde el primer aminoácido del extremo terminal N hacia adentro o el último aminoácido del extremo terminal C. Las eliminaciones pueden ser eliminaciones interiores, por ejemplo, entre el primer aminoácido del extremo terminal N identificado en la SEQ ID NO y el último aminoácido del extremo terminal C. Las eliminaciones pueden no estar dentro de los 4 o 5 segmentos que tienen la SEQ ID NO: 1.

Las variantes pueden contener 1, 2 o 3 adiciones de aminoácidos. Las variantes de la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8 o 10 pueden contener 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 adiciones de aminoácidos. Las adiciones pueden ser adiciones terminales, por ejemplo, comenzando desde el primer aminoácido del extremo terminal N hacia afuera o el último aminoácido del extremo terminal C. Las adiciones pueden ser eliminaciones interiores, por ejemplo, entre el primer aminoácido del extremo terminal N identificado en la SEQ ID NO y el último aminoácido del extremo terminal C. Las eliminaciones pueden no estar dentro de los 4 o 5 segmentos que tienen la SEQ ID NO: 1.

Un experto en la materia podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido como se expone en el presente documento usando técnicas bien conocidas. Un experto en la materia puede identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad dirigiéndose a regiones que no se consideran importantes para la actividad. Se pueden identificar residuos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. Incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a sustituciones conservadoras de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar negativamente la estructura del polipéptido.

Además, un experto en la materia puede revisar estudios de estructura-función que identifiquen residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de tal comparación, se puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a los residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o estructura en proteínas similares. Un experto en la materia puede

optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales residuos de aminoácidos importantes pronosticados.

Un experto en la materia también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de dicha información, un experto en la materia puede predecir la alineación de los residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. Un experto en la materia puede optar por no hacer cambios radicales en los residuos de aminoácidos que se predice que están en la superficie de la proteína, ya que dichos residuos pueden estar involucrados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la materia puede generar variantes de prueba que contienen una única sustitución de aminoácidos en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes pueden cribarse luego usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la materia. Dichas variantes podrían usarse para recopilar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular da como resultado una actividad destruida, indeseablemente reducida o inadecuada, se pueden evitar variantes con dicho cambio. En otras palabras, con base en la información recopilada de tales experimentos de rutina, un experto en la materia puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que se deben evitar sustituciones adicionales, ya sea solas o en combinación con otras mutaciones.

Las variantes del receptor de linfocitos variable individuales pueden aislarse de bibliotecas combinatorias usando tecnologías de presentación en proteínas, por ejemplo, presentación en fagos, presentación en superficie de levadura, presentación en bacterias o sistemas libres de células. Véase Finlay et al., *Methods Mol. Biol.*, 2011, 681: 87-101; Daugherty, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2007, 17: 474-480; Gai y Wittrup, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2007, 17: 467-473; Zhou et al., *MAbs.*, 2010, 2: 508-518; Shen et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos*, 2005, 102: 5969-5974. Típicamente, una colección de variantes únicas se vincula a través de la plataforma de presentación mediante la expresión de los ácidos nucleicos mutados correspondientes. Después de exponer/mezclar las variantes expresadas en la plataforma de presentación con la molécula objetivo, las variantes unidas a la molécula se identifican y/o se separan para el análisis. Típicamente, la secuencia de proteínas se determina secuenciando un ácido nucleico asociado en la plataforma de presentación. Por ejemplo, en la presentación en la superficie de levadura, las células de levadura recombinantes expresan proteínas variantes en las que la célula de levadura expresa la proteína variante conjugada con una proteína de la pared celular. La célula de levadura puede contener un ADN plasmídico que codifica la proteína variante que se expresa en la superficie de la célula de levadura, y la secuenciación del ADN plasmídico proporciona la secuencia proteica de la proteína variante. Véase Gera et al., *Protein selection using yeast surface display*, *Methods*, 2013, 60 (1): 15-26. En la presentación en fagos, las proteínas variantes se conjugan típicamente con una proteína de recubrimiento del bacteriófago. Los sistemas basados en células también suelen depender de la expresión de proteínas variantes conjugadas con proteínas de la superficie celular, por ejemplo, en células bacterianas, de levadura y de mamífero, y la célula huésped porta un vector plasmídico que codifica las proteínas variantes. También se han desarrollado sistemas libres de células en los que la proteína variante se conjuga directamente a su ARNm codificador, denominado presentación en ribosomas o presentación en ARNm.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a polipéptidos aislados que comprenden la SEQ ID NO: 4, 6, 8 o 10, o fusiones de los mismos en las que el extremo terminal amino o el extremo terminal carboxilo de la secuencia de aminoácidos están opcionalmente unidos a una secuencia de aminoácidos heteróloga, marcador o molécula indicadora.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a los vectores recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido divulgado en el presente documento o una proteína quimérica del mismo.

En ciertas realizaciones, el vector recombinante comprende opcionalmente un origen de replicación asociado a mamífero, humano, insecto, viral, bacteriano, plásmido bacteriano, levadura o gen tal como un gen o gen retroviral o LTR, TAR, RRE, PE, SLIP, CRS lentiviral, y segmento de nucleótidos INS o gen seleccionado de tat, rev, nef, vif, vpr, vpu y vpx o genes estructurales seleccionados de gag, pol y env.

En ciertas realizaciones, el vector recombinante comprende opcionalmente un elemento del vector génico (ácido nucleico) tal como una región marcadora seleccionable, operón lac, un promotor de CMV, un promotor híbrido potenciador de B-actina de pollo/CMV (CAG), promotor tac, un promotor de la ARN polimerasa T7, un promotor de la ARN polimerasa SP6, un promotor SV40, una secuencia interna del sitio de entrada al ribosoma (IRES), un elemento regulador postregulatorio de marmota de acción cis (WPPE), una región de unión al andamio (SAR), repeticiones terminales invertidas (ITR), una región de codificación de etiqueta FLAG, una región de codificación de etiqueta c-myc, una región de codificación de etiqueta de afinidad con metal, una región de codificación de etiqueta de péptido de unión a estreptavidina, una región de codificación de etiqueta poliHis, una región de codificación de etiqueta HA, una región de codificación de etiqueta MBP, una región de codificación de etiqueta GST, una región de codificación de poliadenilación, una señal de poliadenilación de SV40, origen de replicación de SV40, origen de replicación ColE1, origen f1, origen pBR322 u origen pUC, sitio de reconocimiento de proteasa TEV, sitio loxP, región codificante de recombinasa Cre, o un sitio de clonación múltiple tal como tener 5, 6, o 7 o más sitios de restricción dentro de un segmento continuo de menos de 50 o 60 nucleótidos o que tienen 3 o 4 o más sitios de restricción con un segmento continuo de menos de 20 o 30 nucleótidos.

Inmunoterapia y receptores de antígenos quiméricos

Para mejorar la capacidad de las células inmunes para matar células cancerosas, las células T pueden aislarse de la sangre de un paciente y modificarse genéticamente para atacar específicamente a las proteínas expresadas en la superficie de las células cancerosas. Cuando se vuelven a colocar en el paciente, las células pueden ser aglutinantes más eficientes de las células cancerosas. CD19 es una proteína expresada en células B cancerosas. Brentjens et al., informan que las células T alteradas para unirse a CD19 pueden inducir remisiones de cáncer en adultos con leucemia linfoblástica aguda refractaria a la quimioterapia. Sci Transl Med, 2013, 5 (177): 177ra38.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una secuencia de direccionamiento del dominio receptor de linfocitos variables, un dominio transmembrana, un dominio de molécula coestimuladora de células T y un componente de transducción de señal de un dominio del receptor de antígeno de células T.

En ciertas realizaciones, la secuencia de direccionamiento es un dominio del receptor de linfocitos variable o cualquier variedad de secuencias de polipéptidos capaces de unirse selectivamente a una proteína de superficie en células objetivo, por ejemplo, células cancerosas. Otras secuencias de direccionamiento pueden ser regiones de unión variable de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla y mimético de anticuerpos.

En ciertas realizaciones, la molécula coestimuladora se selecciona a partir de CD28
MLRLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRSLHKGLDS
AVEVCVYGYGNYSSQQLQVYSGTGFNCDGKLGNESVTFFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPP
YLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR SRRLLHSDYMNMT-
PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 11) o variantes o fragmento del mismo tal como el dominio de
inmunoglobulina (Ig) del antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico ILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSERFRA
SLHKGLDSAVEVCVV YGNYSQQLQVYSGTGFNCDGKLGNESVTFFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKS
NGTIIHVK (SEQ ID NO: 12) o variantes o fragmentos de los mismos. CD28 es el receptor para CD80 (B7.1) y la
invención contempla CD80 como la secuencia GHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVA
TLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKKM VLTMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTIECVVLKYEK
DAFKREHLAEVTLVSKADFPSPISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY
AVSSKLDNFMTTNHSMCLIKYGHLRVNQTFNWNNTTKQEHFDPNLLPSWAITLISVNGIFVI CCLTYCFAPRCRERRR
NERLRRESVRPV (SEQ ID NO: 13) o variantes o fragmento de la misma o una secuencia con más del 50, 60, 70, 80,
90, 95% o más de identidad con la misma. CD28 es también el receptor para CD86 (B7.2) y la invención contempla
CD86 como la secuencia MDPQCTMGLSNILFVMAFLLSGAAPLIKQAYFNETADLPQCFANSQNSLSLSELVFWQDQ
ENLVLNEVYLGKEKFDVSHSKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHHKKPTGMIR
IHQMNSLSLANFSQPEIVPISNITENVYINLTCSSIHGYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYDGM
QKSQD NVTELYDVSISLSVSFPDVTSMNTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPPPPDHIPWITA
VLPTVIICVMVFCLILWKWKKKRPRNSYKCGTNTMERESEQTKKREKIHIPERSDEAQR VFKSSKTSSCDKSDT
CFP (SEQ ID NO: 14) o variantes o fragmento de la misma o una secuencia con más del 50, 60, 70, 80, 90, 95% o
más de identidad con la misma.

En ciertas realizaciones, la invención contempla el uso de una molécula coestimuladora que sea un fragmento de 20 a 100 o de 50 a 150 aminoácidos de la SEQ ID NO: 11-14 o variantes de la misma o aquellas con 80, 90, 95% o mayor identidad con la misma.

En ciertas realizaciones, el componente de transducción de señal del receptor de antígeno de células T es un péptido con un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora con la secuencia de consenso YXXLXXXXXXXXXXYL (SEQ ID NO: 15) en la que X es cualquier aminoácido, L es leucina o isoleucina, en la que la SEQ ID NO: 15 tiene opcionalmente una o dos eliminaciones de aminoácidos X dentro del segmento medio XXXXXXXX (SEQ ID NO: 16). El motivo de activación basada en el inmunorreceptor tirosina (subrayado) está en la secuencia CD3-zeta parcial AQLPITEAQSFGLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN **ELNLGRREEYDVL**DKRRGRDPE MGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR (SEQ ID NO: 17) que tiene o fragmentos variantes que tienen 1, 2 o 3 eliminaciones, adiciones o sustituciones de variantes de sustitución de aminoácidos, o una secuencia con más de 50, 60, 70, 80, 90, 95% o más de identidad de secuencia con la misma.

En ciertas realizaciones, el componente de transducción de señal del receptor de antígeno de células T es un péptido con un motivo de activación basado en el inmunorreceptor tirosina (subrayado) con la secuencia del precursor de la subunidad gamma del receptor épsilon de inmunoglobulina IPAVVLLLLLVEQAAALEPQLCYILDAILFLYGIVL TLLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGV**YTGLSTRNQET**YETLKHEKPPQ (SEQ ID NO: 18), fragmentos o variantes, variantes de la misma o una secuencia con más de 50, 60, 70, 80, 90, 95% o más de identidad con la misma.

En ciertas realizaciones, la divulgación se refiere a vectores recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico como se proporciona en el presente documento que además comprende una secuencia de interleucina tal como una secuencia señal de IL-2 humana (aminoácidos 1-60 de IL-2). MYRMQLLSC IALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVL

NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO: 19), fragmentos, variantes o una secuencia con más de 50, 60, 70, 80, 90, 95% o más de identidad de secuencia con la misma.

5 En ciertas realizaciones, la divulgación se refiere a vectores recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico como se proporciona en el presente documento que comprende además una secuencia de CD8 humano MALPVTALLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQ PRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRR ENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKP TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCK

10 CPRPVVKSQDKPSLSARYV (SEQ ID NO: 20) o una variante o fragmento con una secuencia con 50, 60, 70, 80, 90, 95% o más de identidad con la misma.

En ciertas realizaciones, la divulgación se refiere a vectores recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico como se proporciona en el presente documento que comprende además un CD137 humano MGNHCYNIVATLLLVNLFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTC

15 DICRQCKGV FRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQSQELTKKGCKDCCF GTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGH SPQISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFVSVKGRGKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCEL (SEQ ID NO: 21) o una variante o fragmento con una secuencia con 50, 60, 70, 80, 90, 95% o más de identidad con la misma.

20 Inmunoterapia

En ciertas realizaciones, la invención se relaciona con el vector recombinante según se reivindica para su uso en un método de tratamiento de cáncer que comprende aislar células T, células T gamma delta o células NK y transferir un vector recombinante según se reivindica en las células en condiciones tales que el vector recombinante expresa en las células aisladas un polipéptido quimérico que comprende un dominio del receptor de linfocitos variable, un dominio de molécula transmembrana, un dominio de molécula coestimuladora de células T y un componente de transducción de señal del dominio del receptor de antígeno de células T que proporciona células T modificadas, células T gamma delta o células NK; e implantar las células T modificadas, las células T gamma delta o las células NK en un sujeto que las necesite.

25

30

En ciertos aspectos, la divulgación se refiere a un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una secuencia de direccionamiento, un dominio transmembrana, un dominio de molécula coestimuladora de células T, un componente de transducción de señal de un dominio del receptor de antígeno de células T y una enzima que confiere resistencia al daño celular en presencia de un agente de quimioterapia.

35

En ciertas realizaciones, el vector recombinante codifica una enzima que confiere resistencia al daño celular en presencia de un agente de quimioterapia, y una cantidad efectiva del agente de quimioterapia se administra al sujeto antes, durante o después de implantar las células en el sujeto.

40

Las células inmunocompetentes exhiben citotoxicidad hacia las células cancerosas y los modelos animales tumorigénicos han demostrado que estas células pueden infiltrarse en tumores dando como resultado una regresión tumoral. La infiltración tumoral por células inmunocompetentes indica un pronóstico favorable en varios tipos de cáncer, tales como melanoma, colon, cáncer de ovario, carcinoma de células basales y cáncer de pulmón.

45

Los regímenes de quimioterapia frecuentemente conducen a toxicidad celular inespecífica a células inmunocompetentes transferidas adoptivamente y a células madre hematopoyéticas. Una estrategia para combatir la toxicidad inducida por fármacos es modificar genéticamente las células inmunes para hacerlas resistentes a los fármacos, por ejemplo, utilizando médula ósea resistente a fármacos o células inmunocompetentes con capacidades citotóxicas intrínsecas. Varios genes, como los de la metilguanina metiltransferasa (MGMT), la dihidrofolato reductasa (DHFR), la citidina desaminasa (CD) y la proteína resistente a múltiples fármacos (MDR-1) pueden conferir resistencia farmacológica a las células inmunes anticancerígenas. Los vectores retrovirales recombinantes, como los vectores lentivirales, son sistemas eficientes de transferencia de genes para la modificación *ex vivo* de las células, por ejemplo, células hematopoyéticas. La transferencia génica retroviral da como resultado la integración de la secuencia de ácido nucleico transferida en el genoma de la célula objetivo.

50

55

En ciertas realizaciones, la invención contempla vectores recombinantes que codifican el polipéptido P140KMGMT MDKDCEMKRTTLDSPGLKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAA DAVEVPAPAAVLGGPEPLMQCTAWLNAYF-HQPEAIEEFVVPALHHPVFQQESFTRQVLWK LLKVVKFGEVISYQQLAALAGNPKAARAVGGAMRGNPNVKILIP-CHRVVCSSGAVGNYSYG LAVEKLLAHEGHRGLKPGGLGSSGLAGAWLKGAGATSGSPAGRN (SEQ ID NO: 22) y/o el polipéptido L22YDHFR VGSNCIVAVSQNMIGIKNGDYPWPPLRNEFRYFQRMTTTS SVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPG VLSDVQEEKGIKYKFE-VYEKND (SEQ ID NO: 23) o una secuencia con más del 80, 90 o 95% de identidad con la misma.

60

65

Zielske et al., informan que la transducción lentiviral de MGMT P140K en progenitores hematopoyéticos CD34(+) humanos confiere una resistencia significativa a BG/BCNU y permite la selección *in vitro*. Mol Ther. 2002, 5 (4): 381-7. Sawai et al., informan la protección y la selección *in vivo* de células madre hematopoyéticas utilizando temozolomida, O6-bencilguanina y un vector retroviral que expresa alquiltransferasa. Mol Ther. 2001, 3 (1): 78-87. Maier et al., informan que la secuencia F2A que une MGMT (P140K) y MDR1 en un vector lentiviral bicistrónico permite una quimioprotección eficiente de las células madre hematopoyéticas. Cancer Gene Ther. 2012, 19 (11): 802-10.

En ciertas realizaciones, las células inmunocompetentes, por ejemplo, células T aisladas, células T gamma delta o células NK se aíslan del sujeto para recibir las células modificadas implantadas.

En ciertas realizaciones, el cáncer se selecciona de neuroblastoma, glioblastoma, glioma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, leucemia, linfoma o melanoma.

En ciertas realizaciones, la secuencia de direccionamiento se une específicamente a un antígeno asociado a un tumor tal como CD5, CD19, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD152 (CTLA-4), CD274 (PD-L1), CD340 (ErbB -2), GD2, TPBG, CA-125, CEA, MAGEA1, MAGEA3, MART1, GP100, MUC1, WT1, TAG-72, HPVE6, HPVE7, BING-4, SAP-1, receptor de laminina inmaduro, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) o receptor del factor de crecimiento epidérmico (ErbB-1).

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a una célula aislada que comprende los vectores recombinantes divulgados en el presente documento. En ciertas realizaciones, las células aisladas se seleccionan de células T auxiliares, células T citotóxicas, células T asesinas naturales o células T gamma delta. Estas células pueden obtenerse por aislamiento de sangre periférica y opcionalmente purificarse mediante clasificación de células activadas fluorescentes, por ejemplo, mezclando células con anticuerpos fluorescentes u otros agentes fluorescentes y separando las células mediante clasificación fluorescente basada en citometría de flujo. Otra opción para la clasificación de células es proporcionar partículas magnéticas que se conjugan con anticuerpos contra un antígeno particular en la superficie celular. Después de mezclar con una muestra, las células unidas al anticuerpo se colocan a través de una columna de purificación que contiene una matriz compuesta de esferas ferromagnéticas. Cuando se colocan en un separador magnético, las esferas amplifican el campo magnético. Las células no marcadas pasan a través suyo mientras que las células marcadas magnéticamente se retienen dentro de la columna. El flujo continuo se puede recoger como la fracción de células no marcadas. Después de una breve etapa de lavado, la columna se retira del separador y las células marcadas magnéticamente se eluyen de la columna.

El CD3 se expresa en todas las células T ya que está asociado con el receptor de células T (TCR). La mayoría de los TCR están formados por cadenas alfa beta (células alfa beta T). Se cree que las células T alfa beta y las células T gamma delta se derivan de timocitos precursores doble negativos CD4⁻CD8⁻ comunes. Las células T gamma delta maduras son doble negativas CD4⁻CD8⁻. Por el contrario, las células T alfa beta generalmente se convierten en intermedios doblemente positivos (CD4⁺CD8⁺) que maduran en células T auxiliares positivas sencillas (CD4⁺CD8⁻) o células T citotóxicas (CD4⁻CD8⁺). Las celdas de memoria pueden ser CD4⁺ o CD8⁺. Las células T de memoria típicamente expresan la proteína de la superficie celular CD45RO. Las células T pueden aislarse y separarse de una muestra humana (sangre o PBMC) basándose en la expresión del receptor de células T alfa beta (TCR), el receptor de células T gamma delta, CD2, CD3, CD4, CD8, CD4 y CD8, NK1.1, CD4 y CD25 y otras combinaciones basadas en selección positiva o negativa. Las células T TCRγ/δ⁺ son TCRα/β⁻, CD2⁺, CD3⁺, y CD5⁺. Véase también Salot et al., Large scale expansion of Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes from human peripheral blood mononuclear cells after a positive selection using MACS "TCR gamma/delta+ T cell isolation kit," J Immunol Methods, 2009, 347(1-2):12-8.

En ciertos aspectos, la divulgación contempla métodos de tratamiento de células inmunes modificadas descritos en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos que comparan un VLR con un antígeno/molécula asociado para direccionamiento al tumor.

En ciertas realizaciones, la molécula es una molécula asociada a tumor seleccionada de CD20, CD20, CD30, CD33, CD52, EpCAM, molécula de adhesión de células epiteliales, gpA33, glicoproteína A33, mucinas, TAG-72, glicoproteína 72 asociada a tumor, proteína de unión al folato, VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular, integrina αVβ3, integrina α5β1, FAP, proteína de activación de fibroblastos, CEA, antígeno carcinoembrionario, tenascina, Le^y, antígeno Y de Lewis, CAIX, anhidrasa carbónica IX, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; también conocido como ERBB1), ERBB2 (también conocido como HER2), ERBB3, MET (también conocido como HGFR), receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF1R), receptor de efrina A3 (EPHA3), receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAILR1; también conocido como TNFRSF10A), TRAILR2 (también conocido como TNFRSF10B) y el activador del receptor del ligando kB del factor nuclear (RANKL; también conocido como TNFSF11) y sus fragmentos.

En ciertas realizaciones, el sujeto está en riesgo de presentar síntomas o ser diagnosticado con cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas y cáncer de tiroides.

En ciertas realizaciones, los métodos contemplados incluyen la administración adicional de un segundo agente anticancerígeno tal como bevacizumab, gefitinib, erlotinib, temozolomida, docetaxel, cisplatino, 5-fluorouracilo, gemcitabina, tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinósido de citosina, hidroxiurea, adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina, mitramicina, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, taxol, taxotere, etopósido, tenipósido, amsacrina, topotecano, camptotecina, bortezomib, anagrelida, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno fulvestrant, bicalutamida, flutamida, nilutamida, ciproterona, goserelina, leuprorelina, buserelina, megestrol, anastrozol, letrozol, vorazol, exemestano, finasteride, marimastat, trastuzumab, cetuximab, dasatinib, imatinib, combretastatina, talidomida y/o combinaciones de los mismos.

La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de mama usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T son modificadas para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de otros agentes anticancerígenos adicionales. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de mama usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T son modificadas para expresar enzimas resistentes a los fármacos, en combinación con la administración de trastuzumab y/o lapatinib. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de mama usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T son modificadas para expresar enzimas resistentes a los fármacos, en combinación con la administración de docetaxel y ciclofosfamida. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de mama usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a los medicamentos, en combinación con la administración de docetaxel, carboplatino y trastuzumab. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de mama usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a los medicamentos, en combinación con la administración de ciclofosfamida, doxorubicina y 5-fluorouracilo (5-FU). La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de mama usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de docetaxel, doxorubicina y ciclofosfamida. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de mama usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a los medicamentos, en combinación con la administración de doxorubicina y ciclofosfamida seguido de paclitaxel o docetaxel. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de mama usando métodos de tratamiento de células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a los medicamentos, en combinación con la administración de 5-FU, epirubicina y ciclofosfamida seguido de docetaxel o paclitaxel.

La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de próstata usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de otro agente anticancerígeno adicional. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de próstata usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a los medicamentos, en combinación con la administración de leuprolida, goserelina o buserelina. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de próstata usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a los medicamentos, en combinación con la administración de flutamida, bicalutamida, enzalutamida o nilutamida. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de próstata usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de ketoconazol o aminoglutetimida. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de próstata utilizando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a los medicamentos, en combinación con la administración de abiraterona, bicalutamida, cabazitaxel, bicalutamida, degarelix, denosumab, docetaxel, enzalutamida, cabazitaxel, leuprolida, prednisona, denosumab, sipuleucel-T o dicloruro de radio 223 y combinaciones de los mismos.

La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de colon usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de otro agente anticancerígeno adicional. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de colon usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de 5-FU, leucovorina o capecitabina o combinaciones de las mismas. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de colon usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de capecitabina y oxaliplatino. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de colon usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para

expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de 5-FU, leucovorina y oxaliplatino. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de colon usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a los medicamentos, en combinación con la administración de leucovorina, 5-FU e irinotecano.

La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de colon usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de leucovorina, 5-FU, oxaliplatino e irinotecano.

La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de pulmón usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de vinorelbina, etopósido, mitomicina C, gemcitabina, irinotecano, pemetrexed, gefitinib, erlotinib, lapatinib, crizotinib y un alcaloide de la vinca o combinaciones de los mismos. El alcaloide de la vinca es vinblastina, vincristina, vindesina o vinorelbina. En ciertas realizaciones, la divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de pulmón usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a los medicamentos, en combinación con la administración de bevacizumab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, matuzumab o cetuximab. La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de pulmón usando métodos de tratamiento con células inmunes modificadas divulgados en este documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con la administración de un agente basado en platino y/o un taxano, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel o combinaciones de los mismos.

La divulgación contempla tratar o prevenir el cáncer de cerebro, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, tumores neuroectodérmicos primitivos, ependimomas o glioma. En ciertas realizaciones, la proteína quimérica se administra opcionalmente en combinación con temozolomida, procarbazona, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), vincristina y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, se combinan procarbazona, lomustina (CCNU) y vincristina. En ciertas realizaciones, la proteína quimérica se administra opcionalmente en combinación con irinotecano, cisplatino, carboplatino, metotrexato, etopósido, bleomicina, vinblastina, actinomicina (dactinomicina), ciclofosfamida o ifosfamida.

La divulgación contempla métodos que combinan tratamientos con células inmunes modificadas divulgados en el presente documento, tales como aquellos en los que las células T se modifican para expresar enzimas resistentes a fármacos, en combinación con tratamientos con temozolomida. El tratamiento del glioblastoma incluye quimioterapia durante y después de la radioterapia. En promedio, la quimioterapia después de la cirugía y la radioterapia pueden reducir inicialmente el tamaño del tumor.

Parte experimental

Creación de secuencias VLR-CAR que se unen a las células tumorales/neuroblastoma

Las lampreas sin modificar se inmunizaron en serie con células intactas (por ejemplo, células T humanas, leucemia de células B murinas, línea celular de neuroblastoma humano) durante 6 semanas. Posteriormente, sus linfocitos se recolectaron y se obtuvo ARN y se convirtió en ADNc. La amplificación por PCR de las secuencias del VLR de la biblioteca de ADNc facilitó la clonación de los VLR en una biblioteca de expresión de superficie de levadura que se usó para cribar los VLR que se unen a los antígenos en las células objetivo mediante citometría de flujo (véanse las Figuras 3 y 4 que ilustran el proceso utilizado para generar secuencias del VLR que se pueden usar para atacar a las células tumorales). Se puede usar un proceso similar de alto rendimiento que incorpora células o tejidos normales para seleccionar negativamente los VLR que probablemente generarán efectos del CAR fuera del objetivo. Los VLR que cumplen los criterios establecidos se secuencian y clonan en un casete transgénico del CAR. El VLR-CAR se clonó posteriormente en un vector lentiviral, que se usó para producir lentivirus recombinantes de alto título. El virus recombinante se usó para transducir células T (células Jurkat). Como se muestra en la Figura 4, VLR-CAR antineuroblastoma (generado contra la línea de células tumorales de neuroblastoma, SK-N-BE(2)) activó efectivamente las células T en presencia de células estimuladoras.

Secuencias de VLR que se unen a la leucemia de células B

Se desarrolló un CAR que contiene un VLR específico para el receptor de células B de una línea celular de leucemia de células B murinas (BCL). El diseño del CAR incorpora el anti-BCL-VLR, una etiqueta Myc, el dominio transmembrana CD28 y el dominio de señalización intracelular CD3ζ (Figura 5). El vector lentiviral SIN VLR-CAR se produjo con alto título ($\sim 1 \times 10^8$) y se usó para transducir células HEK 293T y Jurkat. Las células Jurkat transducidas demostraron un CAR de superficie persistente (Figuras 6A-C) sin toxicidad manifiesta. Para determinar si el VLR era capaz de señalizar a través del CAR, las células Jurkat transducidas se incubaron con la línea celular BCL que expresaba el receptor de células B objetivo. Usando este ensayo, se demostró una potente activación de células T a través del VLR-CAR (Figuras 7A-C).

Secuencias del VLR que se unen a la leucemia de células T

Yu, C., et al., 2012 identificaron una secuencia del VLR que reconoce CD5, que está presente, por ejemplo, en las leucemias de células T. Se sintetizó un ADNc optimizado con codón que codifica el VLR, y se clonó en la secuencia del CAR mostrada en la Figura 5 en lugar del BCL-VLR. Se generó un virus de alto título y se usó para transducir células T, similar a los estudios descritos anteriormente. Las células transducidas con un casete de expresión de GFP no se activaron en presencia de células que expresan CD5, pero las células transducidas con el VLR-CAR CD5 mostraron una mayor expresión de CD69 (Figura 8A), lo que indica la activación de las células T.

Listado de secuencias

<110> UNIVERSIDAD EMORY
CALEFACCIÓN INFANTIL DE ATLANTA, INC.
Spencer, H. Trent
Doering, Christopher B.
Herrin, Brantley R.
Cooper, Max Dale

<120> EXPRESIÓN DE POLIPÉPTIDO QUÍMICO CON RECEPTORES DE LINFOCITOS VARIABLES EN CÉLULAS INMUNITARIAS Y USOS PARA TRATAR EL CÁNCER

<130> 14078 PCT

<150> US 61/938.057

<151> 2014-02-10

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> Característica nueva

<222> (1)..(2)

<223> Donde X es cualquier aminoácido

<220>

<221> Característica nueva

<222> (4)..(4)

<223> Donde X es cualquier aminoácido

<220>

<221> Característica nueva

<222> (6)..(7)

<223> Donde X es cualquier aminoácido

<400> 1

Xaa Xaa Leu Xaa Leu Xaa Xaa
1 5

<210> 2

<211> 62

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (2)..(2)
5	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (4)..(7)
10	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (9)..(9)
15	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (14)..(14)
20	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (20)..(21)
25	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (23)..(26)
30	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (28)..(28)
35	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (32)..(33)
40	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (39)..(39)
45	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (41)..(42)
50	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (44)..(47)
55	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (49)..(50)
60	<223> donde X es cualquier aminoácido
	<220>
	<221> Característica nueva
	<222> (52)..(52)
65	<223> donde X es cualquier aminoácido

<220>
 <221> Característica nueva
 <222> (54)..(56)
 <223> donde X es cualquier aminoácido

5

<220>
 <221> Característica nueva
 <222> (58)..(58)
 <223> donde X es cualquier aminoácido

10

<220>
 <221> Característica nueva
 <222> (60)..(60)
 <223> donde X es cualquier aminoácido

15

<400> 2

Val	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Ser	Val	Pro	Ala	Xaa	Ile	Pro
1				5					10					15	
Thr	Thr	Thr	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asn	Xaa	Ile	Thr	Lys	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Pro	Gly	Val	Phe	Asp	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu
		35					40					45			
Xaa	Xaa	Asn	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Gly	Xaa	Phe	Asp		
	50					55					60				

20

<210> 3
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 3

gcatgtccct	cgcagtgttc	gtgctcaggg	acacaagtga	actgccatga	gagaagcctc	60
gcgtctgtgc	ctgcgggaat	ccccaccacc	acgcaagtgc	tgtatttgta	caccaatcag	120
atcacgaagc	tcgagcccg	cgtgtttgac	agtctgacgc	aactgactga	actgtacctt	180
agtgccaaacc	agctcacgac	tctacccgag	ggggtgtttg	acaaactgac	caaactcact	240
catctgagtc	tgtacaataa	ccagctgaag	agcattccta	ggggcgcctt	tgacaacctc	300
aagagcctca	ctcacatctg	gctgtccagc	aaccctggg	actgtcagtg	cacggacatc	360
ctctacttga	gtggctgggt	cgctcagcac	tcgggcatcg	tgggtgaggg	gtggccatgg	420
aggcacagtc	cagacagcgt	caagtgtctt	ggtaccaata	ccccgtccg	tcggtgcacc	480
gaggccagca	ctagcccctc	gaaatgccca	ggctacgttg	ctacgaccac	g	531

30

<210> 4
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Constructo sintético

ES 2 792 849 T3

<400> 4

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

5 <210> 5
<211> 531
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 5

gcatgtccct cgcagtgttc gtgctcaggg acaactgtgg attgtagtgg gaaaagcctc 60

15 gcatctgtgc ctgcaggaat ccccatcacc acgcagtctc tgtatttgct cgtcaatcaa 120

ES 2 792 849 T3

atcacgaagc tcgagcctgg ggtgtttgac catctggtga atctgcagaa gctctatttg 180
 agtgggaatc agctgcaggc tctacccgtt ggggtgtttg acaaactgac ccagctcact 240
 tatctgggtc tggacgcaa ccaactgaag agcatcgtca ggggcgcctt tgacaacctc 300
 aagagcctca ctcacatctg gctgtacaac aaccctggg actgtgcctg ctgagacatc 360
 ctgtacctca gtcgctggat ctctcagcac ccaggagtct tgaggaatcc tggttcctac 420
 aatgtcaacc ccgactcagc actctgctct ggtaccaata ccccggtccg tgcggtcacc 480
 gaggccagca ctagcccctc gaaatgccca ggctacgttg ctacgaccac g 531

<210> 6

5 <211> 170

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético

<400> 6

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

ES 2 792 849 T3

<210> 7
 <211> 669
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 7

10

```

gcacgtccct cgcagtggtc gtgcgatcag acaactgtat actgccatag cagacgcctc      60
acgtctgtgc ctgcaggaat ccccaccaca acgcgagtg cgtatttgaa cagcaatcag      120
atcacgaagc tcgagcccg ggtgtttgac cgcctggtga atctgcagaa gctctatttg      180
agtgggaatc agctgcaggc tcttcctgag ggggtgtttg accgcctggt gaatctgcag      240
aagctgtggt tgaacagcaa ccagctgacc tctctccccg ctggtgtgtt tgaccgtctg      300
actcaactga cagcactgga tcttggtggc aaccagctga aggcccttcg cgaagggatg      360
tttgaccgct tggtaaatct gcagacgctg gatttgaca acaaccagct gaagagcatt      420
cctaggggag cctttgacaa cctcaagagc ctcaactaaca tctatctgta cagtaacccc      480
tgggactgag agtggtcaga catcctctat ctgaagaact ggattgtgca gcatgcaagc      540
atcgtgaatc tacggggcca tgggggagtt gataacgtga agtgctctgg taccaatacc      600
cccgctccgtg cggtcaccga ggccagcact agcccctcga aatgccccagg ctacgttgct      660
acgaccacg                                     669
  
```

<210> 8
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Constructo sintético

20

<400> 8

```

Ala Cys Pro Ser Gln Cys Ser Cys Asp Gln Thr Thr Val Tyr Cys His
1          5          10          15

Ser Arg Arg Leu Thr Ser Val Pro Ala Gly Ile Pro Thr Thr Thr Arg
20          25          30

Val Leu Tyr Leu Asn Ser Asn Gln Ile Thr Lys Leu Glu Pro Gly Val
35          40          45
  
```

ES 2 792 849 T3

Phe Asp Arg Leu Val Asn Leu Gln Lys Leu Tyr Leu Ser Gly Asn Gln
 50 55 60
 Leu Gln Ala Leu Pro Glu Gly Val Phe Asp Arg Leu Val Asn Leu Gln
 65 70 75 80
 Lys Leu Trp Leu Asn Ser Asn Gln Leu Thr Ser Leu Pro Ala Gly Val
 85 90 95
 Phe Asp Arg Leu Thr Gln Leu Thr Arg Leu Asp Leu Gly Gly Asn Gln
 100 105 110
 Leu Lys Ala Leu Arg Glu Gly Met Phe Asp Arg Leu Val Asn Leu Gln
 115 120 125
 Thr Leu Asp Leu His Asn Asn Gln Leu Lys Ser Ile Pro Arg Gly Ala
 130 135 140
 Phe Asp Asn Leu Lys Ser Leu Thr Asn Ile Tyr Leu Tyr Ser Asn Pro
 145 150 155 160
 Trp Asp Cys Glu Cys Ser Asp Ile Leu Tyr Leu Lys Asn Trp Ile Val
 165 170 175
 Gln His Ala Ser Ile Val Asn Leu Arg Gly His Gly Gly Val Asp Asn
 180 185 190
 Val Lys Cys Ser Gly Thr Asn Thr Pro Val Arg Ala Val Thr Glu Ala
 195 200 205
 Ser Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro
 210 215

<210> 9

5 <211> 591

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético

<400> 9

tgctccttcac agtgctcctg cagcggaacc gaggtccatt gtcagagaaa atccctggct	60
tcagtcctctg ccggaatccc aaccacaaca aggggtgctgt acctgcacgt caacgagatt	120
actaagttcg aaccaggagt gtttgaccgc ctgggtcaacc tgcagcagct gtatctggga	180
ggaaatcagc tgagcgccct gccagacggc gtgttcgatc gactgactca gctgaccaga	240
ctggatctgt acaacaatca gctgaccgtg ctgcctgccg gggtctttga ccgactgggt	300

ES 2 792 849 T3

```

aatctgcaga cactggatct gcacaacaat cagctgaagt ctatccccag aggcgcattc      360
gacaacctga aaagtctgac ccatatttgg ctgtttggga atccttggga ctgcgcctgt      420
agcgatatcc tgtatctgtc cggatggctg ggacagcatg cagggaaaga gcaggacag      480
gctgtctgct ctggcaccaa cacaccctg cggtgtgtca ccgaggcatc aacatcccca      540
tcaaagtgtc ctggctacgt ggcaacaacc agatctgcta gcgagcagaa g      591

```

<210> 10
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 10

```

Cys Pro Ser Gln Cys Ser Cys Ser Gly Thr Glu Val His Cys Gln Arg
1          5          10          15

Lys Ser Leu Ala Ser Val Pro Ala Gly Ile Pro Thr Thr Thr Arg Val
20          25          30

Leu Tyr Leu His Val Asn Glu Ile Thr Lys Phe Glu Pro Gly Val Phe
35          40          45

Asp Arg Leu Val Asn Leu Gln Gln Leu Tyr Leu Gly Gly Asn Gln Leu
50          55          60

Ser Ala Leu Pro Asp Gly Val Phe Asp Arg Leu Thr Gln Leu Thr Arg
65          70          75          80

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

Asp Arg Leu Val Asn Leu Gln Thr Leu Asp Leu His Asn Asn Gln Leu
100         105         110

Lys Ser Ile Pro Arg Gly Ala Phe Asp Asn Leu Lys Ser Leu Thr His
115         120         125

Ile Trp Leu Phe Gly Asn Pro Trp Asp Cys Ala Cys Ser Asp Ile Leu
130         135         140

Tyr Leu Ser Gly Trp Leu Gly Gln His Ala Gly Lys Glu Gln Gly Gln
145         150         155         160

Ala Val Cys Ser Gly Thr Asn Thr Pro Val Arg Ala Val Thr Glu Ala
165         170         175

Ser Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro
180

```

ES 2 792 849 T3

<210> 11
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 11

10

```

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1          5          10          15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
          20          25          30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
          35          40          45

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

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65          70          75          80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr
          85          90          95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
          100          105          110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
          115          120          125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
          130          135          140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145          150          155          160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
          165          170          175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
          180          185          190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
          195          200          205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
          210          215          220
  
```

15

<210> 12
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 792 849 T3

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 12

5

```

Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn Ala Val
1          5          10          15

Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu Phe Arg
          20          25          30

Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys Val Val
          35          40          45

Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
50          55          60

Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr Leu Gln
65          70          75          80

Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile Glu Val
          85          90          95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile
          100          105          110

Ile His Val Lys
          115

```

<210> 13

<211> 288

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15

<400> 13

```

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
1          5          10          15

```

ES 2 792 849 T3

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20 25 30
 Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
 35 40 45
 Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
 50 55 60
 Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
 65 70 75 80
 Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
 85 90 95
 Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
 100 105 110
 Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
 115 120 125
 Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
 130 135 140
 Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
 145 150 155 160
 Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
 165 170 175
 Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
 180 185 190
 Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
 195 200 205
 Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
 210 215 220
 Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
 225 230 235 240
 Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
 245 250 255
 Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
 260 265 270
 Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
 275 280 285

<210> 14
<211> 330
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 14

10

ES 2 792 849 T3

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

ES 2 792 849 T3

Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro
195 200 205

Asp Val Thr Ser Asn Met Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys
210 215 220

Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln
225 230 235 240

Pro Pro Pro Asp His Ile Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val
245 250 255

Ile Ile Cys Val Met Val Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys
260 265 270

Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu
275 280 285

Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro
290 295 300

Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser
305 310 315 320

Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr Cys Phe Pro
325 330

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<220>
<221> Característica nueva
<222> (2)..(3)
<223> donde X es cualquier aminoácido

<220>
<221> Característica nueva
<222> (5)..(12)
<223> donde X es cualquier aminoácido

<220>
<221> Característica nueva
<222> (14)..(15)
<223> donde X es cualquier aminoácido

<400> 15

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

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

5 <220>
 <221> Característica nueva
 <222> (1)..(8)
 <223> donde X es cualquier aminoácido

10 <400> 16

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

15 <210> 17
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 17

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

Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile
 20 25 30

Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala
 35 40 45

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu
 50 55 60

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp
 65 70 75 80

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 85 90 95

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 100 105 110

25 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 115 120 125

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 130 135 140

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 145 150

30 <210> 18
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 792 849 T3

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 18

5

```

Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala Ala
1           5           10           15

Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu Phe
                20           25           30

Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile Gln
          35           40           45

Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr
          50           55           60

Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His
65           70           75           80

Glu Lys Pro Pro Gln
                85

```

<210> 19

<211> 153

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15

<400> 19

```

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1           5           10           15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
          20           25           30

```

ES 2 792 849 T3

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 20

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10

<400> 20

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

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr
20 25 30

Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser
35 40 45

Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala
50 55 60

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala
65 70 75 80

ES 2 792 849 T3

Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp
85 90 95

Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe
115 120 125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
130 135 140

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
145 150 155 160

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
165 170 175

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
180 185 190

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
195 200 205

Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
210 215 220

Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
225 230 235

5 <210> 21
<211> 255
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 21

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile

15

ES 2 792 849 T3

50

55

60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

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

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

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

<210> 22

5 <211> 207

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético

<400> 22

Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu
1 5 10 15

ES 2 792 849 T3

Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys
20 25 30

Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala
35 40 45

Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala
50 55 60

Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro
65 70 75 80

Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg
85 90 95

Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile
100 105 110

Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg
115 120 125

Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Lys Ile Leu Ile Pro
130 135 140

Cys His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu
165 170 175

Gly Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu
180 185 190

Lys Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
195 200 205

<210> 23
5 <211> 186
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Constructo sintético

<400> 23

Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly Ile
1 5 10 15

ES 2 792 849 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido quimérico que comprende una secuencia de direccionamiento de un dominio de receptor de linfocitos variable, un dominio transmembrana, un dominio de molécula coestimuladora de células T y un componente de transducción de señal de un dominio receptor de antígeno de células T, en el que el receptor de linfocitos variable tiene la SEQ ID NO: 4, 6, 8 o 10, o una secuencia con más del 95% de identidad con la misma.
2. El vector recombinante de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico tiene la SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, o una secuencia con más del 95% de identidad con la misma.
3. El vector recombinante de la reivindicación 1 o 2, en el que la molécula coestimuladora se selecciona de CD28, CD80, CD86 o fragmento de la misma.
4. El vector recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el componente de transducción de señal del antígeno de células T comprende la secuencia YXXLXXXXXXXXXXYL (SEQ ID NO: 15) en la que X es cualquier aminoácido, L es leucina o isoleucina y uno o dos X se eliminan opcionalmente.
5. Una célula aislada que comprende el vector recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. La célula de la reivindicación 5, seleccionada de células T auxiliares, células T citotóxicas, células T asesinas naturales o células T $\gamma\delta$.
7. El vector recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en un método de tratamiento del cáncer que comprende aislar células T, células T gamma delta o células NK y transferir el vector recombinante a las células en condiciones tales que el vector recombinante exprese en las células aisladas un polipéptido quimérico que comprende un dominio del receptor de linfocitos variable, un dominio de molécula transmembrana, un dominio de molécula coestimuladora de células T y un componente de transducción de señal del dominio del receptor de antígeno de células T que proporciona células T modificadas, células T gamma delta o células NK; y implantar las células T modificadas, las células T gamma delta o las células NK en un sujeto que las necesite.
8. El vector recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el vector recombinante codifica una enzima que confiere resistencia al daño celular en presencia de un agente de quimioterapia, y se administra una cantidad efectiva del agente de quimioterapia al sujeto antes, durante o después de implantar las células en el sujeto.
9. El vector recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que las células T aisladas, las células T gamma delta o las células NK se aíslan del sujeto para recibir las células modificadas implantadas.
10. Un polipéptido aislado que comprende las SEQ ID NO: 4, 6, 8 o 10 en el que el extremo terminal amino o el extremo terminal carboxilo de la secuencia de aminoácidos están opcionalmente unidos a una secuencia de aminoácidos heteróloga, marcador o molécula indicadora.
11. Un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 10.
12. Una célula inmune que comprende el vector recombinante de la reivindicación 11.

GCATGTCCCTCGCAGTGTTTCGTGCTCAGGGACACAAGTGAAGTGGCATGAGAGAAGCC
TCGCGTCTGTGCCTGCGGGAATCCCCACCACCACGCAAGTGCTGTATTTGTACACCAAT
CAGATCACGAAGCTCGAGCCCGGCGTGTTTGACAGTCTGACGCAACTGACTGAACTGT
ACCTTAGTGCCAACCAGCTCACGACTCTACCCGAGGGGGTGTGTTGACAACTGACCAA
ACTCACTCATCTGAGTCTGTACAATAACCAGCTGAAGAGCATTCTAGGGGCGCCTTTG
ACAACCTCAAGAGCCTCACTCACATCTGGCTGTCCAGCAACCCCTGGGACTGTCAGTGC
ACGGACATCCTCTACTTGAGTGGCTGGGTGCTCAGCACTCGGGCATCGTGGGTGAGGG
GTGGCCATGGAGGCACAGTCCAGACAGCGTCAAGTGCTCTGGTACCAATACCCCCGTC
CGTGCGGTCACCGAGGCCAGCACTAGCCCCTCGAAATGCCAGGCTACGTTGCTACGA
CCACG (SEQ ID NO: 3)

FIG. 1A

ACPSQCSCSGTQVNCHERSLASVPAGIPTTTQVLYLYTNQITKLEPGVFDSTQLTELYLSAN
QLTTLPEGVFDKLTCLTHLSLYNNQLKSIPRGAFDNLKSLTHIWLSSNPWDCQCTDILYLSG
WVAQHSQIVGEGWPWRHSPDSVKCSGTNTPVRAVTEASTSPSKCP (SEQ ID NO: 4)

FIG. 1B

GCATGTCCCTCGCAGTGTTTCGTGCTCAGGGACAACTGTGGATTGTAGTGGGAAAAGCCT
CGCATCTGTGCCTGCAGGAATCCCCATCACCACGCAGTCTCTGTATTTGCTCGTCAATC
AAATCACGAAGCTCGAGCCTGGGGTGTGTTGACCATCTGGTGAATCTGCAGAAGCTCTAT
TTGAGTGGGAATCAGCTGCAGGCTCTACCCGTTGGGGTGTGTTGACAACTGACCCAGCT
CACTTATCTGGGTCTGGACGCCAACCAACTGAAGAGCATCGTCAGGGGCGCCTTTGACA
ACCTCAAGAGCCTCACTCACATCTGGCTGTACAACAACCCCTGGGACTGTGCCTGCTCA
GACATCCTGTACCTCAGTCGCTGGATCTCTCAGCACCCAGGAGTCTTGAGGAATCCTGG
TTCCTACAATGTCAACCCGACTCAGCACTCTGCTCTGGTACCAATACCCCCGTCCGTG
CGGTCACCGAGGCCAGCACTAGCCCCTCGAAATGCCAGGCTACGTTGCTACGACCAC
G (SEQ ID NO: 5)

FIG. 1C

ACPSQCSCSGTTVDCSGKSLASVPAGIPITTQSLYLLVNQITKLEPGVFDHLVNLQKLYLSGN
QLQALPVGVDKLTQLTYLGLDANQLKSIVRGAFDNLKSLTHIWLNNPWDCACSDILYLS
RWISQHPGVLNRNPGSYNVNPDALCSGTNTPVRAVTEASTSPSKCP (SEQ ID NO: 6)

FIG. 1D

GCATGTCCCTCGCAGTGTTTCGTGCGATCAGACAACGTATACTGCCATAGCAGACGCCT
CACGTCTGTGCCTGCAGGAATCCCCACCACAACGCGAGTGCTGTATTTGAACAGCAATC
AGATCACGAAGCTCGAGCCCCGGGGTGTGTTGACCGCCTGGTGAATCTGCAGAAGCTCTAT
TTGAGTGGGAATCAGCTGCAGGCTCTTCCTGAGGGGGTGTGTTGACCGCCTGGTGAATCT
GCAGAAGCTGTGGTTGAACAGCAACCAGCTGACCTCTCTCCCCGCTGGTGTGTTTGACC
GTCTGACTCAACTGACACGACTGGATCTTGGTGGCAACCAGCTGAAGGCCCTTCGCGAA
GGGATGTTTGACCGCTTGGTTAATCTGCAGACGCTGGATTTGCACAACAACCAGCTGAA
GAGCATTCTAGGGGCGCCTTTGACAACCTCAAGAGCCTCACTAACATCTATCTGTACA
GTAACCCCTGGGACTGCGAGTGTTTCGGACATCCTCTATCTGAAGAACTGGATTGTGCAG
CATGCAAGCATCGTGAATCTACGGGGCCATGGGGGAGTTGATAACGTGAAGTGCTCTG
GTACCAATACCCCCGTCCGTGCGGTCACCGAGGCCAGCACTAGCCCCCTCGAAATGCCCA
GGCTACGTTGCTACGACCACG (SEQ ID NO: 7)

FIG. 1E

ACPSQCSCDQTTVYCHSRRLTSVPAGIPTTTTRVLNLNSNQITKLEPGVFDRLVNLQKLYLSG
NQLQALPEGVFDRLVNLQKLWLNNSQLTSLPAGVFDRLTQLTRLDLGGNQLKALREGMFD
RLVNLQTLDLHNNQLKSIPRGAFDNLKSLTNIYLYSNPWDCECSDILYLKNWIVQHASIVNL
RGHGGVDNVKCSGTNTPVRAVTEASTSPSKCP (SEQ ID NO: 8)

FIG. 1F

TGTCCTTCACAGTGCTCCTGCAGCGGAACCGAGGTCCATTGTCAGAGAAAATCCCTGGC
TTCAGTCCCTGCCGGAATCCCAACCACAACAAGGGTGCTGTACCTGCACGTCAACGAG
ATTACTAAGTTTGAACCAGGAGTGTTTGACCGCCTGGTCAACCTGCAGCAGCTGTATCT
GGGAGGAAATCAGCTGAGCGCCCTGCCAGACGGCGTGTTTCGATCGACTGACTCAGCTG
ACCAGACTGGATCTGTACAACAATCAGCTGACCGTGCTGCCTGCCGGGGTCTTTGACCG
ACTGGTGAATCTGCAGACACTGGATCTGCACAACAATCAGCTGAAGTCTATCCCCAGA
GGCGCATTCGACAACCTGAAAAGTCTGACCCATATTTGGCTGTTTGGAATCCTTGGA
CTGCGCCTGTAGCGATATCCTGTATCTGTCCGGATGGCTGGGACAGCATGCAGGGAAA
GAGCAGGGACAGGCTGTCTGCTCTGGCACCAACACACCCGTGCGGGCTGTCACCGAGG
CATCAACATCCCCATCAAAGTGTCTGGCTACGTGGCAACAACCAGATCTGCTAGCGAG
CAGAAG (SEQ ID NO: 9)

FIG. 2A

CPSQCSCSGTEVHCQRKSLASVPAGIPTTTTRVLYLHVNEITKFEPGVFDRLVNLQQLYLGGN
 QLSALPDGVFDRLTQLTRLDLYNNQLTVLPAGVFDRLVNLQTLDLHNNQLKSIPRGAFDNL
 KSLTHIWLFGNPWDCACSDILYLSGWLGQHAGKEQGQAVCSGTNTTPVRAVTEASTSPSKCP
 (SEQ ID NO: 10)

FIG. 2B

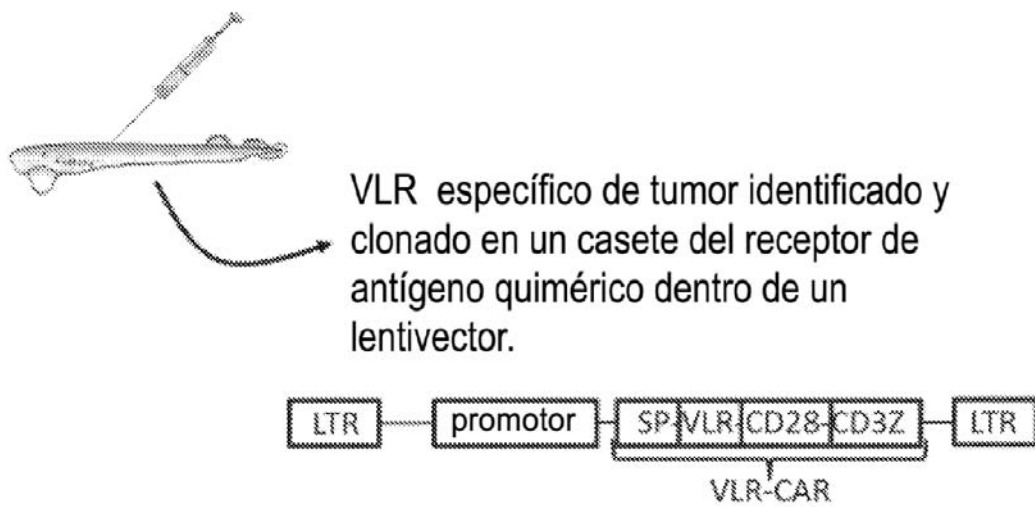


FIG. 3

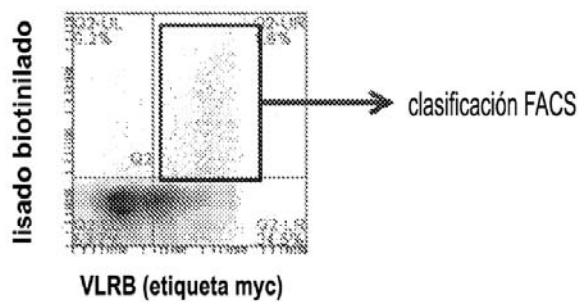


FIG. 4A

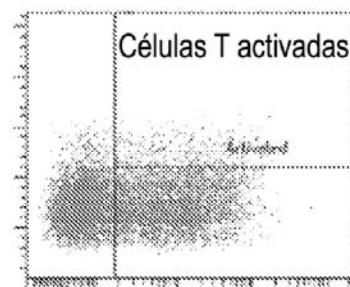


FIG. 4B

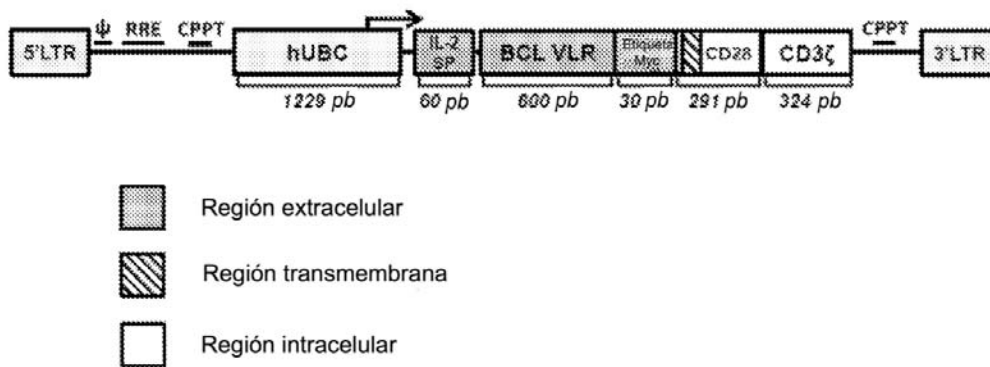


FIG. 5

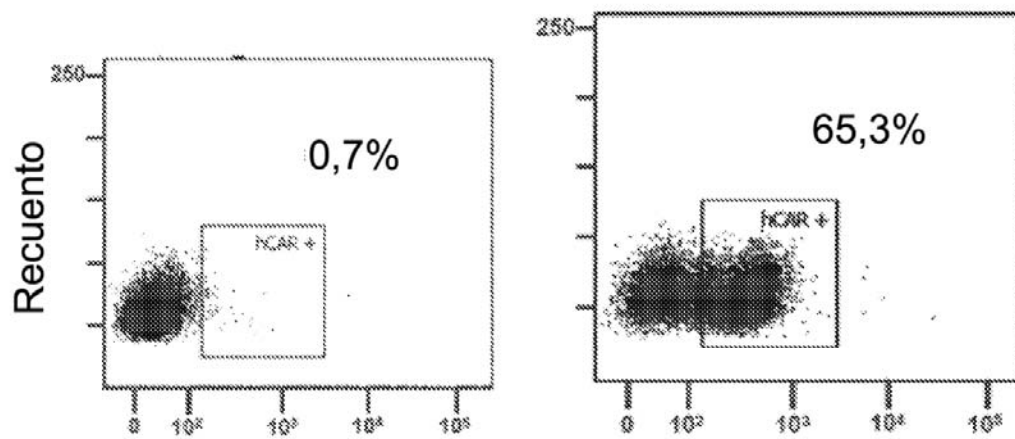


FIG. 6A

FIG. 6B

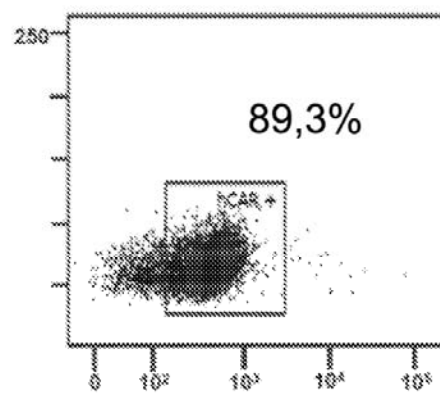


FIG. 6C

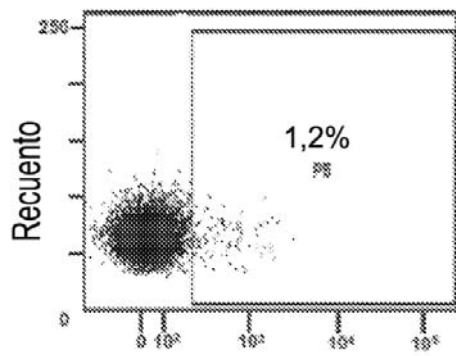


FIG. 7A

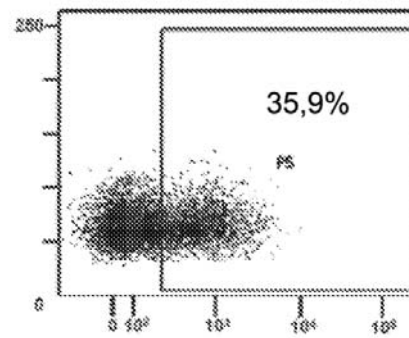


FIG. 7B

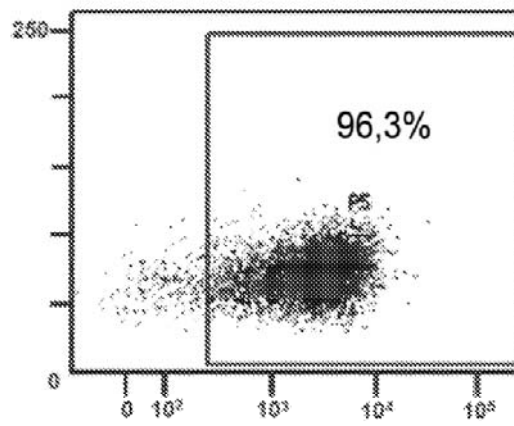


FIG. 7C

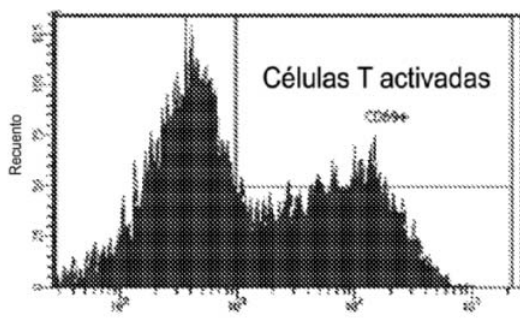


FIG. 8A

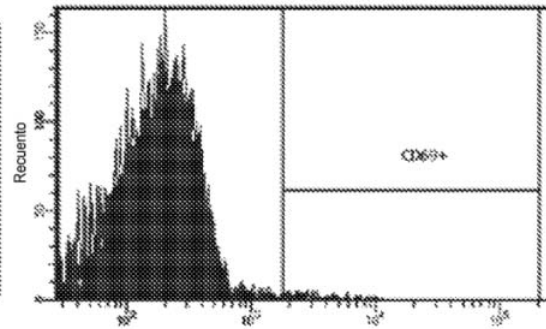


FIG. 8B

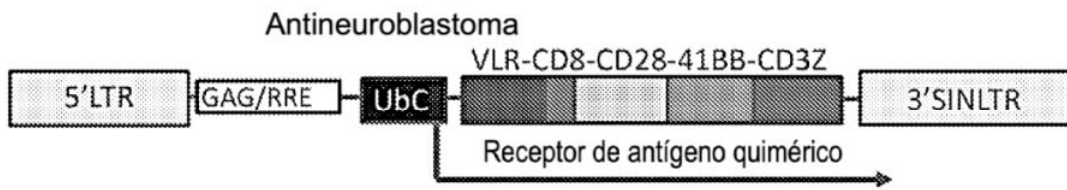


FIG. 9A

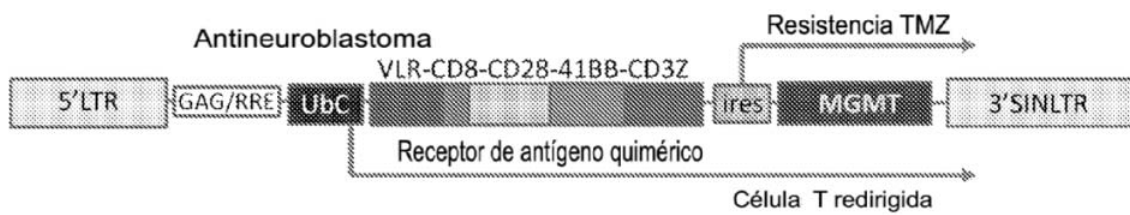


FIG. 9B