

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 857 998**

(51) Int. Cl.:

C07K 19/00	(2006.01)	C12N 15/62	(2006.01)
A61K 35/12	(2015.01)	C12N 5/10	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)	C07K 14/725	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)	A61K 38/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	C07K 16/28	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)	A61K 35/00	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)		
C07K 14/705	(2006.01)		
C07K 14/715	(2006.01)		
C07K 5/107	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2016 PCT/CA2016/050126**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16127257**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2016 E 16748518 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 3256496**

(54) Título: **Receptores de antígenos químéricos**

(30) Prioridad:

12.02.2015 US 201562115527 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2021

(73) Titular/es:

**UNIVERSITY HEALTH NETWORK (50.0%)
190 Elizabeth Street R. Fraser Elliott Building -
Room 1S-417
Toronto, Ontario M5G 2C4, CA y
TAKARA BIO INC. (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**TANAKA, SHINYA;
HIRANO, NAOTO y
KAGOYA, YUKI**

(74) Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, María Ester

ES 2 857 998 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígenos químéricos

5 Solicitud relacionada

Esta es una solicitud de Tratado de Cooperación de Patentes que reivindica el beneficio de 35 USC § 119 en base a la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 62/115,527 presentada el 12 de febrero de 2015.

10 Incorporación del listado de secuencias

Una forma legible por ordenador del Listado de Secuencias "P47312PC00_ST25.txt" (45,782 bytes) creado el 11 de febrero de 2016 se incorpora aquí como referencia.

15 Campo técnico

La presente descripción se refiere a receptores de antígenos químéricos (CAR) mejorados y, en particular, a CAR que comprenden un segmento intracelular que comprende un dominio citoplasmático truncado de la cadena beta del receptor de interleucina-2 que corresponde a la SEQ ID NO: 5 y un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno que corresponde a YRHQ (SEQ ID NO: 22) en las posiciones 104-107 de la SEQ ID NO: 7. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican dichos CAR, una célula que expresa dichos CAR, así como también métodos de fabricación y usos terapéuticos de estos.

Introducción

25 Una estrategia terapéutica para el tratamiento de tumores puede implicar la introducción de un receptor de células T (TCR) que puede unirse a un antígeno específico en una célula T para preparar una célula T que se dirija al antígeno de interés. Sobre la base de esta estrategia, se han intentado terapias génicas de inmunidad adoptiva que usan genes de TCR que se dirigen a muchos antígenos tumorales, por ejemplo, antígenos WT1, MART1, gp100, CEA, CD19 y mHAG HA-2.

30 Otra terapia con células T genéticamente modificadas implica el uso de un receptor de antígenos químéricos (CAR). Los CAR combinan la especificidad del antígeno y las propiedades de activación de células T en una sola molécula de fusión. El CAR tiene especificidad por un antígeno de superficie de una célula tumoral y la capacidad de activar el crecimiento de células T ex vivo. Esta terapia puede tener un efecto antitumoral más fuerte y de mayor duración que un anticuerpo terapéutico que se dirige al antígeno de la superficie tumoral y, por lo tanto, su efecto clínico también puede ser mayor.

35 Una estructura representativa de CAR comprende un fragmento variable de cadena única (scFv) que reconoce un antígeno de superficie de una célula tumoral, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR - tal como CD3 ζ - que activa una célula T. Un CAR que tiene tal constitución se denomina CAR de primera generación. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una porción de fragmento variable de cadena única puede aislarla de, por ejemplo, un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno diana, tal como un antígeno tumoral diana. Un CAR se produce y expresa en una célula tal como una célula T. Una célula T que expresa un CAR reconoce directamente un antígeno de superficie de una célula tumoral independientemente de la expresión del antígeno mayor de histocompatibilidad clase I en la célula tumoral y, al mismo tiempo, activa la célula T y, por lo tanto, la célula T que expresa CAR puede matar la célula tumoral.

40 Con el fin de intentar mejorar la capacidad de los CAR de primera generación para activar las células T, se ha desarrollado un CAR de segunda generación, en donde un dominio de señalización intracelular de CD28, que es una molécula coestimuladora de una célula T, se une a un primer CAR de primera generación. Como una versión mejorada adicional, también se ha desarrollado un CAR de tercera generación, en donde un dominio de señalización intracelular derivado de CD137 (4-1BB) o CD134 (OX40), ambos que son miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), se une en tandem a un CAR de segunda generación. Por lo tanto, se han informado muchas moléculas CAR que se dirigen a una variedad de antígenos tumorales (ver, por ejemplo, Sadelain y otros, 2009). Sin embargo, son limitadas las proteínas transductoras de señales usadas como el dominio de señalización intracelular coestimulador para los CAR de segunda y tercera generación que se informan actualmente. Se sabe que cuando se unen a un CAR, no todos los dominios de señalización intracelular derivados de cada proteína transductora de señales de células T estimularán suficientemente una célula T para dañar y/o matar una célula tumoral diana. Por lo tanto, es convenientemente encontrar dominios de señalización intracelular de proteínas transductoras de señales que sean eficaces cuando se unan a un CAR.

Resumen

45 Un aspecto de la presente descripción es un CAR que se une específicamente a un antígeno diana e imparte una actividad citotóxica contra una célula diana que expresa el antígeno diana.

Un aspecto adicional es una célula que expresa el CAR que puede usarse para dirigirse a una célula que expresa el antígeno diana de interés.

En la presente descripción se describe un CAR que comprende i) un dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado, ii) un dominio transmembrana y iii) un segmento intracelular que comprende a) uno o más dominios de señalización intracelular seleccionados de un dominio citoplasmático de una cadena del receptor de interleucina y/o un dominio coestimulador citoplasmático y b) un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno, en donde el segmento intracelular comprende un motivo de unión a JAK endógeno o exógeno y un motivo de asociación a STAT5.

En la presente descripción se proporciona un receptor de antígenos químéricos (CAR) que comprende:

i) un dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado;

ii) un dominio transmembrana; y

iii) un segmento intracelular que comprende a) un dominio citoplasmático truncado de la cadena beta del receptor de interleucina-2 que corresponde a la SEQ ID NO: 5 y b) un dominio intracelular de CD3 ζ caracterizado por tener un motivo de asociación a STAT3 exógeno que corresponde a YRHQ (SEQ ID NO: 22) en las posiciones 104-107 de SEQ ID NO: 7.

Como se describe en la presente descripción, el motivo de asociación a STAT3 exógeno es YXXQ (SEQ ID NO: 13).

El motivo de asociación a STAT3 exógeno corresponde a YRHQ (SEQ ID NO: 22) en las posiciones 104-107 de la SEQ ID NO: 7.

El motivo de asociación a STAT3 exógeno puede tener menos de 100 residuos de aminoácidos del extremo C terminal del CAR.

El motivo de asociación a STAT3 exógeno reemplaza los aminoácidos 156-158 de CD3 ζ .

Como se describe en la presente descripción, el uno o más dominios de señalización intracelular son o comprenden un dominio citoplasmático de una cadena del receptor de interleucina.

El dominio citoplasmático de una cadena del receptor de interleucina puede ser un fragmento truncado que comprende mínimamente un motivo de unión a JAK y un motivo de asociación a STAT5.

En una modalidad, el segmento intracelular comprende además un dominio coestimulador citoplasmático.

En otra modalidad, el dominio coestimulador citoplasmático es un dominio citoplasmático de CD28, CD2, CD4, CD5, CD8 α , CD8 β , CD134 o CD137.

En la presente descripción se describe un CAR que comprende i) un dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado, ii) un dominio transmembrana y iii) un segmento intracelular que comprende uno o más dominios de señalización intracelular que incluyen un dominio citoplasmático de una cadena del receptor de interleucina y opcionalmente al menos un dominio citoplasmático suplementario.

El dominio citoplasmático de una cadena del receptor de interleucina puede ser un fragmento truncado que comprende un motivo de asociación de tirosina quinasa y un motivo de asociación a STAT.

Como se describe en la presente descripción, el al menos un dominio citoplasmático suplementario es i) un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ , en donde opcionalmente el dominio de señalización intracelular de CD3 ζ comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno ii) y/o un dominio coestimulador citoplasmático de CD28.

La cadena del receptor de interleucina puede seleccionarse del grupo que consiste en la cadena β del receptor de interleucina 2 (IL-2R) y la cadena α del receptor de interleucina 21 (IL-21R).

Aún en otra modalidad, el dominio extracelular es y/o comprende una región de unión al antígeno de un anticuerpo que puede unirse al antígeno predeterminado.

En otra modalidad, la región de unión al antígeno del anticuerpo es o comprende un fragmento variable de cadena única de dicho anticuerpo.

En otra modalidad, el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en el dominio transmembrana de CD28 y el dominio transmembrana de CD8.

- En otra modalidad, el CAR comprende además un péptido señal, opcionalmente en el extremo N terminal.
- Otro aspecto incluye un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en la presente descripción.
- 5 En una modalidad, el ácido nucleico codifica un CAR conjugado a un péptido señal opcionalmente en donde el péptido señal está en el extremo N terminal del CAR.
- Un aspecto adicional incluye un vector que comprende un ácido nucleico descrito en la presente descripción.
- 10 Aun un aspecto adicional incluye una célula que expresa el CAR descrito en la presente descripción y/o se transfecta o transduce con el ácido nucleico o el vector descrito en la presente descripción.
- Aun un aspecto adicional incluye una composición que comprende un ácido nucleico o vector de CAR descrito en la 15 presente descripción, opcionalmente una preparación microsomal que comprende un CAR descrito en la presente descripción.
- La composición comprende un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 De acuerdo con la presente descripción, se proporcionan receptores de antígenos quiméricos, ácidos nucleicos que codifican dichos receptores de antígenos quiméricos, células que expresan dichos receptores de antígenos quiméricos y composiciones que comprenden cualquiera de los anteriores. En una modalidad, uno o más de los anteriores pueden usarse en el campo de la terapia génica de inmunidad adoptiva que se dirige a un antígeno tal como un antígeno tumoral y/o en el tamizaje u otros ensayos *in vitro*. El receptor de antígenos quiméricos de la 25 presente descripción puede introducirse en una célula, lo que da como resultado, por ejemplo, un aumento o elevación de la cantidad de expresión del receptor de antígenos quiméricos en la célula. Tal célula puede exhibir actividad citotóxica contra células que expresan el antígeno diana.
- En un aspecto, se proporciona un método para preparar la célula que exprese un CAR descrito en la presente descripción, el método comprende:
- 30 a) aislar células inmunitarias de un mamífero, opcionalmente en donde las células inmunitarias son células T;
 b) transfectar o transducir las células inmunitarias aisladas, opcionalmente células T, con un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en la presente descripción; y
 c) opcionalmente aislar y/o expandir las células que expresan CAR, opcionalmente células T que expresan CAR 35 después de la transfección o transducción.
- Otro aspecto es un CAR, un ácido nucleico, un vector, una célula o un uso en la composición descrita en la presente descripción, por ejemplo, para su uso en la reducción del número de células que expresan un antígeno predeterminado, tratar una enfermedad, prevenir una enfermedad y/o proporcionar inmunidad antitumoral en un 40 mamífero.
- Otro aspecto incluye el CAR, ácido nucleico, vector o célula para su uso en un método para disminuir en un sujeto el número de células que expresan un antígeno predeterminado, el método comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de células que expresan un CAR descrito en la presente descripción, en donde el CAR 45 se une específicamente al antígeno predeterminado.
- Otro aspecto es el CAR, ácido nucleico, vector, célula o composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad en un mamífero, el método comprende administrar al mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de células que expresan un CAR descrito en la presente descripción o una composición descrita en la 50 presente descripción.
- Un aspecto adicional es el CAR, ácido nucleico, vector, célula o composición para su uso en un método para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, el método comprende administrar al mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de células que expresan un CAR descrito en la presente descripción o una composición descrita en la 55 presente descripción.
- Otras características y ventajas de la presente descripción resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican modalidades preferidas de la descripción, se dan únicamente a modo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.
- 60 Breve descripción de los dibujos
- 65 La presente descripción se describirá ahora en relación con los dibujos en los que:
 La Figura 1 es un diagrama esquemático de constructos del receptor de antígenos quiméricos (CAR) anti-CD19.

La Figura 2 es una serie de gráficos de un análisis de citometría de flujo que muestra la eficiencia de transducción de células T primarias con constructos de CAR anti-CD19.

5 La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran la expresión superficial de CAR anti-CD19 de varios constructos.

La Figura 4 es una serie de gráficos que muestran la fosforilación de STAT3 y STAT5 en las células T transducidas con CAR anti-CD19 28-IL2RB-z(YXXQ).

10 La Figura 5 es una comparación gráfica de la actividad de la vía JAK-STAT en células T transducidas con CAR.

15 La Figura 6 es un esquema que ilustra un protocolo para la transducción y expansión de células T con constructo de CAR anti-CD19.

La Figura 7 es una serie de gráficos que muestran la expansión de células T transducidas con CAR después de la 15 transducción.

La Figura 8 es una serie de gráficos que muestran la expansión de células T transducidas con CAR después de la estimulación específica con CD19 con células K562-CD19.

20 La Figura 9 es una serie de gráficos que muestran la expansión de células T transducidas con CAR después del cocultivo con células K562 (control). La Figura 10 es una serie de gráficos que muestran la expansión de las células T transducidas con CAR después de la reestimulación específica con antígeno con células K562-CD19.

25 La Figura 11 es una serie de gráficos que muestran la tasa de división celular en células T transducidas con CAR.

La Figura 12 es un gráfico que muestra la viabilidad de las células T transducidas con CAR.

30 La Figura 13 es una serie de gráficos de análisis de citometría de flujo que muestran el fenotipo de superficie y los niveles de expresión de CD4+ y CD8+ de células T transducidas con CAR.

35 La Figura 14 es una serie de gráficos que muestran la frecuencia de las células T transducidas con CAR con un fenotipo marcador de células T de memoria similares a una célula madre (CD45RA⁺ CD62L⁺ CD95⁺).

La Figura 15 es una serie de gráficos que comparan la expresión de CD62L en células T transducidas con CAR.

40 La Figura 16 es una serie de gráficos que muestran la secreción de IL-2 e IFN-γ por células T transducidas con CAR.

La Figura 17 es un gráfico que muestra la lisis de células diana *in vitro* por células T transducidas con CAR.

45 La Figura 18 es un esquema que ilustra un protocolo para la inyección de ratones inmunodeficientes con la línea celular NALM-6 de leucemia linfoblástica aguda positiva para CD19 que expresa EGFP-luciferasa, seguida de una inyección con células T transducidas con CAR.

50 La Figura 19 es una serie de imágenes bioluminiscentes de la actividad luciferasa en los puntos de tiempo indicados después de la infusión de las células T transducidas con CAR anti-CD19.

La Figura 20 es un gráfico que muestra la curva de Kaplan-Meier para la supervivencia general de los ratones tratados con células T transducidas con CAR anti-CD19 (n=5 cada una).

55 La Figura 21 muestra la estructura de los CAR NFMC63-28Z, NFMC63-28-d2RbZ, NFMC63-28-21RaZ o NFMC63-28Z-21Ra usados en los Ejemplos.

La Figura 22 muestra células con fosforilación de STAT transducidas con los CAR de la Figura 21.

55 Descripción detallada

Como se usa en la presente descripción, un "receptor de antígenos químéricos (CAR)" significa una proteína fusionada que comprende un dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado, un segmento intracelular que comprende uno o más dominios citoplasmáticos derivados de proteínas transductoras de señales diferentes del polipéptido del cual se deriva un dominio extracelular y un dominio transmembrana. El "receptor de antígenos químéricos (CAR)" a veces se denomina un "receptor químérico", un "cuerpo T" o "receptor inmunitario químérico (CIR)". La frase "dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado" significa cualquier molécula proteica o parte de esta que puede unirse específicamente al antígeno predeterminado. El "dominio de señalización intracelular" significa cualquier oligopéptido o dominio polipeptídico conocido porque funciona para transmitir una señal que provoca la activación o inhibición de un proceso biológico en una célula, por ejemplo, la

activación de una célula inmunitaria tal como una célula T o una célula NK. Los ejemplos incluyen la cadena ILR, CD28 y/o CD3 ζ .

Como se usa en la presente descripción, "STAT3" o "Transductor de señal y activador de la transcripción 3" se refiere a un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas STAT. STAT3 también se conoce como "factor de respuesta de fase aguda", "APRF", "factor de transcripción APRF", proteína de unión al ADN APRF ", FLJ20882", proteína hipotética MGC16063", "factor de respuesta a IL-6", "Factor de respuesta a LIF (factor inhibidor de la leucemia)" o "STAT3_HUMAN". La proteína STAT3 participa en la regulación de genes que están implicados en el crecimiento y la división celular, el movimiento celular y la apoptosis celular. En el sistema inmunológico, STAT3 es un transductor de señales para la maduración de las células del sistema inmunológico tales como las células T y la célula B. Siegel y otros, han demostrado que STAT3 juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la memoria de las células T humanas (Siegel y otros, 2011).

Como se usa en la presente descripción, un "motivo de asociación a transductor de señal y activador de la transcripción 3' o un "motivo de asociación a STAT3" se refiere a una secuencia de aminoácidos (o un polinucleótido que codifica dicha secuencia de aminoácidos de acuerdo con el contexto) YXXQ (SEQ ID NO: 13) y que se une a STAT3 (por ejemplo, en el contexto de un polipéptido más largo/proteína). El motivo de asociación a STAT3 está presente en proteínas de señalización, por ejemplo, IL-6 e IL-10. El motivo de asociación a STAT3 también puede introducirse en dominios de señalización que no comprenden endógenamente el motivo de asociación a STAT3 (es decir, motivo de asociación a STAT3 exógeno). El término "motivo de asociación a STAT3 exógeno" significa un motivo de asociación a STAT3 que se introduce de forma recombinante en un dominio, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ , pero que no existe de forma nativa en dicho dominio o en la ubicación introducida en el dominio. Por ejemplo, un motivo de asociación a STAT3 exógeno YXXQ (SEQ ID NO: 13) puede introducirse en CD3 ζ . El motivo de asociación a STAT3 exógeno puede ser, por ejemplo, YRHQ (SEQ ID NO: 22). Un experto en la técnica apreciará que el motivo de asociación a STAT3 exógeno puede introducirse en CD3 ζ con el uso de diversas técnicas conocidas en la técnica.

Como se usa en la presente descripción, un "motivo de asociación a transductor de señal y activador de la transcripción 5" o un "motivo de asociación a STAT5" se refiere a una secuencia de aminoácidos (o un polinucleótido que codifica dicha secuencia de aminoácidos de acuerdo con el contexto) que comprende un residuo de tirosina y que se une a STAT5. Por ejemplo, el motivo de asociación a STAT5 de la cadena β de IL-2R comprende el residuo de tirosina 510 (residuo de tirosina 510 que es el aminoácido número 536 de NCBI Ref-Seq:NP_000869.1, por ejemplo, 271 de la SEQ ID NO: 11). Por ejemplo, el motivo de asociación a STAT5 comprende los residuos de aminoácidos YXXL (SEQ ID NO: 41). Por ejemplo, el motivo de asociación a STAT5 comprende los residuos de aminoácidos YLSL (SEQ ID NO: 43).

La expresión "motivo de asociación exógeno" significa cualquier motivo de asociación que se introduce de forma recombinante en un dominio, por ejemplo, un dominio de señalización intracelular tal como un dominio citoplasmático de una cadena del receptor de interleucina, un dominio coestimulador citoplasmático o un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ , pero que no existe de forma nativa en dicho dominio o en la ubicación introducida en el dominio. Por ejemplo, un motivo de unión a JAK exógeno puede insertarse en un dominio de señalización intracelular, por ejemplo, un dominio citoplasmático de una cadena del receptor de interleucina.

El "motivo de unión a JAK" usado en la presente descripción se refiere a un motivo BOX-1 que permite la asociación de tirosina quinasa a JAK, por ejemplo, JAK1. El motivo de unión a JAK puede ser, por ejemplo, los aminoácidos números 278 a 286 de NCBI Ref-Seq:NP_000869.1 (aminoácidos 13 a 21 de la SEQ ID NO: 11).

Como se usa en la presente descripción, un "dominio" significa una región en un polipéptido, por ejemplo, que está plegada en una estructura particular independientemente de otras regiones y/o tiene una función particular. El dominio puede ser, por ejemplo, la porción citoplasmática de una molécula o una parte de esta. Como se usa en la presente descripción, el "dominio citoplasmático" de una molécula puede referirse al dominio citoplasmático completo o una parte de este que induce una señal intracelular cuando se activa.

El término "variante" significa una molécula que comprende la sustitución, delección o adición de uno o unos pocos a una pluralidad de aminoácidos, e incluye moléculas particularmente sustituidas de forma conservadora, siempre que la variante conserve sustancialmente la misma función que la secuencia original. Por ejemplo, las variantes del receptor de IL pueden comprender sustituciones, delecciones o adiciones fuera del motivo de unión a JAK y del motivo de asociación a STAT. Por ejemplo, una variante de la cadena del receptor de IL puede comprender delecciones y/o sustituciones conservadoras de hasta 50, hasta 40, hasta 30, hasta 20 o hasta 10 aminoácidos, en una región fuera de los motivos de unión a JAK y de asociación a STAT. De manera similar, las variantes de otras moléculas pueden comprender delecciones y/o sustituciones conservadoras de hasta 50, hasta 40, hasta 30, hasta 20 o hasta 10 aminoácidos, en una región fuera de una región identificada específicamente en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, la frase "en donde el segmento intracelular comprende un motivo de unión a JAK y un motivo de asociación a STAT5 endógeno o exógeno" significa, en el caso en donde el segmento

intracelular comprende más de un dominio citoplasmático, que el motivo de unión a JAK y el motivo de asociación a STAT5 puede estar en el mismo dominio citoplasmático o puede estar en dominios citoplasmáticos separados.

5 La expresión "dominio citoplasmático suplementario" como se usa en la presente descripción en el contexto de un CAR que comprende un dominio citoplasmático de una cadena del receptor de interleucina (ILR) es un dominio citoplasmático de una proteína transductora de señales que no está comprendida en la cadena de ILR.

10 Como se usa en la presente descripción, un "antígeno tumoral" significa una molécula biológica que tiene antigenicidad, cuya expresión llega a reconocerse en asociación con la alteración maligna de una célula. El antígeno tumoral en la presente descripción incluye un antígeno específico del tumor (un antígeno que está presente solo en las células tumorales y no se encuentra en otras células normales) y un antígeno asociado al tumor (un antígeno que también está presente en otros órganos y tejidos o células normales heterogéneas y alogénicas, o un antígeno que se expresa durante el desarrollo y/o diferenciación).

15 Como se usa en la presente descripción, un "receptor de interleucina (IL)" significa un receptor de citocina para una interleucina. Existen dos familias principales de receptores de IL, los receptores de citocinas de tipo 1 y de tipo 2. Los receptores de interleucina de tipo 1 incluyen el receptor de IL-2, receptor de IL-3, receptor de IL-4, receptor de IL-5, receptor de IL-6, receptor de IL-7, receptor de IL-9, receptor de IL-11, receptor de IL-12, receptor de IL-13, receptor de IL-15, receptor de IL-21, receptor de IL-23 y receptor de IL-27. Los receptores de IL de tipo 2 incluyen el receptor de IL-10, receptor de IL-20, receptor de IL-22 y receptor de IL-28. El receptor de IL está compuesto por múltiples cadenas polipeptídicas. En la presente descripción, por ejemplo, la cadena β del receptor de IL-2 se abrevia a veces como IL2R β o IL-2R β .

25 El término "anticuerpo" como se usa en la presente descripción pretende incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos químéricos de ratón-humano, anticuerpos humanizados, así como también anticuerpos murinos, bovinos, de conejo, de rata, de cabra, humanos y otros anticuerpos derivados de organismos. El anticuerpo puede provenir de fuentes recombinantes y/o producirse en animales transgénicos. El anticuerpo también puede ser sintético. El término "fragmento de anticuerpo" como se usa en la presente descripción, pretende incluir sin limitaciones Fab, Fab', F(ab')2, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, heterodímeros, minicuerpos, diacuerpos y 30 multímeros de estos, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos y anticuerpos de dominio. Los anticuerpos pueden fragmentarse con el uso de técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')2 mediante el tratamiento del anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')2 resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaina puede conducir a la formación de fragmentos Fab. Fab, Fab' y F(ab')2, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos 35 y otros fragmentos también pueden sintetizarse mediante técnicas recombinantes.

40 Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos. Para producir anticuerpos monoclonales humanos y/o fragmentos de unión de estos, pueden cosecharse células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un ser humano que tiene cáncer y fusionarse con células de mieloma mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas inmortalizando de este modo estas células y produciendo células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256:495-497 (1975)) así como también otras técnicas tales como la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor y otros, Immunol. Today 4:72 (1983)), la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y otros, Methods Enzymol., 121:140-67 (1986)), y el tamizaje de bibliotecas de 45 anticuerpos combinatorios (Huse y otros, Science 246:1275 (1989)). Las células de hibridoma pueden tamizarse inmunquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con células cancerosas y los anticuerpos monoclonales pueden aislar.

50 Como se usa en la presente descripción, un "fragmento variable de cadena única (scFv)" significa un polipéptido de cadena única derivado de un anticuerpo que mantiene la capacidad de unirse a un antígeno. Un ejemplo de scFv incluye un polipéptido de anticuerpo que se forma mediante una técnica de ADN recombinante y en el que las regiones Fv de los fragmentos de cadena pesada (cadena H) y cadena ligera (cadena L) de inmunoglobulina están unidas mediante una secuencia separadora. Se conocen varios métodos para preparar un scFv, e incluyen los métodos descritos en la patente de Estados Unidos núm. 4694778, Science, vol. 242, págs. 423-442 (1988), Nature, vol. 334, pág. 54454 (1989) y Science, vol. 242, págs. 1038-1041 (1988).

60 El término "CD3 ζ ", como se usa en la presente descripción, se refiere a todas las especies de mamíferos, preferentemente seres humanos, de la agrupación del coreceptor de células T de diferenciación 3 (CD3). En los mamíferos, CD3 comprende una cadena ζ de CD3, una cadena delta de CD3 y dos cadenas épsilon de CD3. La cadena CD3 ζ (por ejemplo, NCBI RefSeq:NP_932170.1) comprende un dominio de señalización intracelular (por ejemplo, SEQ ID NO: 7) que puede usarse para diseñar el CAR de la presente descripción.

65 El término "28-z", como se usa en la presente descripción, se refiere a un constructo de CAR generado al unir un fragmento variable de cadena única (scFv) derivado de FMC63 a un dominio transmembrana de CD28 y un dominio intracelular de CD3 ζ .

El término "28-BB-z", como se usa en la presente descripción, se refiere a un constructo de CAR generado al unir un fragmento variable de cadena única derivado de FMC63 (scFv) a un dominio transmembrana de CD28 y además a un dominio de señalización intracelular de 4-1BB y un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ .

- 5 El término "28-IL2RB-z(YXXQ)", como se usa en la presente descripción, se refiere a un constructo de CAR generado al unir un fragmento variable de cadena única (scFv) derivado de FMC63 a un dominio transmembrana de CD28, a un dominio citoplasmático de IL-2R β que comprende un motivo BOX 1 implicado en la señalización de JAK (por ejemplo, comprende un motivo de unión a JAK) y un residuo de tirosina en la posición 510 para la asociación a STAT5, y además de un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo YXXQ exógeno (SEQ ID NO: 13) implicado en la asociación a STAT3.

10 La expresión "secuencia de ácido nucleico", como se usa en la presente descripción, se refiere a una secuencia de monómeros de nucleósidos o nucleótidos que consiste en bases, azúcares y enlaces entre azúcares (cadena principal) de origen natural. La expresión también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros de origen no natural o porciones de estos. Las secuencias de ácido nucleico de la presente solicitud 15 pueden ser secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases de origen natural que incluyen adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas. Los ejemplos de tales bases modificadas incluyen aza y deaza adenina, 20 guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina.

25 La expresión "ácido nucleico aislado" como se usa en la presente descripción se refiere a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos, u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Un ácido nucleico aislado también está sustancialmente libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) del que se deriva el ácido nucleico. La expresión "ácido nucleico" pretende incluir ADN y ARN y puede ser bicatenario o monocatenario, y representa la cadena sentido o antisentido. Además, la expresión "ácido nucleico" incluye las secuencias de ácido nucleico complementarias, por ejemplo, ADNc.

30 La expresión "polipéptido aislado", también denominado "proteína aislada", se refiere a un polipéptido sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente.

35 El término "aminoácido" incluye todos los aminoácidos de origen natural, así como también los aminoácidos modificados.

Una "variación conservadora de aminoácidos", como se usa en la presente descripción, es una en la que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido sin eliminar las propiedades deseadas de la proteína.

40 El término "sujeto", como se usa en la presente descripción incluye todos los miembros del reino animal incluido un ser humano.

45 Como se usa en la presente descripción, y como se entiende bien en la técnica, "tratamiento" o "tratar" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afeciones, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, prevención de la propagación de la enfermedad, retardo o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejoría o palieación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" o "tratar" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Paliar una enfermedad o trastorno significa que la extensión y/o las manifestaciones clínicas indeseables de un trastorno o estado de enfermedad se reducen y/o el curso temporal de la progresión se ralentiza o alarga, en comparación con no tratar el trastorno.

55 Como se usa en la presente descripción, la frase "tratar o prevenir el cáncer" se refiere a inhibir la replicación de las células cancerosas, proporcionar inmunidad antitumoral, inhibir la propagación del cáncer (metástasis), inhibir el crecimiento tumoral, reducir el número de células cancerosas o el crecimiento tumoral, o mejorar los síntomas relacionados con el cáncer.

60 El término "administrado" como se usa en la presente descripción significa la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo, de células que expresan un CAR para reducir y/o inhibir la propagación de células que expresan el antígeno predeterminado o una composición de la solicitud a un paciente.

65 Para comprender el alcance de la presente descripción, el término "que comprende" y sus derivados, como se usa en la presente descripción, pretenden ser términos abiertos que especifiquen la presencia de las características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas indicados, pero no excluya la presencia de otras características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o etapas no indicados. Lo anterior también se

aplica a palabras que tienen significados similares, tales como los términos "que incluye", "que tiene" y sus derivados. Finalmente, términos de grado tales como "sustancialmente", "alrededor de" y "aproximadamente" como se usan en la presente descripción significan una cantidad razonable de desviación del término modificado de manera que el resultado final no cambia significativamente. Estos términos de grado deben interpretarse como que incluyen una desviación de al menos $\pm 5\%$ del término modificado si esta desviación no niega el significado de la palabra que modifica.

Como se usa en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. También debe tenerse en cuenta que el término "o" se emplea generalmente en su sentido que incluye "y/o" a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Se pretende que las definiciones y modalidades descritas en secciones particulares sean aplicables a otras modalidades descritas en la presente descripción para las que son adecuadas, tal como lo entendería un experto en la técnica.

La enumeración de intervalos numéricos por puntos finales en la presente descripción incluye todos los números y fracciones subsumidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,90, 4 y 5). También debe entenderse que se supone que todos los números y fracciones de estos están modificados por el término "alrededor de".

Además, se pretende que las definiciones y modalidades descritas en secciones particulares sean aplicables a otras modalidades descritas en la presente descripción para las que son adecuadas, como entendería un experto en la técnica. Por ejemplo, en los siguientes pasajes, se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención.

Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

(1) CAR de la presente descripción

En la presente descripción se proporciona un CAR que comprende i) un dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado, ii) un dominio transmembrana y iii) un segmento intracelular que comprende un dominio citoplasmático truncado de la cadena beta del receptor de interleucina-2 que corresponde a la SEQ ID NO: 5, y un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno, que corresponde a YRHQ (SEQ ID NO: 22) en las posiciones 104-107 de SEQ ID NO: 7. En una modalidad, los dominios se fusionan directamente o indirectamente, opcionalmente, en el orden anterior comenzando desde el extremo N-terminal. En una modalidad, los dominios en el segmento intracelular se fusionan en orden inverso.

También se describe en la presente descripción un CAR que comprende i) un dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado, ii) un dominio transmembrana y iii) un segmento intracelular que comprende uno o más dominios de señalización intracelular que incluyen un dominio citoplasmático de una cadena del receptor de IL y opcionalmente en al menos un dominio citoplasmático suplementario. Como se describe en la presente descripción, los dominios se fusionan directamente o indirectamente, opcionalmente, en el orden anterior comenzando desde el extremo N-terminal. Como se describe en la presente descripción, los dominios en el segmento intracelular se fusionan en un orden inverso.

En algunas modalidades, la cadena del receptor de IL está próxima al dominio transmembrana y/o está hacia o forma el extremo N-terminal del segmento intracelular de CAR. En otras modalidades, la cadena del receptor de IL está hacia o forma el extremo C-terminal del segmento intracelular en el CAR. En algunas modalidades, la cadena del receptor de IL está corriente arriba o N-terminal del dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que comprende el motivo de asociación a STAT3 exógeno en el CAR.

Como se describe en la presente descripción, cuando el segmento intracelular de CAR comprende solo dominios de señalización de la cadena del receptor de IL, las células que expresan el CAR pueden ser activadas por un antígeno predeterminado presentado en un complejo MHC a través de TCR endógenos y/o por moléculas CD80/86 a través de CD28 endógeno, por ejemplo, por células B.

También se proporciona una célula que expresa un CAR de la presente descripción. Una célula de este tipo puede tener, por ejemplo, una tasa de proliferación aumentada y/o una capacidad de supervivencia aumentada, puede producir cantidades aumentadas de citocinas y/o puede tener una actividad citotóxica aumentada contra una célula que tiene, en la superficie, el antígeno predeterminado/preseleccionado al que se une en relación con una célula progenitora que no expresa el CAR. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos, las células T transducidas con CAR de acuerdo con la invención tienen un aumento de la división, proliferación y viabilidad celular, proporcionan efectos antitumorales y mejoran la supervivencia general en ratones que reciben dichas células como tratamiento.

(a) Dominio extracelular

- El "dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado" usado para el CAR de la presente descripción es un dominio que comprende una molécula proteica o parte de esta que puede unirse a un antígeno diana e incluye, por ejemplo, un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo y un dominio de unión al ligando de un receptor. Este dominio se une e interactúa con un antígeno presente en la superficie celular y, por lo tanto, imparte especificidad a una célula que expresa un CAR. Por ejemplo, el dominio extracelular usado para el CAR de la presente descripción comprende y/o se deriva de regiones variables de un anticuerpo (por ejemplo, cadena H y cadena L), cadenas únicas y fragmentos de unión de estas o un TCR (TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ), o se deriva del ectodominio de CD4, CD8 α , CD8 β , CD11A, CD11B, CD11C, CD18, CD29, CD49A, CD49B, CD49D, CD49E, CD49F, CD61, CD41 y/o CD51. Puede usarse toda la región de estas proteínas. Por otro lado, puede usarse un dominio que puede unirse a un antígeno o un ligando, por ejemplo, un fragmento Fab de anticuerpo, una región variable de anticuerpo [región V de la cadena H (VH) y región V de la cadena L (VL)] o un dominio de unión a ligando extracelular de un receptor. Particularmente, en una modalidad, puede usarse un fragmento variable de cadena única (scFv). Por ejemplo, el ectodominio de CD4 puede reconocer células infectadas por VIH.
- El dominio extracelular para el CAR de la presente descripción puede unirse a un solo antígeno o ligando, o unirse a dos o más antígenos o ligandos. Además, la presente descripción incluye tanto un CAR que comprende un dominio extracelular como un CAR que comprende dos o más dominios extracelulares.
- El dominio extracelular para el CAR de la presente descripción puede seleccionarse de anticuerpos que reconocen un antígeno diana, opcionalmente un antígeno de superficie celular o un antígeno soluble, o moléculas que interactúan con el antígeno. Los ejemplos del antígeno incluyen un antígeno viral, un antígeno bacteriano (particularmente, bacterias infecciosas), un antígeno de parásito, un marcador de superficie celular en una célula diana relacionada con una determinada afección (por ejemplo, un antígeno tumoral) y una molécula de superficie de un inmunocito.
- La presente descripción en un aspecto proporciona un CAR que puede unirse a un antígeno derivado de Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana tales como VIH-1 y VIH-LP), Picornaviridae (por ejemplo, poliovirus, virus de la hepatitis A, enterovirus, coxsackievirus humano, rinovirus, y echovirus), virus de la rubéola, coronavirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus del ébola, virus de la parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, virus de la influenza, virus de la hepatitis B, parvovirus, Adenoviridae, Herpesviridae [por ejemplo, virus del herpes simple (HSV) tipo 1 y tipo 2, virus varicelazoster, citomegalovirus (CMV) y virus del herpes], Poxviridae (por ejemplo, virus de la viruela, virus vaccinia y virus de la viruela) o virus de la hepatitis C.
- En otro aspecto la presente descripción proporciona un CAR que puede unirse a un antígeno derivado de una cepa bacteriana de Staphylococci, Streptococcus, Escherichia coli, Pseudomonas o Salmonella. En particular, la presente descripción proporciona un CAR que puede unirse a un antígeno derivado de una bacteria infecciosa, por ejemplo, Helicobacter pyloris, Legionella pneumophilia, una cepa bacteriana de Mycobacteria spp. (por ejemplo, M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. kansaii o M. gordonea), Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Streptococcus del grupo A, Streptococcus del grupo B (Streptococcus agalactiae), Streptococcus pneumoniae o Clostridium tetani.
- La presente descripción en otro aspecto proporciona un CAR que puede unirse a un antígeno tumoral tal como 5T4, α 5β1-integrina, 707-AP, AFP, ART-4, B7H4, BAGE, β-catenina/m, Bcr-abl, Anticuerpo MN/C IX, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CD4, CD19, CD20, CD22, CD25, CDC27/m, CD30, CD33, CD52, CD56, CD80, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, EGFR, ErbB3, ELF2M, EMMPRIN, EpCam, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/new, HLA-A*0201-R1701, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT (o hTRT), iCE, IGF-1R, IL-2R, IL-5, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/melan-A, MART-2/Ski, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, PAP, proteinasa-3, p190 minor bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, PSA, PSM, PSMA, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, survivina, TEL/AML1, TGF β , TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, VEGF, WT1, NY-Eso-1 o NY-Eso-B. La presente descripción también proporciona un CAR que puede unirse a una molécula de adhesión a la superficie celular, una molécula de superficie de una célula inflamatoria que aparece en una enfermedad autoinmunitaria, o un TCR que provoca autoinmunidad.
- (b) Segmento intracelular
- El segmento intracelular del CAR de acuerdo con la presente descripción es una molécula proteica que comprende los dominios de señalización intracelular y que puede transducir una señal en una célula cuando el dominio extracelular presente dentro de la misma molécula se une a (interactúa con) su antígeno/ligando afín.
- El segmento intracelular de CAR comprende un dominio de señalización intracelular de CD3ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno que corresponde a YRHQ (SEQ ID NO:22) en la posición 104-107 de la SEQ ID NO: 7. Además, el segmento intracelular de CAR comprende un dominio citoplasmático truncado de la cadena beta del receptor de interleucina-2 que corresponde a la SEQ ID NO: 5. El segmento intracelular puede comprender un motivo de unión a JAK endógeno o exógeno y un motivo de asociación a STAT5.

- Una secuencia de señalización citoplasmática primaria puede regular la activación primaria de un complejo de TCR. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular de CD3 ζ proporciona una señal citoplasmática primaria. La secuencia de señalización citoplasmática primaria puede comprender un motivo de transducción de señales conocido como un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) [Nature, vol. 338, págs. 383-384 (1989)]. Por otro lado, una secuencia de señalización citoplasmática primaria que actúa de forma inhibidora comprende un motivo de transducción de señales conocido como un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) [J Immunol., vol. 162, núm. 2, págs. 897-902 (1999)]. En la presente descripción, puede usarse un dominio de señalización intracelular que tiene un ITAM y/o un ITIM.
- Los ejemplos de dominios de señalización intracelular que tienen un ITAM que pueden usarse, por ejemplo, en lugar de o para reemplazar CD3 ζ , incluyen dominios de señalización intracelular que tienen ITAM derivado de CD3 ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Específicamente, los ejemplos de dominios intracelulares que comprenden uno o más ITAM incluyen péptidos que tienen secuencias de aminoácidos números 52 a 164 (SEQ ID NO.: 7) de CD3 ζ (NCBI RefSeq: NP_932170.1), aminoácidos números 45 a 86 de Fc ϵ R $\text{I}\gamma$ (NCBI RefSeq: NP_004097.1), aminoácidos números 201 a 244 de Fc ϵ R $\text{I}\beta$ (NCBI RefSeq: NP_000130.1), aminoácidos números 139 a 182 de CD3 γ (NCBI RefSeq: NP_000064.1), aminoácidos números 128 a 171 de CD3 δ (NCBI RefSeq: NP_000723.1), aminoácidos números 153 a 207 de CD3 ϵ (NCBI RefSeq: NP_000724.1), aminoácidos números 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2), aminoácidos números 707 a 847 de CD22 (NCBI RefSeq: NP_001762.2), aminoácidos números 166 a 226 de CD79a (NCBI RefSeq: NP_001774.1), aminoácidos números 182 a 229 de CD79b (NCBI RefSeq: NP_000617.1) y aminoácidos números 177 a 252 de CD66d (NCBI RefSeq: NP_001806.2) y sus variantes tienen la misma función que estos péptidos. La numeración de aminoácidos basada en la información de la secuencia de aminoácidos de NCBI RefSeq ID o GenBank descrita en la presente descripción se numera en base a la longitud completa del precursor (que comprende una secuencia de péptido señal, etc.) de cada proteína.
- Como se describe en la presente descripción, cuando CD3 ζ se reemplaza con uno de los anteriores, el motivo de asociación a STAT3 exógeno se introduce en el reemplazo de CD3 ζ .
- La señalización del factor de transcripción STAT3 juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la memoria de las células T humanas (Siegel y otros, 2011). La señalización de STAT3 también puede potenciar en las células T los efectos antitumorales in vivo (Blood. 2010 y J Exp Med. 2005).
- Como se describe en la presente descripción, el motivo de asociación a STAT3 exógeno es YXXQ (SEQ ID NO: 13). Como se demostró, el motivo de asociación a STAT3 exógeno YXXQ (SEQ ID NO: 13) comprendido en el dominio de señalización intracelular de un péptido transductor de señal CD3 ζ puede unirse a STAT3. El dominio intracelular de CD3 ζ es la secuencia en la SEQ ID NO: 7.
- Como se describe en la presente descripción, los residuos de aminoácidos representados por "X" en el motivo de asociación a STAT3 YXXQ (SEQ ID NO: 13) pueden ser cualquier aminoácido de origen natural, incluido cualquier aminoácido de origen natural modificado que mantiene la unión a STAT3. Como se describe en la presente descripción, el aminoácido X se elige independientemente de leucina, arginina, histidina, fenilalanina, lisina, prolina, metionina, valina, glutamina, treonina y aspartato. Por ejemplo, el aminoácido X es arginina. Por ejemplo, el aminoácido X es histidina.
- Los dos residuos de aminoácidos que flanquean el residuo de tirosina son arginina-histidina. El motivo de asociación a STAT3 exógeno es YRHQ (SEQ ID NO: 22).
- Aunque el motivo de asociación a STAT3 exógeno YXXQ (SEQ ID NO: 13) puede introducirse en cualquier porción del dominio intracelular de CD3 ζ , el motivo de asociación a YXXQ descrito en la presente descripción se inserta cerca de la región del extremo C-terminal. Sin desear estar unido a la teoría, muchos motivos YXXQ endógenos están ubicados cerca o dentro de los 100 aa del extremo C-terminal. También se ha demostrado que un motivo YXXQ ubicado cerca de la región del extremo C-terminal es más funcional que el de un sitio más próximo en los estudios de GP130 y LIFR (Schmitz J y otros, J Immunol. 2000; 164:848-54; Tomida M y otros, Sangre. 1999; 93:1934-41).
- Como se describe en la presente descripción, el motivo de asociación a STAT3 exógeno YXXQ (SEQ ID NO: 13) se introduce en cualquier porción del dominio intracelular de CD3 ζ que se ubica dentro de 200 residuos de aminoácidos desde el extremo C terminal del CAR. Por ejemplo, el motivo de asociación a STAT3 puede introducirse menos de 200, menos de 150, menos de 100, menos de 90, menos de 80, menos de 70, menos de 60, menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20 o menos de 10 residuos de aminoácidos del extremo C del CAR.
- Como se describe en la presente descripción, el dominio intracelular de CD3 ζ comprende, como se describe en la presente descripción, los motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM). Como se describe en la presente descripción, el motivo de asociación a STAT3 exógeno se introduce en otro lugar que en un ITAM.
- Los ITAM son funcionalmente redundantes; sin embargo, tienen efectos aditivos con respecto a la fuerza de las

respuestas de señalización. Por ejemplo, el dominio intracelular de CD3 ζ comprende tres ITAM para la señalización intracelular. Pueden mantenerse los motivos ITAM en el dominio intracelular de CD3 ζ del CAR descrito en la presente descripción.

5 En una modalidad, el dominio intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno comprende al menos un motivo ITAM. En una modalidad, el dominio intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno comprende dos motivos ITAM. Como se describe en la presente descripción, el dominio intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno comprende tres motivos ITAM.

10 El experto en la técnica apreciará que pueden usarse varios métodos para introducir un motivo de asociación a STAT3 en el dominio de señalización intracelular de CD3 ζ . Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, puede introducirse un motivo de asociación a STAT3 exógeno al sustituir los residuos de aminoácidos Leu-His-Met en la posición 104-106 con una tirosina en el residuo 104 y cualesquiera otros dos residuos de aminoácidos que flanquean el residuo de tirosina en las posiciones 105 y 106, lo que forma de este modo el motivo de asociación YXXQ (SEQ ID NO: 13). Los residuos de aminoácidos 104-105-106 del dominio de señalización intracelular de CD3 ζ corresponden a los residuos de aminoácidos 156-157-158 de la CD3 ζ de longitud completa (por ejemplo, NCBI RefSeq: NP_932170.1). La secuencia de 28-IL2RB-z(YXXQ) que comprende un motivo YXXQ en los residuos 104-107 del dominio intracelular de CD3 ζ se proporciona en la SEQ ID NO: 24. La secuencia de 28-IL2RB-z(YRHQ) que comprende un motivo YRHQ (SEQ ID NO: 22) en los residuos 104-107 del dominio intracelular de CD3 ζ (se muestra un dominio intracelular de CD3 ζ en los residuos 475-586 de la SEQ ID NO: 25).

25 Por ejemplo, el motivo STAT3 puede introducirse mediante mutagénesis dirigida a sitio con el uso, por ejemplo, del método de ensamblaje de Gibson. Pueden usarse los siguientes cebadores para el ensamblaje de Gibson: directo, ACGCCTATGCCATCAGGCCCTGC (SEQ ID NO: 26); e inverso, CTGATGGCGATAAGCGTCGTAGGTGT (SEQ ID NO: 27). Otros métodos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, tecnologías basadas en PCR, por ejemplo, clonación con extensión incompleta de cebadores por polimerasa (PIPE), clonación independiente de secuencia y ligación (SLIC) y clonación con extensión de superposición (OEC) (Klock y otros, 2008; Li y otros, 2007; Bryskin y otros, 2010; Unger y otros, 2010).

30 Como se describe en la presente descripción, el CAR comprende un segmento intracelular que comprende uno o más dominios de señalización intracelular seleccionados de un dominio citoplasmático de una cadena de ILR y un dominio coestimulador citoplasmático.

35 El dominio citoplasmático de una cadena del receptor de IL puede seleccionarse de cualquier cadena del receptor de IL, por ejemplo, puede usarse el dominio citoplasmático que comprende los aminoácidos números 266 a 551 de la cadena β del receptor de IL-2 (NCBI REFSEQ: NP_000869.1) (SEQ ID NO: 11, aminoácidos números 256 a 538 de la cadena α del receptor de IL-21 (NCBI REFSEQ: NP_068570.1; SEQ ID NO: 6) aminoácidos números 284 a 369 de la cadena γ del receptor de IL-2 común (NCBI REFSEQ: NP_000197.1), aminoácidos números 265 a 459 de IL-4Ra (NCBI REFSEQ: NP_002176.2), aminoácidos números 292 a 521 de IL-9Ra (NCBI REFSEQ: NP_002177.2) o aminoácidos números 257 a 825 de IL-4Ra (NCBI REFSEQ: NP_000409.1). Puede usarse toda la región del dominio citoplasmático de la cadena del receptor de IL (por ejemplo, las secuencias proporcionadas en la presente descripción).

45 Alternativamente, también puede usarse un fragmento truncado de dicho dominio citoplasmático de la cadena del receptor de IL. Por ejemplo, el fragmento truncado comprende hasta 250 aminoácidos, o tiene de 50 a 200 aminoácidos o de 80 a 150 aminoácidos del dominio citoplasmático de ILR.

50 Como se describe en la presente descripción, el dominio citoplasmático de la cadena del receptor de IL, opcionalmente un fragmento truncado de dicho dominio citoplasmático de la cadena del receptor de IL comprende al menos un motivo de asociación a STAT, opcionalmente un motivo de asociación a STAT5 y un motivo de unión a JAK (también conocido como motivo box-1). Como se describe en la presente descripción el dominio citoplasmático de la cadena del receptor de IL o su fragmento truncado comprende un motivo de asociación a STAT5 y un motivo de unión a JAK.

55 Como se describe en la presente descripción, el dominio citoplasmático y/o los fragmentos truncados de la cadena del receptor de IL incluyen variantes que tienen la misma función, por ejemplo, variantes que inducen la señalización de STAT, opcionalmente la señalización de STAT5 y/o la señalización de JAK.

60 En un aspecto de la presente descripción, puede usarse el dominio citoplasmático de la cadena β del receptor de IL-2 (IL-2R). Un ejemplo de un dominio citoplasmático de la cadena β de IL-2R que puede usarse en la presente descripción incluye los aminoácidos números 266 a 551 de la cadena β de IL-2R (NCBI RefSeq: NP_000869.1, SEQ ID NO: 11). En todos los aspectos de la invención, se usa un fragmento truncado del dominio citoplasmático de la cadena β de IL-2R que corresponde a la SEQ ID NO: 5. Como se describe en la presente descripción, un fragmento truncado puede comprender i) un motivo de unión a JAK (por ejemplo, aminoácidos números 278 a 286 de NCBI Ref-Seq: NP_000869.1), también denominado motivo BOX-1, que permite la asociación con la tirosina quinasa

JAK1, y ii) un motivo de asociación a STAT, opcionalmente un motivo de asociación a STAT5 o a STAT3. Pueden variarse otras porciones de la cadena del receptor de IL, por ejemplo, con variaciones conservadoras de aminoácidos.

- 5 El segmento intracelular puede comprender un motivo de unión a JAK exógeno o una molécula de señalización que comprende un motivo de unión a JAK. Por ejemplo, el motivo de unión a JAK proviene de IL2Rgamma (IL2RG), receptor de eritropoyetina (EpoR), receptor de trombopoietina (TpoR), receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSFR) y receptor de la hormona del crecimiento (GHR).
- 10 La cadena β de IL-2R comprende tres motivos de unión a STAT5 funcionales, YFFF (SEQ ID NO: 28), YCTF (SEQ ID NO: 29) y YLSL (SEQ ID NO: 43), usados para la asociación a STAT5. Las mutaciones de estos residuos de tirosina pueden eliminar la respuesta a IL-2 de la cadena β de IL-2R (Friedmann y otros, 1996). Se ha descrito que el receptor de eritropoyetina (EpoR) comprende dos residuos de tirosina que median la activación de STAT5, a saber, Y343 e Y401 y ambos tienen motivos YXXL (SEQ ID NO: 41) (Klingmuller y otros, 1996). Por lo tanto, YXXL (SEQ ID NO: 41) puede ser un motivo preferido para el reclutamiento de STAT5. Otros residuos de aminoácidos también son funcionales, como se muestra, por ejemplo, con los motivos de unión a STAT5 de la cadena β de IL-2R. Como se describe en la presente descripción, el motivo de asociación a STAT5 es el motivo de asociación a STAT5 de la cadena β de IL-2R y comprende el residuo 510 de tirosina (el residuo 510 de tirosina es el aminoácido número 536 de NCBI RefSeq: NP_000869.1).
- 15 20 Como se describe en la presente descripción, un motivo de asociación a STAT5 puede derivarse de IL2Rgamma, EpoR, TpoR, GM-CSFR y GHR.
- 25 Como se describe en la presente descripción, el motivo de asociación a STAT5 de la cadena β de IL-2R comprende los residuos de aminoácidos YXXL (SEQ ID NO: 41). Como se describe en la presente descripción, los residuos de aminoácidos representados por "X" en el motivo de asociación a STAT5 pueden ser cualquier aminoácido de origen natural, incluido cualquier aminoácido de origen natural modificado que mantiene la unión a STAT5.
- 30 30 El motivo de asociación a STAT5 comprende el residuo 510 de tirosina y los 4 residuos flanqueantes en el lado C-terminal del residuo 510 de tirosina, es decir, YLSLQ (SEQ ID NO:12).
- 35 El motivo de asociación a STAT5 puede existir de forma endógena en un dominio citoplasmático. Por ejemplo, el dominio citoplasmático de la cadena beta de IL-2R comprende un motivo de asociación a STAT5. El motivo de asociación a STAT5 también puede introducirse en un dominio citoplasmático que no expresa naturalmente este motivo. Por ejemplo, la asociación a STAT5 puede introducirse, por ejemplo, mediante sustitución o inserción de residuos de aminoácidos, con el uso de métodos conocidos que incluyen los descritos en la presente descripción.
- 40 45 También se conocen otros motivos de asociación a STAT3 e incluyen, por ejemplo, YLRQ (SEQ ID NO: 30) para IL21R; YRHQ (SEQ ID NO: 22), YFKQ (SEQ ID NO: 31), YLPQ (SEQ ID NO: 32) y YMPQ (SEQ ID NO: 33) para IL6ST; YVLQ (SEQ ID NO: 34) para GCSFR, YQPQ (SEQ ID NO: 35), YKPQ (SEQ ID NO: 36) e YRPQ (SEQ ID NO: 37) para LIFR; YTHQ (SEQ ID NO: 38) para FGFR1; YLRQ (SEQ ID NO: 30) y YLKQ (SEQ ID NO: 39) para IL10RA y YHNQ (SEQ ID NO: 40) para EGFR (Shao y otros, 2004).
- 50 55 Como se describe en la presente descripción, el segmento intracelular comprende motivos de asociación a STAT3 y STAT5, que incluyen múltiples motivos de asociación a STAT3 y/o a STAT5.
- 60 Los motivos de asociación a STAT3 y STAT5 pueden, por ejemplo, localizarse o introducirse en cualquiera de los dominios de señalización intracelular.
- 65 65 De manera similar, el segmento intracelular descrito en la presente descripción puede comprender uno o más motivos de unión a JAK, que pueden localizarse o introducirse en cualquiera de los dominios de señalización intracelular.
- También se muestra un motivo BOX-1 en los aminoácidos 13-21 de la SEQ ID NO: 5 y el residuo de tirosina 510 también se muestra como el aminoácido número 79 de la SEQ ID NO: 5 (y el motivo que flanquea el residuo de tirosina es los aminoácidos 80-83). En una modalidad, el fragmento del dominio citoplasmático del receptor de interleucina comprende los aminoácidos 22-78 de la SEQ ID NO: 5. Los ejemplos del fragmento truncado del dominio citoplasmático de la cadena β de IL-2R (SEQ ID No.: 5) incluyen péptidos que tienen secuencias de aminoácidos números 266 a 337 y 530 a 551 de NCBI RefSeq: NP_000869.1.
- En un aspecto de la presente descripción, puede usarse el dominio citoplasmático de la cadena α del receptor de IL-21 (IL-21R). Un ejemplo del dominio citoplasmático de la cadena α de IL-21R usado en la presente descripción incluye un dominio de señalización intracelular que comprende los aminoácidos números 256 a 538 de la cadena α de IL-21R (NCBI RefSeq: NP_068570.1, SEQ ID No.: 6). En un aspecto de la presente descripción, puede usarse un fragmento truncado del dominio citoplasmático de la cadena α de IL-21R. El fragmento truncado incluye un motivo box-1 (aminoácidos números 266 a 274 de NCBI RefSeq: NP_068570.1) requerido para la asociación con la tirosina

quinasa JAK1 e incluye un motivo de asociación a STAT. Como se describe en la presente descripción, el motivo de asociación a STAT comprende el residuo de tirosina 500 (aminoácido número 519 de NCBI RefSeq: NP_000869.1) y 3 residuos flanqueantes en el lado C-terminal del residuo de tirosina 500, es decir, YLRQ (SEQ ID NO: 30), requerido para la asociación a STAT1/3.

5 Otros ejemplos de dominios de señalización intracelular incluyen regiones citoplasmáticas de un complejo TCR y/o una molécula coestimuladora, y cualquier variante que tenga la misma función que esas secuencias. Otros ejemplos incluyen los dominios de señalización citoplasmática enumerados en la Tabla 2 de Sadelain y otros, 2009.

10 La activación natural de las células T es transducida por dos tipos diferentes de dominios de señalización intracelular, es decir, un dominio para iniciar la activación primaria dependiente de antígeno a través de un complejo de TCR (señal citoplasmática primaria, por ejemplo, proporcionada por CD3 ζ) y un dominio para el antígeno de acción independiente para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (señal citoplasmática secundaria).

15 El segmento intracelular de CAR de la presente descripción comprende un dominio de señalización citoplasmático intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno y opcionalmente una secuencia de señalización citoplasmática secundaria.

20 Como se usa en la presente descripción, los términos "señalización citoplasmática secundaria" y "coestimulador" se usan indistintamente.

25 Los ejemplos de dominios intracelulares que comprenden un dominio de señalización citoplasmático secundario o coestimulador que puede usarse en la presente descripción incluyen secuencias de CD2, CD4, CD5, CD8 α , CD8 β , CD28, CD134, CD137 (4-1BB), ICOS y CD154 tales como fragmentos truncados de estos que comprenden motivos de señalización. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos números 236 a 351 de CD2 (NCBI RefSeq: NP_001758.2), aminoácidos números 421 a 458 de CD4 (NCBI RefSeq: NP_000607.1), aminoácidos números 402 a 495 de CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2), aminoácidos números 207 a 235 de CD8 α (NCBI RefSeq: NP_001759.3), aminoácidos números 196 a 210 de CD8 β (GenBank: AAA35664.1), aminoácidos números 180 a 220 (SEQ ID No.: 8) de CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1), aminoácidos números 214 a 255 de CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP_001552.2), aminoácidos números 241 a 277 de CD134 OX40, NCBI RefSeq: NP_003318.1), y aminoácidos números 166 a 199 de ICOS (NCBI RefSeq: NP_036224.1), y sus variantes que tienen la misma función que tienen estos péptidos.

30 En una modalidad, el segmento intracelular de CAR descrito en la presente descripción comprende además un dominio coestimulador citoplasmático seleccionado de CD28, CD2, CD4, CD5, CD8 α , CD8 β , CD134 y CD137.

35 La presente descripción incluye en un aspecto un CAR que comprende un segmento intracelular con uno o más, por ejemplo, 2 o 3 dominios de señalización intracelular además del dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno.

40 La presente descripción también incluye un CAR que comprende un segmento intracelular con dos o más dominios de señalización intracelular iguales que están unidos en tandem. En un aspecto, la presente descripción proporciona un CAR en el que un dominio citoplasmático del receptor de IL está en un lado N-terminal en relación con un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ , es decir, un CAR que comprende un dominio citoplasmático del receptor de IL y un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que se unen en este orden desde el lado N-terminal. La presente descripción también incluye los CAR obtenidos mediante la adición adicional de un dominio intracelular de CD28 (por ejemplo, dominio coestimulador citoplasmático de CD28) al CAR mencionado anteriormente, es decir, un CAR que comprende un dominio de señalización intracelular de CD28, un dominio citoplasmático del receptor de IL, y un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo STAT3 exógeno que se unen en este orden desde el lado N-terminal.

45 Como se describe en la presente descripción, el CAR comprende un segmento intracelular que comprende un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno y dominios de señalización intracelular seleccionados de un dominio citoplasmático de la cadena del receptor de interleucina y un dominio coestimulador citoplasmático, en donde al menos uno de los dominios de señalización comprende un motivo de unión a JAK endógeno o exógeno y un motivo de asociación a STAT5.

50 Como se describe en la presente descripción, el CAR comprende un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ con un motivo de asociación a STAT3 exógeno, un dominio citoplasmático del fragmento de la cadena del receptor de IL que comprende un motivo de unión a JAK endógeno o exógeno y un motivo de asociación a STAT5, y un dominio coestimulador citoplasmático de CD28.

55 En un CAR de la presente descripción, puede insertarse un enlazador oligopeptídico o un enlazador polipeptídico entre los dominios del segmento intracelular para unir los dominios en el mismo y/o unirlos a otros dominios. Por ejemplo, puede usarse un enlazador que tenga una longitud de 2 a 10 aminoácidos. En particular, puede usarse un enlazador que tenga una secuencia continua de glicina-serina. Por ejemplo, el enlazador

IDGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 42) puede introducirse entre el dominio citoplasmático de CD28 y el dominio beta del receptor de IL-2 citoplasmático parcial. Por ejemplo, el enlazador KLGGSGP (SEQ ID NO: 19) puede introducirse entre el dominio beta del receptor de IL-2 citoplasmático parcial y el dominio intracelular de la cadena de CD3 ζ .

- 5 En una modalidad específica, el CAR comprende un péptido señal, un dominio extracelular de un fragmento variable de cadena única de FMC63, un CD28 transmembrana, un dominio citoplasmático de CD28, un dominio beta del receptor de IL-2 citoplasmático parcial que corresponde a la SEQ ID NO: 5, corresponde a la SEQ ID NO: 5, que comprende un motivo de unión a JAK y un motivo de asociación a STAT5 endógeno, y un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que comprende un motivo de asociación a STAT3 exógeno que corresponde a YRHQ (SEQ ID NO: 22) en la posición 104-107 de la SEQ ID NO: 7, que se unen en este orden desde el lado N-terminal, como se muestra, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 24.
- 10 En la presente descripción se describe un CAR que comprende i) un dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado, ii) un dominio transmembrana y iii) un segmento intracelular que comprende uno o más dominios de señalización intracelular que incluyen un dominio citoplasmático de una cadena del receptor de interleucina y, opcionalmente, un dominio citoplasmático suplementario.
- 15 El dominio citoplasmático de una cadena del receptor de IL puede seleccionarse de cualquier cadena del receptor de IL descrita en la presente descripción. Puede usarse toda la región del dominio citoplasmático de la cadena del receptor de IL. Alternativamente, también puede usarse un fragmento truncado de dicho dominio citoplasmático de la cadena del receptor de IL. En la presente descripción se proporcionan ejemplos de fragmentos truncados y de longitud completa de estos.
- 20 25 El fragmento truncado puede comprender al menos un motivo de asociación de tirosina quinasa (también conocido como motivo box-1) y un motivo de asociación a STAT (Transductor de señal y activador de la transcripción) descrito en la presente descripción. Por ejemplo, el fragmento truncado comprende hasta 250 aminoácidos, o tiene de 50 a 200 aminoácidos o de 80 a 150 aminoácidos del dominio citoplasmático de ILR.
- 30 35 Como se describe en la presente descripción, el motivo de asociación a STAT de la cadena β de IL-2R comprende el residuo de tirosina 510 (el residuo de tirosina 510 es el aminoácido número 536 de NCBI RefSeq: NP_000869.1). El motivo de asociación a STAT comprende el residuo 510 de tirosina y los 4 residuos flanqueantes en el lado C-terminal del residuo de tirosina 510, es decir, YLSLQ (SEQ ID NO:12).
- 40 45 También se conocen otros motivos de asociación a STAT e incluyen YXXQ (SEQ ID NO:13), opcionalmente YXPQ, para IL-6, YXXQ (SEQ ID NO:13) para IL-10, YLPSNID (SEQ ID NO:14) para IL- 12, YLSLQ (SEQ ID NO:12), YCTFP (SEQ ID NO:15), YFFFH (SEQ ID NO:16) para IL-2, YVTMS (SEQ ID NO:17) para IL-7, YLPQE (SEQ ID NO:18) para IL-9 y YKAQS (SEQ ID NO:20) y YKPFQ (SEQ ID NO:21) para IL-4 como se indica, por ejemplo, en la Tabla 2 de Kissleleva y otros, 2002. Puede usarse y/o introducirse cualquier dominio de señalización de STAT en la cadena de ILR.
- 50 Como se describe en la presente descripción, además del dominio citoplasmático del receptor de IL, el segmento intracelular de CAR comprende al menos un dominio de señalización suplementario que está presente en el receptor de IL. Los ejemplos de dominios de señalización intracelular incluyen regiones citoplasmáticas de un complejo de TCR y/o una molécula coestimuladora, y cualquier variante que tenga la misma función que esas secuencias. Otros ejemplos incluyen los dominios de señalización citoplasmática enumerados en la Tabla 2 de Sadelain y otros, 2009.
- 55 60 Como se describe en la presente descripción, el segmento intracelular de CAR comprende una secuencia de señalización citoplasmática primaria y/o una secuencia de señalización citoplasmática secundaria (por ejemplo, coestimuladora) descrita en la presente descripción como los dominios de señalización intracelular.
- 65 Como se describe en la presente descripción, el segmento intracelular comprende un dominio de señalización intracelular que tiene un ITAM y/o un ITIM descrito en la presente descripción.
- 70 La presente descripción incluye un CAR que comprende un segmento intracelular que comprende uno o más, por ejemplo, 2 o 3 dominios de señalización intracelular además del dominio citoplasmático del receptor de IL. Por ejemplo, el CAR comprende un dominio citoplasmático del receptor de IL y un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ . Por ejemplo, el CAR comprende un dominio citoplasmático del receptor de IL, un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ y un dominio coestimulador citoplasmático de CD28.
- 75 La presente descripción también incluye un CAR que comprende un segmento intracelular que comprende dos o más dominios de señalización intracelular que se unen en tándem. Por ejemplo, el CAR comprende un dominio citoplasmático del receptor de IL en un lado N-terminal en relación con un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ , es decir, comprende un dominio citoplasmático del receptor de IL y un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ que se unen en este orden desde el lado N-terminal.

La presente descripción también incluye los CAR que comprenden además un dominio intracelular de CD28 introducido en el CAR mencionado anteriormente, es decir, un CAR que comprende un dominio coestimulador citoplasmático de CD28, un dominio citoplasmático del receptor de IL y un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ están opcionalmente unidos en este orden desde el lado N-terminal. Por ejemplo, el segmento intracelular de CAR puede comprender un dominio citoplasmático del receptor de IL en un lado C-terminal en relación con un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ , es decir, comprende un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ y un dominio citoplasmático del receptor de IL que se unen en este orden desde el lado N-terminal.

Como se describe en la presente descripción, el CAR comprende un segmento intracelular que comprende un dominio de señalización intracelular de CD3 ζ , uno o más dominios coestimuladores citoplasmáticos, en donde el segmento intracelular comprende un motivo de unión a JAK, motivos de asociación a STAT5 y/o a STAT3.

(c) Dominio transmembrana y dominio separador

El CAR de la presente descripción comprende un dominio transmembrana. El dominio transmembrana puede derivarse de un polipéptido natural o puede diseñarse artificialmente. El dominio transmembrana derivado de un polipéptido natural puede obtenerse de cualquier proteína transmembrana o de unión a membrana. Por ejemplo, puede usarse un dominio transmembrana de una cadena α o β del receptor de células T, una cadena de CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154 o un GITR. El dominio transmembrana diseñado artificialmente es un polipéptido que comprende principalmente residuos hidrófobos tales como leucina y valina. Por ejemplo, puede encontrarse un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo del dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, puede disponerse un enlazador oligopeptídico corto o un enlazador polipeptídico, por ejemplo, un enlazador que tiene una longitud de 2 a 10 aminoácidos entre el dominio transmembrana y el segmento intracelular como se describe en la presente descripción. En particular, puede usarse una secuencia enlazadora que tenga una secuencia continua de glicina-serina.

Por ejemplo, puede usarse un dominio transmembrana que tiene una secuencia de aminoácidos números 153 a 179 (SEQ ID NO.: 9) de CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1) como el dominio transmembrana.

En el CAR de la presente descripción, puede disponerse un dominio separador entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana, o entre el segmento intracelular y el dominio transmembrana. El dominio separador significa cualquier oligopéptido o polipéptido que sirve para unir el dominio transmembrana con el dominio extracelular y/o el dominio transmembrana con el segmento intracelular. El dominio separador comprende hasta 300 aminoácidos, por ejemplo, alrededor de 10 a 100 aminoácidos, o alrededor de 25 a 50 aminoácidos.

El dominio separador tiene preferentemente una secuencia que promueve la unión de un CAR con un antígeno y mejora la señalización en una célula. Los ejemplos de un aminoácido que se espera que promueva la unión incluyen cisteína, un aminoácido cargado y serina y treonina en un sitio de glicosilación potencial, y estos aminoácidos pueden usarse como un aminoácido que constituye el dominio separador.

En una modalidad, el dominio separador es un polipéptido que comprende o consiste en los aminoácidos números 118 a 178 de CD8 α (NCBI RefSeq: NP_001759.3) que es una región bisagra de CD8 α , aminoácidos números 135 a 195 de CD8 β (GenBank: AAA35664.1), aminoácidos números 315 a 396 de CD4 (NCBI RefSeq: NP_000607.1), aminoácidos números 114 a 152 (SEQ ID No.: 10) de CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1), o una parte de este. Además, el dominio separador puede ser una secuencia sintetizada de manera artificial.

El CAR de la presente descripción puede diseñarse para formar un polímero, en particular, un dímero. Por ejemplo, la cisteína se inserta en el dominio separador y/o el dominio transmembrana para polimerizar (dimerizar) el CAR, por ejemplo, a través de un puente disulfuro.

Además, en el CAR de la presente descripción, una secuencia de péptida señal puede unirse al extremo N-terminal. Existe una secuencia de péptido señal en el extremo N-terminal de muchas proteínas secretoras y proteínas de membrana, y tiene una longitud de 15 a 30 aminoácidos. Muchas de las moléculas de proteína que tienen un dominio intracelular mencionadas en la presente descripción son proteínas de membrana y tienen secuencias de péptidos señal. Los péptidos señal derivados de tales proteínas secretoras y proteínas de membrana pueden usarse como un péptido señal para el CAR de la presente descripción. Puede usarse cualquier péptido señal. Por ejemplo, el péptido señal puede ser un péptido señal de Oncostatina M. Los péptidos señal pueden ser de humanos y también pueden derivarse de no humanos, por ejemplo, de células de insectos o de virus. En una modalidad, el péptido señal es un péptido señal humano.

(2) Ácido nucleico que codifica los CAR

La presente descripción proporciona un ácido nucleico que codifica el CAR descrito en la presente descripción. El ácido nucleico que codifica el CAR puede prepararse fácilmente a partir de una secuencia de aminoácidos del CAR especificado mediante un método convencional. Puede obtenerse una secuencia de nucleótidos que codifica una

secuencia de aminoácidos a partir de los NCBI RefSeq ID mencionados anteriormente o los números de acceso de GenBank para una secuencia de aminoácidos de cada dominio, y el ácido nucleico de la presente descripción puede prepararse con el uso de un estándar biológico molecular y/o procedimiento químico. Por ejemplo, basándose en la secuencia de nucleótidos, puede sintetizarse un ácido nucleico y el ácido nucleico de la presente descripción puede prepararse al combinar fragmentos de ADN que se obtienen de una biblioteca de ADNc con el uso de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ácido nucleico de la presente descripción puede unirse a otro ácido nucleico para expresarse bajo el control de un promotor adecuado. Los ejemplos del promotor incluyen un promotor que promueve constitutivamente la expresión de un gen o constructo unido operativamente, un promotor que induce la expresión de un gen o constructo unido operativamente por la acción de un fármaco o similar (por ejemplo, tetraciclina o doxorrubicina). Para lograr una transcripción eficiente del ácido nucleico, el ácido nucleico de la presente descripción también puede unirse a otros elementos reguladores que cooperan con un promotor o un sitio de inicio de la transcripción, por ejemplo, un ácido nucleico que comprende una secuencia potenciadora o una secuencia terminadora. Además del ácido nucleico de la presente descripción, puede incorporarse un gen que puede ser un marcador para confirmar la expresión del ácido nucleico (por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos, un gen que codifica una enzima indicadora o un gen que codifica una proteína fluorescente).

En una modalidad, el ácido nucleico es un ácido nucleico con optimización de codones para la expresión en un huésped particular.

La presente descripción proporciona una composición que comprende el ácido nucleico de la presente descripción como un ingrediente activo, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos por un experto en la técnica. Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina tamponada con fosfato (por ejemplo, fosfato 0,01 M, NaCl 0,138 M, KCl 0,0027 M, pH 7,4), una solución acuosa que contiene una sal de ácido mineral tal como un hidrocloruro, un hidrobromuro, un fosfato o un sulfato, solución salina, una solución de glicol o etanol, y una sal de un ácido orgánico tal como un acetato, un propionato, un malonato o un benzoato. También pueden usarse un adyuvante, tal como un agente humectante o un emulsionante, y un agente tamponador del pH. Como los excipientes farmacéuticamente aceptables, pueden usarse apropiadamente los excipientes descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991). La composición de la presente descripción puede formularse en una forma conocida adecuada para la administración parenteral, por ejemplo, inyección o infusión. Además, la composición de la presente descripción puede comprender aditivos de formulación tales como un agente de suspensión, un conservante, un estabilizador y/o un dispersante, y un agente de conservación para extender un período de validez durante el almacenamiento. La composición puede estar en forma seca para su reconstitución con un líquido estéril apropiado antes de su uso. Para la administración mediada por partículas finas, una partícula tal como una partícula de oro de tamaño microscópico puede recubrirse con un ADN.

Cuando el ácido nucleico de la presente descripción se introduce en una célula ex vivo, el ácido nucleico de la presente descripción puede combinarse con una sustancia que promueva la transferencia de un ácido nucleico en una célula, por ejemplo, un reactivo para introducir un ácido nucleico tal como un liposoma o un lípido catiónico, además de los excipientes mencionados anteriormente. Alternativamente, un vector que porta el ácido nucleico de la presente descripción también es útil como se describe más adelante. En particular, una composición en una forma adecuada para la administración a un organismo vivo que contiene el ácido nucleico de la presente descripción portado por un vector adecuado es adecuada para la terapia génica in vivo.

Una composición que comprende el ácido nucleico de la presente descripción como un ingrediente activo puede administrarse para el tratamiento de, por ejemplo, un cáncer [cáncer de sangre (leucemia), tumor sólido, etc.], una enfermedad inflamatoria/enfermedad autoinmunitaria (asma, ecema), hepatitis y una enfermedad infecciosa cuya causa es un virus tal como la influenza y el VIH, una bacteria o un hongo, por ejemplo, una enfermedad como la tuberculosis, MRSA, VRE o micosis profunda, dependiendo del antígeno al cual se une un CAR codificado por el ácido nucleico. Una composición que comprende el ácido nucleico de la presente descripción como un ingrediente activo puede administrarse o formularse adecuadamente para la administración por vía intradérmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, intraarterial, intravenosa, intratumoral o en un vaso linfático aferente, por administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, aunque la vía de administración no está particularmente limitada.

(3) Proceso para producir células que expresan CAR

- 60 Un proceso de producción de una célula que expresa el CAR de la presente descripción incluye una etapa de introducir el ácido nucleico que codifica un CAR descrito en la presente descripción en una célula. La etapa se realiza ex vivo. Por ejemplo, una célula puede transformarse ex vivo con un vector viral o un vector no viral que porta el ácido nucleico de la presente descripción para producir una célula que expresa el CAR de la presente descripción.
- 65 En el proceso de la presente descripción, puede usarse una célula derivada de un mamífero, por ejemplo, una célula humana, o una célula derivada de un mamífero no humano tal como un mono, un ratón, una rata, un cerdo, un

caballo o un perro.

En una modalidad, el mamífero es un ser humano.

- 5 La célula usada en el proceso de la presente descripción no está particularmente limitada y puede usarse cualquier célula. Por ejemplo, puede usarse una célula recolectada, aislada o purificada de un fluido corporal, un tejido o un órgano tal como sangre (sangre periférica, sangre del cordón umbilical, etc.) o médula ósea o una célula obtenida mediante la diferenciación o reprogramación de la célula antes mencionada para producir una célula madre pluripotente inductora (iPSC) (ver, por ejemplo, Themeli y otros, 2013). Puede usarse una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), una célula inmunitaria [que incluye, por ejemplo, una célula T, una célula dendrítica, una célula B, una célula madre hematopoyética, un macrófago, un monocito, una célula NK o una célula hematopoyética (un neutrófilo, un basófilo)], una célula mononuclear de sangre de cordón umbilical, un fibroblasto, un adipocito precursor, un hepatocito, un queratinocito de piel, una célula madre mesenquimatosa, una célula madre adiposa, varias cepas de células cancerosas o una célula madre neuronal. Por ejemplo, puede usarse una célula NK o una célula T, una célula precursora de una célula T (una célula madre hematopoyética, una célula precursora de linfocitos, etc.) o una población celular que las contenga. Los ejemplos de la célula T incluyen una célula T positiva para CD8, una célula T positiva para CD4, una célula T reguladora, una célula T citotóxica y un linfocito infiltrante de tumor. La población celular que contiene una célula T y una célula precursora de una célula T incluye una PBMC. Las células mencionadas anteriormente pueden recolectarse de un cuerpo vivo, obtenerse por cultivo de expansión de una célula recolectada de un cuerpo vivo o establecerse como una cepa celular. Cuando se desea el trasplante de la célula que expresa CAR producida o una célula diferenciada de la célula que expresa CAR producida en un cuerpo vivo, el ácido nucleico puede introducirse en una célula recolectada del propio cuerpo vivo o de un cuerpo vivo conespecífico de este.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El ácido nucleico que codifica el CAR de la presente descripción puede insertarse en un vector y el vector puede introducirse en una célula. Por ejemplo, puede usarse un vector de virus como un vector de retrovirus (que incluye un vector de oncoretrovirus, un vector de lentivirus y un vector de pseudotipado), un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector de virus de simio, un vector de virus vaccinia o un vector de virus sendai, un vector de virus de Epstein-Barr (EBV) y un vector de HSV. Por ejemplo, puede usarse un vector de virus que carece de la capacidad de replicación para no autorreplicarse en una célula infectada.

Además, también puede usarse un vector no de virus en la presente descripción en combinación con un liposoma o un agente de condensación tal como un lípido catiónico como se describe en los documentos WO 96/10038, WO 97/18185, WO 97/25329, WO 97/30170 y WO 97/31934. El ácido nucleico de la presente descripción también puede introducirse en una célula mediante transducción de fosfato cálcico, DEAE-dextrano, electroporación o bombardeo de partículas.

Por ejemplo, cuando se usa un vector de retrovirus, el proceso de la presente descripción puede llevarse a cabo al seleccionar una célula de empaquetamiento adecuada basada en una secuencia de LTR y una secuencia señal de empaquetamiento que posee el vector y al preparar una partícula de retrovirus con el uso de la célula de empaquetamiento. Los ejemplos de la célula de empaquetamiento incluyen PG13 (ATCC CRL-10686), PA317 (ATCC CRL-9078), GP+E-86 y GP+envAm-12 (patente de Estados Unidos núm. 5,278,056) y Psi-Crip [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 85, págs. 6460-6464 (1988)]. También puede prepararse una partícula de retrovirus con el uso de una célula 293 o una célula 293T que tiene una alta eficacia de transfección. Muchos tipos de vectores de retrovirus producidos en base a retrovirus y células de empaquetamiento que pueden usarse para empacar los vectores de retrovirus están ampliamente disponibles comercialmente en muchas compañías.

Un aspecto es un método de fabricación de una célula descrito en la presente descripción, que comprende transfectar o transducir una célula con un ácido nucleico o un vector descrito en la presente descripción.

Otro aspecto es un método de fabricación de una célula descrita en la presente descripción, que comprende:

- a) aislar células inmunitarias de un mamífero;
- b) transfectar o transducir las células inmunitarias aisladas, células T opcionalmente aisladas, con un ácido nucleico que codifica un CAR descrito en la presente descripción o un vector que comprende dicho ácido nucleico; y
- c) opcionalmente aislar y/o expandir células que expresan CAR, opcionalmente células T que expresan CAR.

- En una modalidad, las células inmunitarias aisladas son células T aisladas.

En una modalidad, las células aisladas son CD3⁺ y opcionalmente estimuladas con un anticuerpo anti-CD3, opcionalmente en una forma soluble o unida a la membrana, por ejemplo, OKT3 o mOKT3, y/o APC antes de la transducción o transfección. En una modalidad, las APC son APC artificiales (aAPC). En otra modalidad, la aAPC expresa una forma membranosa de anticuerpo monoclonal anti-CD3.

En una modalidad, se repite la etapa de transfección o transducción. Por ejemplo, la etapa de transfección o transducción puede llevarse a cabo dos o tres veces, o cuatro veces o hasta que, por ejemplo, se logre un nivel adecuado de expresión. Por ejemplo, la etapa de transfección o transducción puede llevarse a cabo cinco veces.

5 En una modalidad, las células se transfecan o transducen en más de un día consecutivo. Por ejemplo, las células se transfecan o transducen durante dos días consecutivos, tres días consecutivos o cuatro días consecutivos.

10 En una modalidad, las células transducidas con CAR se estimulan con células irradiadas que expresan un antígeno predeterminado. Por ejemplo, las células T transducidas con CAR se estimulan con células irradiadas en una relación de efecto con respecto a diana de 100:1, 75:1, 50:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50 o 1:100.

(4) Célula que expresa CAR y usos de esta

15 La célula que expresa el CAR de la presente descripción es una célula en la que el ácido nucleico que codifica un CAR descrito en la presente descripción se introduce y expresa mediante el proceso de producción descrito en la presente descripción.

20 La célula de la presente descripción se une a un antígeno específico a través del CAR, por lo que se transmite una señal a la célula y, como resultado, la célula se activa. La activación de la célula que expresa el CAR varía en función del tipo de célula huésped y los dominios intracelulares del CAR, y puede confirmarse basándose, por ejemplo, en la liberación de una citocina, la mejora de la tasa de proliferación celular, el cambio en una molécula de superficie celular, o similar como un índice. Por ejemplo, la liberación de una citocina citotóxica (un factor de necrosis tumoral, llinfotoxina, etc.) de la célula activada provoca la destrucción de una célula diana que expresa un antígeno. Además, la liberación de una citocina o el cambio en una molécula de la superficie celular estimula otras células inmunitarias, por ejemplo, una célula B, una célula dendrítica, una célula NK y un macrófago.

25 En la presente descripción se demuestra que las células T modificadas con CAR de acuerdo con la invención tienen una proliferación superior a través de una tasa de división celular más alta y una apoptosis reducida en comparación con las células T que comprenden CARS de primera (28-z) y segunda (28-BB-z) generación (ver la Figura 12). Además, las células T con CAR genéticamente modificado también mantienen fenotipos de memoria similares a las de las células madre después de la estimulación repetida del antígeno (Figura 14).

30 En consecuencia, la célula que expresa el CAR puede usarse como un agente terapéutico para una enfermedad. Como se muestra en el Ejemplo 4 así como también en las Figuras 18-20, los ratones inyectados con células leucémicas y tratados con el CAR anti-CD19 mostraron una actividad tumoral disminuida, así como también una supervivencia general aumentada en comparación con los ratones no tratados y los ratones tratados con CAR de generaciones anteriores.

35 40 En un aspecto, se proporciona el CAR, ácido nucleico, vector, célula o composición descritos en la presente descripción para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

45 Otro aspecto es un método para tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero, el método comprende administrar al mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de células o una composición descrita en la presente descripción.

50 Un aspecto adicional es un método para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero, el método comprende administrar al mamífero que lo necesite una cantidad eficaz de una célula o una composición descrita en la presente descripción.

55 El agente terapéutico comprende la célula que expresa el CAR como ingrediente activo y puede comprender además un excipiente adecuado. Los ejemplos del excipiente incluyen los excipientes farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente para la composición que comprende el ácido nucleico de la presente descripción como un ingrediente activo, diversos medios de cultivo celular y cloruro de sodio isotónico.

60 65 La enfermedad contra la que se administra la célula que expresa el CAR no está particularmente limitada siempre que la enfermedad muestre sensibilidad a la célula. En una forma de modalidad, la enfermedad es un cáncer.

Por ejemplo, el cáncer es un cáncer de sangre o un tumor sólido. Por ejemplo, el cáncer de sangre es una leucemia, linfoma o mieloma. Por ejemplo, el tumor sólido es cáncer de mama, cáncer de ovario, glioblastoma, osteosarcoma o meduloblastoma.

65 En una modalidad, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria/enfermedad autoinmunitaria (asma, eccema), hepatitis y una enfermedad infecciosa, cuya causa es un virus tal como la influenza y el VIH, una bacteria o un hongo, por ejemplo, tuberculosis, MRSA, VRE y micosis profunda.

La célula que expresa el CAR de la presente descripción que se une a un antígeno poseído por una célula que se desea disminuir o eliminar para el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente, es decir, un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o similares se administra para el tratamiento de estas enfermedades.

- 5 En consecuencia, un aspecto incluye un método para disminuir en un sujeto el número de células que expresan un antígeno predeterminado, el método comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de células que expresan un CAR como se describe en la presente descripción, en donde el CAR se une específicamente al antígeno predeterminado.
- 10 La célula de la presente descripción también puede utilizarse para la prevención de una enfermedad infecciosa después de un trasplante de médula ósea o exposición a radiación, transfusión de linfocitos de donante con el fin de remisión de leucemia recurrente y similares.
- 15 El agente terapéutico que comprende la célula que expresa el CAR como un ingrediente activo puede administrarse por vía intradérmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, intraarterial, intravenosa, intratumoral o en un vaso linfático aferente, mediante administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, aunque la vía de administración no está limitada.
- 20 En una modalidad, el sujeto es sospechoso de tener o tiene cáncer. En una modalidad, el sujeto es sospechoso de tener o tiene una enfermedad inflamatoria.
- Además, se pretende que las definiciones y modalidades descritas en secciones particulares sean aplicables a otras modalidades descritas en la presente descripción para las que son adecuadas, como entendería un experto en la técnica. Por ejemplo, en los siguientes pasajes, se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.
- 25
- 30 La descripción anterior describe en general la presente solicitud. Puede obtenerse una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la solicitud. Se contemplan cambios de forma y sustitución de equivalentes según las circunstancias lo sugieran o lo hagan oportuno. Aunque en la presente descripción se han empleado términos específicos, dichos términos están pensados en un sentido descriptivo y no con fines de limitación.
- 35

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente descripción:

Ejemplos

- 40 La presente descripción se explicará con más detalle a modo de Ejemplos, a los que no se limita la presente descripción.
- 45 Ejemplo 1
- Constructos de receptores de antígenos químicos (CAR) anti-CD19
- 50 Un fragmento variable de cadena única derivado de FMC63 (scFv) (Nicholson y otros, 1997) se ha unido a la cadena de CD28 y CD3 ζ (2^a generación), CD28, 4-1BB y cadena de CD3 ζ , (28-BB -z, 3^a generación), o CD28, dominio citoplasmático de la cadena β del receptor de IL-2 con delección interna, y se ha introducido la cadena de CD3 ζ con un motivo YXXQ exógeno (SEQ ID NO: 13) para la unión a STAT3 (28-IL2RB- z(YXXQ)), como se muestra en la Figura 1. El motivo YXXQ (SEQ ID NO: 13) se generó mediante la sustitución del residuo Leu-His-Met en la posición 156-158 codificado por la cadena de CD3 ζ por Tyr-Arg-His. FMC63 es un anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a que pertenece a la agrupación de CD19. Se usó oncostatina M como un péptido señal. El método de ensamblaje de Gibson se usó para la mutagénesis dirigida a sitio. Se usaron los siguientes cebadores: ACGCCTATGCCATCAGGCCCTGC (SEQ ID NO: 26) y CTGATGGCGATAGGCGTCGTAGGTGT (SEQ ID NO: 27).
- 55 Eficiencia de transducción de células T primarias con constructos de CAR anti-CD19
- 60 Para determinar la eficiencia de transducción de células T primarias con constructos de CAR anti-CD19, se estimularon células T CD3 $^+$ de sangre periférica con células presentadoras de antígeno artificiales que expresan una forma membranosa de AcM anti-CD3 (clon OKT3), CD80 y CD83 (mOKT3/aAPC) (Butler y otros, 2012), y posteriormente se transdijeron con constructos de CAR individuales que demanda retrovirus. La transducción se repitió durante tres días consecutivos. Siete días después de la estimulación inicial con mOKT3/aAPC, las células T transducidas con CAR se tiñeron con proteína L marcada con biotina seguida de estreptavidina-APC. Las células T

teñidas se analizaron mediante citometría de flujo, como se muestra en la Figura 2. La eficiencia de la transducción fue comparable en las células T transducidas con varios constructos de CAR. Se muestran datos representativos de cuatro experimentos independientes.

5 Expresión superficial de CAR anti-CD19

Se comparó la expresión superficial de CAR anti-CD19 al medir la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los constructos de CAR expresados en células T primarias (n=4) (Figura 3). La expresión de la superficie de CAR fue ligeramente inferior en las células T CAR 28-BB-z y 28-IL2RB-z(YXXQ) en comparación con las células T CAR 28-z. 10 La significancia estadística se evaluó con la prueba t pareada. Las barras de error indican S.D.

Fosforilación de STAT3 y STAT5 en las células T transducidas con CAR 28-IL2RB-z (YXXQ)

15 Las células T transducidas con CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) se dejaron reposar en un medio libre de citocinas durante un día y se estimularon con células K562-CD19 en una relación de efecto con respecto a diana (E: T) de 2:1. Se fijaron/permeabilizaron células T CD8⁺ STAT3 y STAT5 fosforiladas, se tiñeron con AcM específicos y se analizaron mediante análisis de citometría de flujo intracelular, como se muestra en la Figura 4. Las células T modificadas con CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) mostraron un aumento gradual en la fosforilación de STAT3 y STAT5. Se muestran datos representativos de tres experimentos.

20 Comparación de la actividad de la vía JAK-STAT en células T transducidas con CAR

25 Se estimularon células T transducidas con CAR con células K562 o células K562 que expresan de forma estable CD19 (K562-CD19) en las mismas condiciones que en la Figura 4, y se midió la expresión de STAT3 y STAT5 fosforilada 18 horas después de la estimulación. Se calculó la intensidad de fluorescencia media relativa (MFI) al dividir cada MFI por el valor medio de MFI de las células T transducidas con CAR 28-z cocultivadas con células K562 (n=4). Como se muestra en la Figura 5, las células T CAR⁺ 28-IL2RB-z(YXXQ) mostraron una fosforilación significativamente mayor de STAT3 ($P<0,01$) y STAT5 ($P<0,05$; prueba t pareada) cuando se cocultivaron con células K562-CD19, lo que indica que el CAR indujo la activación de la vía JAK-STAT específica de CD19.

30 Ejemplo 2

Protocolo para la transducción y expansión de células T con constructos de CAR anti-CD19

35 Se estimularon células T CD3⁺ periféricas con mOKT3/aAPC y se transdijeron retroviralmente con CAR CD19 individuales durante tres días consecutivos. Las células T transducidas con CAR se estimularon con células K562-CD19 o células K562 irradiadas en presencia de 100 UI/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-15 en una relación de E: T de 2:1 de manera semanal donde se indica (ver la Figura 6). Pueden preverse variaciones de la relación de E: T y la duración de la transducción. Por ejemplo, las células T CD3⁺ estimuladas con mOKT3/aAPC pueden transducirse 40 durante tres días consecutivos en una relación de E: T de 10:1.

Expansión de células T transducidas con CAR después de la transducción

45 En la Figura 7 se muestra la expansión en veces de células T transducidas con CAR (n=4). Se obtuvo una expansión superior a 100 veces de las células T CD8⁺ en 2 semanas en todas las células T transducidas con CAR. Las células T transducidas con CAR 28-BB-z mostraron una proliferación significativamente superior en comparación con las células T transducidas con CAR 28-z después de la transducción ($P<0,05$ por la prueba t pareada), mientras que no hubo diferencia entre las células T transducidas con CAR 28-z y 28-IL2RB-z(YXXQ).

50 Expansión de células T transducidas con CAR después de la estimulación específica con CD19 con células K562-CD19

55 Las células T transducidas con CAR se estimularon de una manera específica con CD19 con el uso de células K562-CD19 irradiadas. Las células T transducidas con CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) mostraron una proliferación superior tanto en las células T CD4⁺ como en las CD8⁺ independientemente de la suplementación con citocinas. En la Figura 8 se muestra la expansión en veces de las células T CAR⁺ (n=4; la significancia estadística se evaluó con la prueba t pareada).

60 Expansión de células T CAR⁺ después del cocultivo con células K562

65 Las células T transducidas con CAR se estimularon con células K562 irradiadas (control). En la Figura 9 se muestra la expansión en veces de las células T transducidas con CAR (n=4). Como se mostró anteriormente, las células T transducidas con 28-BB-z promovieron la proliferación independiente del antígeno en comparación con las células T transducidas con CAR 28-z (Milone y otros, 2009) ($P<0,05$ para las células T CD8⁺ por la prueba t pareada). Por el contrario, las células T CAR⁺ 28-IL2RB-z(YXXQ) no conferían una ventaja proliferativa sobre las células T CAR 28-z en ausencia de estimulación con CD19 específica de antígeno.

Expansión de las células T CAR⁺ después de la reestimulación específica de antígeno con células K562-CD19

Las células T transducidas con CAR se estimularon semanalmente dos veces con células K562-CD19 irradiadas, como se muestra en la Figura 10. Se muestra la expansión en veces de las células T CAR⁺ (n=4). Las células T modificadas con CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) mostraron una proliferación mejorada en comparación con las otras células T transducidas con CAR ($P<0,05$ para las células T CD8⁺; prueba t pareada).

Tasa de división celular en células T transducidas con CAR

- 10 Las células T modificadas con CAR se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) y se estimularon con células K562-CD19 en una relación de 2:1. La MFI promedio de CFSE en las células T CD4⁺ o CD8⁺ transducidas con CAR 3 días después de la estimulación en relación con la de las células T transducidas con CAR 28-z se muestra en la Figura 11 (n=4). La intensidad de CFSE en las células T transducidas con CAR 28-z se estableció en uno en cada donante. Las barras de error indican la S.D. La significancia estadística se evaluó con la prueba t pareada. Las células T transducidas con CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) mostraron una división celular significativamente mejorada.
- 15 Ejemplo 3

20 Viabilidad de las células T transducidas con CA

- Se estimularon células T transducidas con CAR con células K562-CD19 en una relación de 2:1. La frecuencia de células muertas se evaluó mediante citometría de flujo 3 días después de la estimulación (n=4) (Figura 12). Las barras de error representan la S.D. Las células T transducidas con el constructo CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) mostraron una disminución de la apoptosis tras la estimulación del antígeno. La significancia de la diferencia se evaluó mediante la prueba t pareada. Los datos presentados en las Figuras 11 y 12 demuestran que la ventaja proliferativa de las células T CAR⁺ 28-IL2RB-z(YXXQ) tras la estimulación con CD19 resultó tanto de una división celular mejorada como de una apoptosis disminuida.

30 Fenotipo de superficie de células T transducidas con CAR

- Las células T transducidas con CAR se estimularon con K562-CD19 en una relación de 2:1. Se tiñeron CD45RA y CD62L de superficie en células T CD4⁺ y CD8⁺ con AcM específicos y se sometieron a análisis de citometría de flujo 7 días después de la estimulación (Figura 13). Se muestran datos representativos de 4 experimentos independientes. Las células T transducidas con CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) mantuvieron el subconjunto de células T CD45RA⁺ CD62L⁺ en comparación con las células T CAR⁺ 28-z o 28-BB-z.

La frecuencia de las células T CAR con un fenotipo de marcador de células T de memoria similar a células madre (CD45RA⁺ CD62L⁺ CD95⁺)

- 40 Las células T transducidas con CAR se estimularon con K562-CD19 en una relación de 2:1. Se analizó la expresión superficial de CD45RA, CD62L y CD95 7 días después de la estimulación (n=4) (Figura 14). Las células T transducidas con CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) poseían una frecuencia significativamente más alta de un subconjunto de células T de memoria similares a células madre CD45RA⁺ CD62L⁺ CD95⁺. La significancia estadística se evaluó con la prueba t pareada.

Comparación de la expresión de CD62L en células T transducidas con CAR

- 50 La expresión de CD62L en células T transducidas con CAR se analizó como se describe para las Figuras 13 y 14. Se calculó la MFI relativa de la expresión de CD62L en las células T CD4⁺ y CD8⁺ transducidas con CAR al dividir cada MFI por el valor promedio de MFI de las células T transducidas con CAR 28-z (n=4). Las células T transducidas con CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) mostraron un nivel de expresión significativamente mayor de CD62L en comparación con las otras células T CAR⁺ ($P<0,05$ mediante la prueba t pareada).

55 Secreción de IL-2 por células T transducidas con CAR

- Las células T transducidas con CAR se estimularon con K562-CD19 en una relación de 1:1. Una semana después de la estimulación, las células T se reestimularon con mOKT3/aAPC y se midió la secreción de citocinas con citometría de flujo intracelular después de la tinción con AcM específicos. Las células T CAR⁺ 28-IL2RB-z(YXXQ) secretaron más IL-2 en comparación con las células T transducidas con CAR 28-z y 28-BB-z. La significancia se evaluó mediante la prueba t pareada. Estos resultados son consistentes con los datos mostrados en la Figura 15; las células T CAR⁺ 28-IL2RB-z (YXXQ) mantuvieron preferentemente un subconjunto de células T de memoria similares a células madre CD45RA⁺ CD62L⁺ CD95⁺ en comparación con las otras células T CAR.

65 Lisis in vitro de células diana por células T transducidas con CAR

Se cultivaron células T transducidas con CAR con células diana irradiadas (células K562-CD19 y CD19⁺ Nalm-6) marcadas con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) en una relación de E: T de 3:1 durante 6 horas. El porcentaje de células vivas positivas para CFSE residuales en el cultivo se determinó mediante análisis de citometría de flujo (n=3). Se usaron células K562 progenitoras como un control. Las barras de error representan la S.D. La significancia estadística se evaluó con ANOVA de mediciones repetidas. Las células T transducidas con CAR 28-IL2RB-z(YXXQ) demostraron una actividad lítica contra las células CD19⁺ comparable a las otras células T transducidas con CAR.

Ejemplo 4

Constructo vectorial

CAR NFMC63-28Z, también denominado CAR 28-z, es un receptor de antígenos quiméricos anti-CD19 creado mediante el reemplazo de la secuencia señal de CAR FMC63-28Z, que fue originalmente construido por Kochenderfer y otros, (J Immunother. 2009 Sep; 32(7):689-702), con la secuencia señal de Oncostatina M (NCBI RefSeq:NP_065391.1, aminoácidos números 1 a 25 de la SEQ ID No.: 1). El constructo de CAR NFMC63-28Z con optimización de codones fue sintetizado por Geneart® y se clonó en el vector retroviral pMX (Int J Hematol. 1998, 67:351-9). Una secuencia de aminoácidos de CAR NFMC63-28Z se muestra en la SEQ ID NO: 1. CAR NFMC63-28-d2RbZ es un receptor de antígenos quiméricos que tiene un fragmento truncado del dominio citoplasmático de la cadena β del receptor de IL-2 humana que incluye el motivo box-1 y el residuo de tirosina flanqueante 510 (por ejemplo, los aminoácidos números 266 a 337 y 530 a 551 de NCBI RefSeq: NP_000869.1, SEQ ID No.: 5), entre el dominio de CD28 y el dominio de CD3ζ de CAR NFMC63-28Z. Una secuencia de aminoácidos de CAR NFMC63-28-d2RbZ se muestra en la SEQ ID NO: 2. CAR NFMC63-28-21RaZ es un receptor de antígenos quiméricos que tiene un dominio citoplasmático de longitud completa de la cadena α del receptor de IL-21 humano (aminoácidos números 256 a 538 de NCBI RefSeq:NP_068570.1, SEQ ID No.: 6) entre el dominio de CD28 y el dominio de CD3ζ de CAR NFMC63-28Z. Una secuencia de aminoácidos de CAR NFMC63-28-21RaZ se muestra en la SEQ ID NO: 3. CAR NFMC63-28Z-21Ra es un receptor de antígenos quiméricos que tiene un dominio citoplasmático de longitud completa de la cadena α del receptor de IL-21 humano con el extremo N-terminal de CAR NFMC63-28Z. Una secuencia de aminoácidos de CAR NFMC63-28Z-21Ra se muestra en la SEQ ID NO: 4. Las estructuras de los CAR se muestran en la Figura 21. Los ácidos nucleicos que codifican CAR NFMC63-28-d2RbZ, CAR NFMC63-28-21RaZ y CAR NFMC63-28Z-21Ra se construyeron mediante la inserción de los ADN que codificaban los respectivos dominios citoplasmáticos en el constructo CAR NFMC63-28Z en el vector retroviral pMX.

Los vectores retrovirales ecotrópicos se obtuvieron por transfección transitoria de plásmidos retrovirales de constructo de CAR con TransIT293 (Mirus Bio) a la línea celular phoenix-eco; posteriormente, se transdijeron líneas celulares PG13 con los vectores retrovirales ecotrópicos obtenidos de la línea celular phoenix-eco transducida. Se obtuvieron vectores retrovirales pseudotipados con GaLV a partir de la masa de líneas celulares PG13 transducidas y se usaron para la transducción de genes en células Jurkat.

Células

La línea celular PG13 y la línea celular phoenix-eco se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS) y 50 µg/ml de gentamicina (Gibco).

Las células K562 o las células K562 transducidas con constructos de expresión de CD80 y CD83 humanos se transdijeron adicionalmente con un constructo de expresión de CD19 humano y se usaron como células presentadoras de antígenos artificiales (células aAPC, Clin Cancer Res., 2007, 13:1857-67, Immunol Rev., 2014, 257:191-209). Las células derivadas de K562 y K562 y las células derivadas de Jurkat y Jurkat se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10 % y 50 µg/ml de gentamicina.

Transferencia de constructos de CAR y clasificación celular

Las células se transdijeron con el uso del método de infección por virus unido a RetroNectin (J Biochem. 2001 Sep; 130(3):331-4), en el que se precargaron soluciones retrovirales en placas recubiertas con RetroNectin (marca registrada, Takara Bio), se centrifugaron a 2000 g durante 2 horas a 32 °C y después se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato que incluye albúmina sérica bovina. Se aplicaron células Jurkat a la placa precargada con virus. Esta transferencia de genes se realizó dos veces.

Después de la transferencia de genes de los constructos de CAR, las células se clasificaron con Biotina-Proteína L (GenScript) y Microesferas anti-biotina (Miltenyi Biotec). Después se confirmaron la clasificación de más del 95 % de positividad y el mismo nivel de intensidad fluorescente media de los constructos de CAR transferidas.

Fosforilación de STAT

Las células Jurkat transducidas con CAR y las aAPC se contaron y se mezclaron en hielo. Después de centrifugar a 4 °C, las células se incubaron en un baño de agua a 37 °C. Después de la incubación, las células se fijaron en

paraformaldehído al 1,5 % y se permeabilizaron con metanol al 100 %. Posteriormente, las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos; Phospho-p44/42 MAP quinasa (Cell signaling technology, clon E10), Phospho-STAT3 (pY705) (BD Phosflow, clon 4/P-STAT3) y Phospho-STAT5 (pY694) (BD Phosflow, clon 47/P-STAT5). La adquisición de citometría de flujo se realizó con un BD FacsCanto II (BD Biosciences) y el análisis se realizó con FlowJo (Treestar).

Los resultados se muestran en la Figura 22. Como se muestra en las figuras superiores de la Figura 2, NFMC63-28Z solo muestra la fosforilación de MAP quinasa, que es un marcador de la señalización de CD3ζ, mientras que NFMC63-28-d2R5 muestra la fosforilación de STAT5 en una fracción positiva de fosfo-MAP quinasa. Además, como se muestra en las figuras inferiores de la Figura 2, tanto NFMC63-28-21RaZ como NFMC63-28Z-21Ra muestran fosforilación de STAT3 en una fracción positiva de fosfo-MAP quinasa. Estos resultados indican que estos CAR pueden activar la señalización de STAT5 o STAT3, que son las principales dianas de la señalización de IL-2 e IL-21, respectivamente, además de la señalización de MAP quinasa tras la estimulación con el antígeno.

15 Ejemplo 5

Efectos antileucémicos in vivo en ratones

Se trataron ratones NSG inmunodeficientes que albergaban células leucémicas CD19+ NALME B humanas con el CAR anti-CD19 28-IL2RB-z(YXXQ) o con células T CAR de la generación anterior.

Las células T CD3⁺ se transdijeron por vía retroviral con CAR anti-CD19 28-z, 28-BB-z o 28-IL2RB-z(YXXQ), y se estimularon con células K562 transducidas con CD19, como se muestra en la Figura 18. Se inyectaron por vía intravenosa ratones NSG inmunodeficientes con la línea celular de leucemia linfoblástica aguda positiva para CD19 NALM-6, que expresa EGFP-luciferasa (NALM6-GL), y después se les inyectaron células T transducidas con CAR 14 días después de la inyección del tumor.

Las imágenes bioluminiscentes in vivo de la actividad luciferasa se muestran en la Figura 19 en los días 0, 7, 28 para los grupos sin tratamiento y CAR anti-CD19 28-z, así como también los días 0, 7, 28, 42 y 63 para los grupos de CAR anti-CD19 28-BB-z y 28-IL2RB-z(YXXQ) después de la infusión de las células T transducidas con CAR anti-CD19. Los ratones tratados con los CAR anti-CD19 28-IL2RB-z(YXXQ) muestran una mayor disminución de la actividad tumoral en comparación con los otros grupos.

La curva de Kaplan-Meier para la supervivencia general de los ratones tratados con células T transducidas con CAR anti-CD19 (n=5 cada una) indica que los ratones tratados con CAR anti-CD19 28-IL2RB-z(YXXQ) tuvieron una mejor tasa de supervivencia general en comparación con el grupo no tratado, así como también con los CAR anti-CD19 28-z y 28-BB-z de la generación anterior.

Aunque la presente solicitud se ha descrito con referencia a los que actualmente se consideran los ejemplos preferidos, debe entenderse que la solicitud no se limita a los ejemplos descritos. Por el contrario, la solicitud está destinada a cubrir diversas modificaciones y disposiciones equivalentes.

Las secuencias asociadas con cada número de acceso proporcionado en la presente descripción incluyen, por ejemplo, números de acceso y/o secuencias de biomarcadores (por ejemplo, proteína y/o ácido nucleico) proporcionados en las Tablas o en otra parte.

Tabla de secuencias:

SEQ ID NO: 1: NFMC63-28Z

5 MGVLLTQRTLLSLVALLFPMASMDIQMTQTTSSLASLGDRVTRSCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
10 SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
KHYYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFP
15 GPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAIFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP
YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
20 QALPPR

1-25: PÉPTIDO SEÑAL

26-270: SCFV DE FMC63

25 274-312: DOMINIO EXTRACELULAR PARCIAL DE CD28
313-339: DOMINIO TRANSMEMBRANA DE CD28
340-380: DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE CD28
381-492: DOMINIO INTRACELULAR DE CD3ζ

30 SEQ ID NO: 2: NFMC63-28-d2RbZ

MGVLLTQRTLLSLVALLFPMASMDIQMTQTTSSLASLGDRVTRSCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
40 KHYYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFP
GPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAIFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP
45 YAPPRDFAAYRSIDGGGGGGGGGGGSNCRNTGPWLKKVLCNTPDP SKFFSQLSSE
HGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQQDPT
HLVKLGSGP RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKP
50 RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

55 1-25: PÉPTIDO SEÑAL

26-270: SCFV DE FMC63

274-312: DOMINIO EXTRACELULAR PARCIAL DE CD28
313-339: DOMINIO TRANSMEMBRANA DE CD28
340-380: DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE CD28
398-491: DOMINIO BETA DEL RECEPTOR DE IL-2 CITOPLASMÁTICO PARCIAL
499-610: DOMINIO INTRACELULAR DE CD3ζ

SEQ ID NO: 3: NFMC63-28-21RaZ

MGVLLQRTLSSLVALLFPSMASMDIQMTQTTSSLSASLGDRVТИSCRASQDISKYLNWYQ
 5 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
 GGTKEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
 10 SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
 KHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPPLFP
 15 GPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAIFIWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRGPTRKHYP
 YAPPRDFAAYRSKTHPLWRLWKKIWAVPSPERFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGSSE
 20 GPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRQLQLTELQEPAELVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAY
 SEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTT
 VLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGRSPGGVSESEAGSPLA
 25 GLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVIPPPPLSSPGPQASKLGGS
 GPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQE
 GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
 30

1-25: PÉPTIDO SEÑAL

26-270: SCFV DE FMC63

274-312: DOMINIO EXTRACELULAR PARCIAL DE CD28

313-339: DOMINIO TRANSMEMBRANA DE CD28

340-380: DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE CD28

381-663: DOMINIO ALFA DEL RECEPTOR DE IL-21 CITOPLASMÁTICO DE LONGITUD COMPLETA

671-782: DOMINIO INTRACELULAR DE CD3 ζ

SEQ ID NO: 4: NFMC63-28Z-21Ra

MGVLLTQRTLLSLVALLFPSMASMDIQMTQTTSSLASLGDRVATICRASQDISKYLNWYQ
 5 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG
 GGTKEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
 10 SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
 KHYYYGGSYAMDYWQQGTSVTVSSAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPPLFP
 GPSKPFWVLVVGGVLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP
 15 YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
 20 QALPPRGGGSGGGSGGGSKTHPLWRLWKKIWAVPSPERFFMPLYKGCSGDFKKW
 GAPFTGSSLELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRQLTELQEPAELVESDGVPKPSFW
 PTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSP
 25 GLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPP~~LADGEDWAGGLPWGGRSPG~~
 GVSESEAGSPLAGLDMDTFDGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWWVIPPLS
 30 SPGPQAS

1-25: PÉPTIDO SEÑAL
 26-270: SCFV DE FMC63
 274-312: DOMINIO EXTRACELULAR PARCIAL DE CD28
 35 313-339: DOMINIO TRANSMEMBRANA DE CD28
 340-380: DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE CD28
381-492: DOMINIO INTRACELULAR DE CD3ζ
 508-790: DOMINIO ALFA DEL RECEPTOR DE IL-21 CITOPLASMÁTICO DE LONGITUD COMPLETA

40 SEQ ID NO: 5: Fragmento truncado del dominio citoplasmático de la cadena β de IL-2R
 NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLS
SPFPSSSFSPGGLAPEISPL

45 EVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV

SEQ ID NO: 6: dominio citoplasmático de la cadena α de IL-21 humano
 KTHPLWRLWKKIWA
VPSPERFFMPLYKGCSGDFKKWGAPFTGSSLELGPWSPEVPSTLE
 50 VYSCHPPRSPAKRQLTELQEPAELVESDGVPKPSFWPTAQN
SGGSAYSEERDRPYGLVS
 IDTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSP
 55 GLGGPLGSLLDRLKPP~~LADGEDWAGGLPWGGRSPGGV~~
SESEAGSPLAGLDMDTFDGFV
GSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWWVIPPLSSPGPQAS

60 11-19: MOTIVO BOX 1
 264: RESIDUO DE TIROSINA QUE PUEDE FOSFORILARSE
 265-267 - residuos flanqueantes de tirosina

SEQ ID NO: 7: dominio intracelular de CD3 ζ

5 RVKFSRSADAPAYQQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKP RRKNPQEGL

YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 8: dominio intracelular de CD28

10 RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

SEQ ID NO: 9: dominio transmembrana de CD28

FWVLVVVGVLACYSLLVTAVFIIFWV

SEQ ID NO: 10: dominio extracelular parcial de CD28

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP

15 SEQ ID NO: 11

NP_000869.1, 266-551:

20 NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLS SPFSSFSPGGLAPEISPL

EVLERDKVTQLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPY

25 SEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQLSGEDDAYCTFPSRDDLFFSPSLLGGPSPPSTAPGG

SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPP ELVLREAGEEVPDAGPR

EGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

30 SEQ ID NO: 12 - YLSLQ

SEQ ID NO: 13 - YXXQ

SEQ ID NO: 14 - YLPSNID

SEQ ID NO: 15 - YCTFP

35 SEQ ID NO: 16 - YFFFH

SEQ ID NO: 17 - YVTMS

SEQ ID NO: 18 - YLPQE

SEQ ID NO: 19 - KLGGSGP

SEQ ID NO: 20 - YKAQS

40 SEQ ID NO: 21 - YKPFQ

SEQ ID NO: 22 - YRHQ

SEQ ID NO: 23 - YXPQ

SEQ ID NO: 24: 28-IL2RB-z(YXXQ) WITH CON MOTIVO DE ASOCIACIÓN A STAT3 EN LAS POSICIONES
 104-107 104-107 DEL DOMINIO INTRACELULAR DE CD3 ζ

5 MGVLLTQRTLLSLVALLFPSMASMDIQMTQTTSSLSASLGDRVVTISCRASQDISKYLNWYQ
 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG

10 GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
 SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
 KHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPYYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPPLFP

15 GPSKPFWVLVVVGVLACYSLVTVAIFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP
YAPPRDFAAYRSNCRNTGPWLKKVLCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSPPFPSSF

20 SPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQQGQDPHTLVRVKFSRSADAPAYQQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEI
 GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAYXXQALPPR

25

1-25: PÉPTIDO SEÑAL
 26-270: SCFV DE FMC63
 274-312: DOMINIO EXTRACELULAR PARCIAL DE CD28
 30 313-339: DOMINIO TRANSMEMBRANA DE CD28
 340-380: DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE CD28
381-474: DOMINIO BETA DEL RECEPTOR DE IL-2 CITOPLASMÁTICO PARCIAL
 475-586: DOMINIO INTRACELULAR DE CD3 ζ QUE COMPRENDE EL MOTIVO DE ASOCIACIÓN A STAT3
 EXÓGENO YXXQ

35

SEQ ID NO: 25: 28-IL2RB-z(YRHQ) CON MOTIVO DE ASOCIACIÓN A STAT3 YRHQ (SEQ ID
 NO: 22) EN LAS POSICIONES 104-107 DEL DOMINIO INTRACELULAR DE CD3 ζ

40 MGVLLTQRTLLSLVALLFPSMASMDIQMTQTTSSLSASLGDRVVTISCRASQDISKYLNWYQ
 QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFG

45 GGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV
 SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA
 KHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAIEVMYPYYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPPLFP

50 GPSKPFWVLVVVGVLACYSLVTVAIFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP
YAPPRDFAAYRSNCRNTGPWLKKVLCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSPPFPSSF

55 SPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQQGQDPHTLVRVKFSRSADAPAYQQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEI
 GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAYRHQALPPR

60

1-25: PÉPTIDO SEÑAL
 26-270: SCFV DE FMC63
 274-312: DOMINIO EXTRACELULAR PARCIAL DE CD28
 313-339: DOMINIO TRANSMEMBRANA DE CD28
 340-380: DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE CD28
381-474: DOMINIO BETA DEL RECEPTOR DE IL-2 CITOPLASMÁTICO PARCIAL

475-586: DOMINIO INTRACELULAR DE CD3 ζ QUE COMPRENDE EL MOTIVO DE ASOCIACIÓN A STAT3 EXÓGENO YRHQ
 SEQ ID NO: 26 - ACGCCTATGCCATCAGGCCCTGC
 SEQ ID NO: 27 - CTGATGGCGATAGCGTCGTAGGTGT
 5 SEQ ID NO: 28 - YFFF
 SEQ ID NO: 29 - YCTF
 SEQ ID NO: 30 - YLRQ
 SEQ ID NO: 31 - YFKQ
 SEQ ID NO: 32 - YLPQ
 10 SEQ ID NO: 33 - YMPQ
 SEQ ID NO: 34 - YVLQ
 SEQ ID NO: 35 - YQPQ
 SEQ ID NO: 36 - YKPQ
 SEQ ID NO: 37 - YRPQ
 15 SEQ ID NO: 38 - YTHQ
 SEQ ID NO: 39 - YLKQ
 SEQ ID NO: 40 - YHNQ
 SEQ ID NO: 41 - YXXL
 SEQ ID NO: 42 - IDGGGGSGGGGSGGGS
 20 SEQ ID NO: 43 - YSL

Lista de citas

- 25 Markley JC y otros, IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. Blood, vol. 29, págs. 3508-3519.
 Zeng R y otros, Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. J Exp Med, vol. 201, págs. 139-148.
- 30 Sadelain M y otros, Current Opinion in Immunology, vol. 21, págs. 215-223 (2009)
 Finney, H.M. y otros, J. Immunology, vol. 172, págs. 104-113 (2004)
 Thimeli M y otros, Nature Biotechnology Vol 31, págs. 928-935 (2013)
 Kisseleva T y otros, Gene Vol 285, págs. 1-24 (2002)
 Cui y otros, Immunity 35, 795-805, 2011
 Siegel y otros, Immunity 34, 806-818, 2011
 Kochenderfer y otros, (J Immunother. Septiembre de 2009;32(7):689-702
 35 Themeli y otros, Nat Biotechnol. Vol 31, págs.928-933. (2013)
 Nicholson y otros, Mol Immunol. Vol 34, págs.1157-1165 (1997)
 Butler y otros, PLoS One. Vol 7, e30229. (2012)
 Milone y otros, Mol Ther. Vol 17, págs.1453-1464. (2009)
 Love PE, Hayes SM. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(6): a002485.
- 40 Irving BA, Chan AC, Weiss A. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. J Exp Med. 1993;177(4):1093-103.
 Shores EW, Tran T, Grinberg A, Sommers CL, Shen H, Love PE. Role of the multiple T cell receptor (TCR)-zeta chain signaling motifs in selection of the T cell repertoire. J Exp Med. 1997; 185(5):893-900.
- 45 Shao H, Xu X, Mastrangelo MA, Jing N, Cook RG, Legge GB, Tweardy DJ. Structural requirements for signal transducer and activator of transcription 3 binding to phosphotyrosine ligands containing the YXXQ motif. J Biol Chem. 2004;279(18):18967-73.
 Friedmann MC, Migone TS, Russell SM, Leonard WJ. Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(5):2077-82.
- 50 Klingmüller U, Bergelson S, Hsiao JG, Lodish HF. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(16):8324-8.
 Klock HE, Koesema EJ, Knuth MW, Lesley SA (2008) Combining the polymerase incomplete primer extension method for cloning and mutagenesis with microscreening to accelerate structural genomics efforts. Proteins 71: 982-994.
- 55 Li MZ, Elledge SJ (2007) Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. Nat Methods 4: 251-256.
 Bryksin AV, Matsumura I (2010) Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. Biotechniques 48: 463-465.
- 60 Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. J Struct Biol 172: 34-44.
 Schmitz J. y otros, The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction. J Immunol. 2000;164:848-54.
- 65 Tomida M y otros, 1999. Cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor required for STAT3 activation, differentiation, and growth arrest of myeloid leukemic cells. Blood. 1999;93:1934-41.

Listado de secuencias

5 <110> University Health Network
 TANAKA, Shinya

10 <120> RECEPTORES DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

15 <130> 10723-P47312PC00

20 <150> 62/115,527
 <151> 2015-02-12

25 <160> 43

30 <170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1
 <211> 492
 <212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Constructo sintético NFMC63-28Z

50 <400> 1

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

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr
20 25 30

Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
35 40 45

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His
65 70 80

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
85 90 95

Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe
100 105 110

Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
130 135 140

Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly

ES 2 857 998 T3

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

ES 2 857 998 T3

	Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
	405 410 415
5	Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
	420 425 430
10	Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
	435 440 445
	Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
	450 455 460
15	Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
	465 470 475 480
20	Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
	485 490
	<210> 2
	<211> 610
25	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
30	<223> Constructo sintético NFMC63-28-d2RbZ
	<400> 2
35	Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
	1 5 10 15
	Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr
	20 25 30
40	Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
	35 40 45
45	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
	50 55 60
50	Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His
	65 70 75 80
	Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
	85 90 95
55	Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe
	100 105 110
60	Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys

ES 2 857 998 T3

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

ES 2 857 998 T3

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Gly Gly
 370 375 380

5 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asn Cys Arg
 385 390 395 400

10 Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp
 405 410 415

15 Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly Asp Val
 420 425 430

20 Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Phe Ser Pro Gly
 435 440 445

25 Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys
 450 455 460

30 Val Thr Gln Leu Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln
 465 470 475 480

35 Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val Lys Leu Gly Gly Ser
 485 490 495

40 Gly Pro Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
 500 505 510

45 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 515 520 525

50 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 530 535 540

55 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 545 550 555 560

60 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 565 570 575

65 Glu Arg Arg Arg Gly Lys His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 580 585 590

70 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 595 600 605

75 Pro Arg
 610

<210> 3
 <211> 782
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético NFMC63-28-21RaZ

65 <400> 3

ES 2 857 998 T3

	Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr	Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1	5	10 15
5	Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr	20 25 30
10	Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys	35 40 45
	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys	50 55 60
15	Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His	65 70 75 80
20	Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr	85 90 95
25	Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe	100 105 110
	Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys	115 120 125
30	Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly	130 135 140
35	Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly	145 150 155 160
40	Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly	165 170 175
	Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg	180 185 190
45	Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr	195 200 205

ES 2 857 998 T3

Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser
 210 215 220

5 Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr
 225 230 235 240

10 Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala
 245 250 255

15 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala
 260 265 270

20 Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
 275 280 285

25 Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
 290 295 300

30 Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 305 310 315 320

35 Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 325 330 335

40 Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 340 345 350

45 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 355 360 365

50 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Thr His Pro
 370 375 380

55 Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg
 385 390 395 400

60 Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp
 405 410 415

65 Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser
 420 425 430

70 Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Arg
 435 440 445

75 Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala Glu
 450 455 460

ES 2 857 998 T3

	Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr Ala			
	465	470	475	480
5	Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr			
	485	490	495	
10	Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly Pro			
	500	505	510	
Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp				
15	515	520	525	
Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu Leu				
20	530	535	540	
Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly Ser				
25	545	550	555	560
Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys Pro				
	565	570	575	
Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly Gly				
30	580	585	590	
Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu Ala				
	595	600	605	
Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp Cys				
35	610	615	620	
Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro				
	625	630	635	640
Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser				
40	645	650	655	
Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser Lys Leu Gly Gly Ser Gly Pro Arg Val				
45	660	665	670	
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn				
	675	680	685	
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val				
50	690	695	700	
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg				
55	705	710	715	720

ES 2 857 998 T3

	Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys	725	730	735	
5	Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg	740	745	750	
10	Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys	755	760	765	
15	Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	770	775	780	
20	<210> 4 <211> 790 <212> PRT <213> Secuencia Artificial				
25	<220> <223> Constructo sintético NFMC63-28Z-21Ra				
30	<400> 4				
35	Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala	1	5	10	15
40	Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr	20	25	30	
45	Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys	35	40	45	
50	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys	50	55	60	
55	Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His	65	70	75	80
60	Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr	85	90	95	
65	Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe	100	105	110	
70	Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys	115	120	125	
75	Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly	130	135	140	

ES 2 857 998 T3

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

ES 2 857 998 T3

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 405 410 415

5 Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 420 425 430

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

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

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

25 Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Gly Gly
 485 490 495

30 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Lys Thr His Pro Leu
 500 505 510

35 Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe
 515 520 525

40 Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val
 530 535 540

45 Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro
 545 550 555 560

50 Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Arg Ser
 565 570 575

55 Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala Glu Leu
 580 585 590

60 Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr Ala Gln
 595 600 605

65 Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly
 610 615 620

70 Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly Pro Cys
 625 630 635 640

75 Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp Leu

ES 2 857 998 T3

	645	650	655
5	Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu Leu Asp 660 665 670		
10	Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly Ser Pro 675 680 685		
15	Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys Pro Pro 690 695 700		
20	Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly Gly Arg 705 710 715 720		
25	Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu Ala Gly 725 730 735		
30	Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp Cys Ser 740 745 750		
35	Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro 755 760 765		
40	Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser 770 775 780		
45	Pro Gly Pro Gln Ala Ser 785 790		
50	<210> 5 <211> 94 <212> PRT <213> Homo Sapiens		
55	<400> 5		
60	Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn 1 5 10 15		
65	Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly 20 25 30		
70	Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Phe 35 40 45		
75	Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu 50 55 60		
80	Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu 65 70 75 80		
85	Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val 85 90		

ES 2 857 998 T3

<210> 6
<211> 283
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

5

<400> 6

Lys	Thr	His	Pro	Leu	Trp	Arg	Leu	Trp	Lys	Lys	Ile	Trp	Ala	Val	Pro
1				5				10				15			

10

Ser	Pro	Glu	Arg	Phe	Phe	Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Gly	Cys	Ser	Gly	Asp
		20				25					30				

15

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

20

Gly	Pro	Trp	Ser	Pro	Glu	Val	Pro	Ser	Thr	Leu	Glu	Val	Tyr	Ser	Cys
		50				55				60					

25

His	Pro	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Lys	Arg	Leu	Gln	Leu	Thr	Glu	Leu	Gln
65					70				75			80			

30

Glu	Pro	Ala	Glu	Leu	Val	Glu	Ser	Asp	Gly	Val	Pro	Lys	Pro	Ser	Phe
				85				90			95				

35

Trp	Pro	Thr	Ala	Gln	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Tyr	Ser	Glu	Glu	Arg
				100				105			110				

40

Asp	Arg	Pro	Tyr	Gly	Leu	Val	Ser	Ile	Asp	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Asp
115						120					125				

45

Ala	Glu	Gly	Pro	Cys	Thr	Trp	Pro	Cys	Ser	Cys	Glu	Asp	Asp	Gly	Tyr
130					135					140					

50

Pro	Ala	Leu	Asp	Leu	Asp	Ala	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Pro	Gly	Leu	Glu
145					150				155			160			

ES 2 857 998 T3

195 200 205

5 Pro Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly
 210 215 220

10 Ser Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val
 225 230 235 240

15 Gly Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly
 245 250 255

20 Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro
 260 265 270 275

25 Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
 275 280

<210> 7
<211> 112
<212> PRT
25 <213> Homo Sapiens

<400> 7

30 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

55 <210> 8
<211> 41
<212> PRT
55 <213> Homo Sapiens

60 <400> 8

ES 2 857 998 T3

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

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

10 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

15 <210> 9
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

20 <400> 9

Phe Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

25 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

30 <210> 10
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

35 <400> 10

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

40 Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30

45 Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
35

50 <210> 11
<211> 286
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

55 <400> 11

Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn
1 5 10 15

55 Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly
20 25 30

ES 2 857 998 T3

	Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe			
	35	40	45	
5	Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu			
	50	55	60	
10	Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu			
	65	70	75	80
15	Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn			
	85	90	95	
20	Gln Gly Tyr Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala			
	100	105	110	
25	Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp			
	115	120	125	
30	Glu Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln			
	130	135	140	
35	Pro Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp			
	145	150	155	160
40	Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro			
	165	170	175	
45	Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro			
	180	185	190	
50	Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly			
	195	200	205	
55	Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro			
	210	215	220	
60	Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro			
	225	230	235	240
65	Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu			
	245	250	255	
70	Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu			
	260	265	270	
75	Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val			
	275	280	285	
80	<210> 12			
	<211> 5			
	<212> PRT			
85	<213> Homo Sapiens			
90	<400> 12			
95	Tyr Leu Ser Leu Gln			
	1	5		

ES 2 857 998 T3

5 <210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <400> 13

 Tyr Xaa Xaa Gln
 1

15 <210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

20 <400> 14

 Tyr Leu Pro Ser Asn Ile Asp
 1 5

25 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

30 <400> 15

 Tyr Cys Thr Phe Pro
 1 5

35 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

40 <400> 16

 Tyr Phe Phe Phe His
 1 5

45 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

50 <400> 17

 Tyr Val Thr Met Ser
 1 5

55 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

60 <400> 18

 Tyr Leu Pro Gln Glu
 1 5

65

5 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Enlazador
 15 <400> 19
 10 Lys Leu Gly Gly Ser Gly Pro
 1 1 5
 15 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 20 <400> 20
 20 Tyr Lys Ala Phe Ser
 1 1 5
 25 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 30 <400> 21
 30 Tyr Lys Pro Phe Gln
 1 1 5
 35 <210> 22
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 40 <400> 22
 40 Tyr Arg His Gln
 1
 45 <210> 23
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 50 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 55 <400> 23
 55 Tyr Xaa Pro Gln
 1
 60 <210> 24
 <211> 586
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Constructo sintético 28-IL2RB-z(YXXQ)

ES 2 857 998 T3

<220>
<221> misc_característica
<222> (579)..(580)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 24

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

10

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr
20 25 30

15

Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys
35							40								45

20

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

25

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

30

Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe

ES 2 857 998 T3

5	100	105	110
	Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys 115	120	125
	Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly 130 135 140		
10	Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly 145 150 155 160		
15	Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly 165 170 175		
20	Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg 180 185 190		
	Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr 195 200 205		
25	Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser 210 215 220		
30	Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr 225 230 235 240		
	Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala 245 250 255		
35	Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala 260 265 270		
40	Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser 275 280 285		
45	Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro 290 295 300		
	Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly 305 310 315 320		
50	Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile 325 330 335		
55	Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met 340 345 350		

ES 2 857 998 T3

	Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro			
	355	360	365	
5	Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Asn Cys Arg Asn			
	370	375	380	
10	Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro			
	385	390	395	400
	Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly Asp Val Gln			
	405	410	415	
15	Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser Pro Gly Gly			
	420	425	430	
20	Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys Val			
	435	440	445	
25	Thr Gln Leu Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu			
	450	455	460	
	Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val Arg Val Lys Phe Ser Arg			
	465	470	475	480
30	Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn			
	485	490	495	
35	Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg			
	500	505	510	
	Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro			
	515	520	525	
40	Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala			
	530	535	540	
45	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His			
	545	550	555	560
50	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp			
	565	570	575	
	Ala Tyr Xaa Xaa Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	580	585		
55	<210> 25			
	<211> 586			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia Artificial			
60	<220>			
	<223> Constructo sintético 28-IL2RB-z(YRHQ)			
	<400> 25			

ES 2 857 998 T3

	Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala	
1	5	10
5	Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr	
	20	25
10	Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys	
	35	40
	45	
	Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys	
	50	55
15	60	
	Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His	
20	65	70
	75	80
	Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr	
25	85	90
	95	
	Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe	
	100	105
25	110	
	Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys	
	115	120
	125	
30	Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly	
	130	135
	140	
35	Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly	
	145	150
	155	160
	Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly	
40	165	170
	175	
	Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg	
	180	185
	190	
45	Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr	
	195	200
	205	
50	Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser	
	210	215
	220	

ES 2 857 998 T3

	Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr	
	225 230 235 240	
5	Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala	
	245 250 255	
10	Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala	
	260 265 270	
	Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser	
	275 280 285	
15	Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro	
	290 295 300	
20	Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly	
	305 310 315 320	
	Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile	
	325 330 335	
25	Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met	
	340 345 350	
30	Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro	
	355 360 365	
35	Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Asn Cys Arg Asn	
	370 375 380	
	Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro	
	385 390 395 400	
40	Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly Asp Val Gln	
	405 410 415	
45	Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser Pro Gly Gly	
	420 425 430	
	Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys Val	
	435 440 445	
50	Thr Gln Leu Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu	
	450 455 460	
55	Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val Arg Val Lys Phe Ser Arg	
	465 470 475 480	

ES 2 857 998 T3

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 485 490 495

5 Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 500 505 510

10 Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 515 520 525

15 Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 530 535 540

20 Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 545 550 555 560

25 Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 565 570 575

Ala Tyr Arg His Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 580 585

30 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

35 <400> 26
 acgcctatcg ccatcaggcc ctgc 24

40 <210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

45 <400> 27
 ctgatggcga taggcgtcgt aggtgt 26

<210> 28
 <211> 4

50 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 28

55 Tyr Phe Phe Phe
 1

<210> 29
 <211> 4

55 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 29

60 Tyr Cys Thr Phe
 1

<210> 30
 <211> 4

65 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 30

ES 2 857 998 T3

		Tyr	Leu	Arg	Gln
		1			
5	<210> 31 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens				
10	<400> 31	Tyr	Phe	Lys	Gln
		1			
15	<210> 32 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens				
20	<400> 32	Tyr	Leu	Pro	Gln
		1			
25	<210> 33 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens				
30	<400> 33	Tyr	Met	Pro	Gln
		1			
35	<210> 34 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens				
40	<400> 34	Tyr	Val	Leu	Gln
		1			
45	<210> 35 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens				
50	<400> 35	Tyr	Gln	Pro	Gln
		1			
55	<210> 36 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens				
60	<400> 36	Tyr	Lys	Pro	Gln
		1			
65	<210> 37 <211> 4				

<212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 37
 Tyr Arg Pro Gln
 1

10 <210> 38
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 15 <400> 38
 Tyr Thr His Gln
 1

20 <210> 39
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 25 <400> 39
 Tyr Leu Lys Gln
 1

30 <210> 40
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 35 <400> 40
 Tyr His Asn Gln
 1

40 <210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 45 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 50 <400> 41
 Tyr Xaa Xaa Leu
 1

55 <210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Enlazador
 <400> 42
 65

ES 2 857 998 T3

Ile Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

5 Ser

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

10 <213> Homo Sapiens

<400> 43

Tyr Leu Ser Leu

1

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígenos químicos (CAR) que comprende:
 - i) un dominio extracelular que puede unirse a un antígeno predeterminado;
 - ii) un dominio transmembrana; y
 - iii) un segmento intracelular que comprende a) un dominio citoplasmático truncado de la cadena beta del receptor de interleucina-2 que corresponde a la SEQ ID NO: 5 y b) un dominio intracelular de CD3 ζ caracterizado por tener un motivo de asociación a STAT3 exógeno que corresponde a YRHQ (SEQ ID NO: 22) en las posiciones 104-107 de la SEQ ID NO: 7.
2. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el segmento intracelular comprende además un dominio coestimulador citoplasmático, preferentemente un dominio citoplasmático de CD28, CD2, CD4, CD5, CD8 α , CD8 β , CD134 o CD137.
3. El CAR de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el dominio extracelular es una región de unión al antígeno de un anticuerpo, preferentemente en donde la región de unión al antígeno es un fragmento variable de cadena única.
4. El CAR de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el dominio transmembrana se selecciona del grupo que consiste en el dominio transmembrana de CD28 y el dominio transmembrana de CD8.
5. Un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un CAR de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, preferentemente en donde el ácido nucleico codifica el CAR y además codifica un péptido señal en el extremo N terminal.
6. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula que expresa el CAR de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y/o se transfecta o transduce con el ácido nucleico de la reivindicación 5 o el vector de la reivindicación 6.
8. Una composición que comprende el CAR, ácido nucleico, vector o célula de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y preferentemente un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Un método para preparar la célula de la reivindicación 7, que comprende
 - A. transducir una célula con el ácido nucleico de la reivindicación 5 o el vector de la reivindicación 6,
 - B.
 - a) aislar células inmunitarias de un mamífero, preferentemente en donde las células inmunitarias son células T; y
 - b) transfectar o transducir las células inmunitarias aisladas, preferentemente células T, con un ácido nucleico que codifica un CAR de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; o
 - C.
 - a) aislar células inmunitarias de un mamífero, preferentemente en donde las células inmunitarias son células T;
 - b) transfectar o transducir las células inmunitarias aisladas, preferentemente células T, con un ácido nucleico que codifica un CAR de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
 - c) aislar y/o expandir las células que expresan CAR, preferentemente células T que expresan CAR después de la transfección o transducción.
10. El CAR, ácido nucleico, vector, célula o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, para disminuir en un sujeto el número de células que expresan un antígeno predeterminado y/o para proporcionar una inmunidad antitumoral en un mamífero.

Figura 1

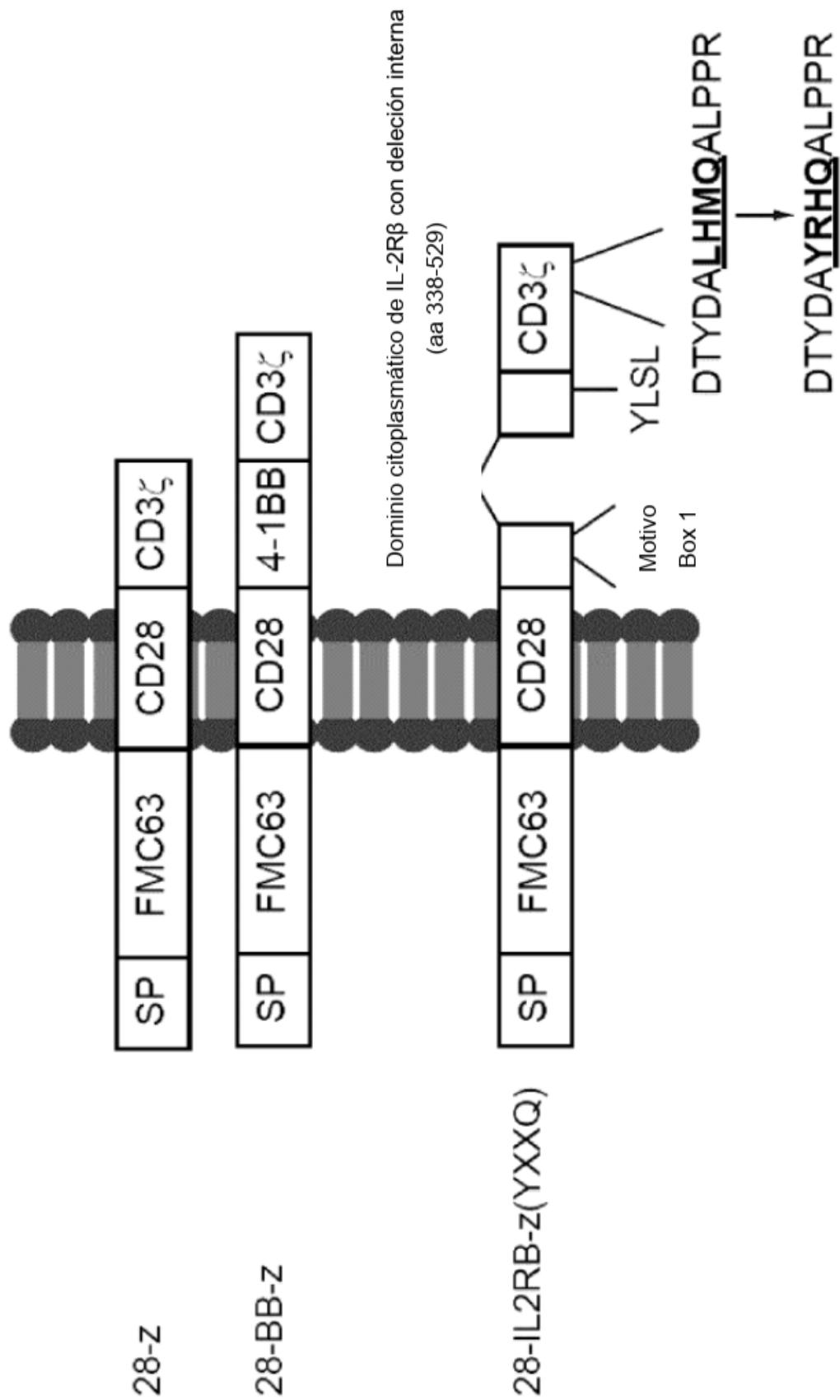


Figura 2

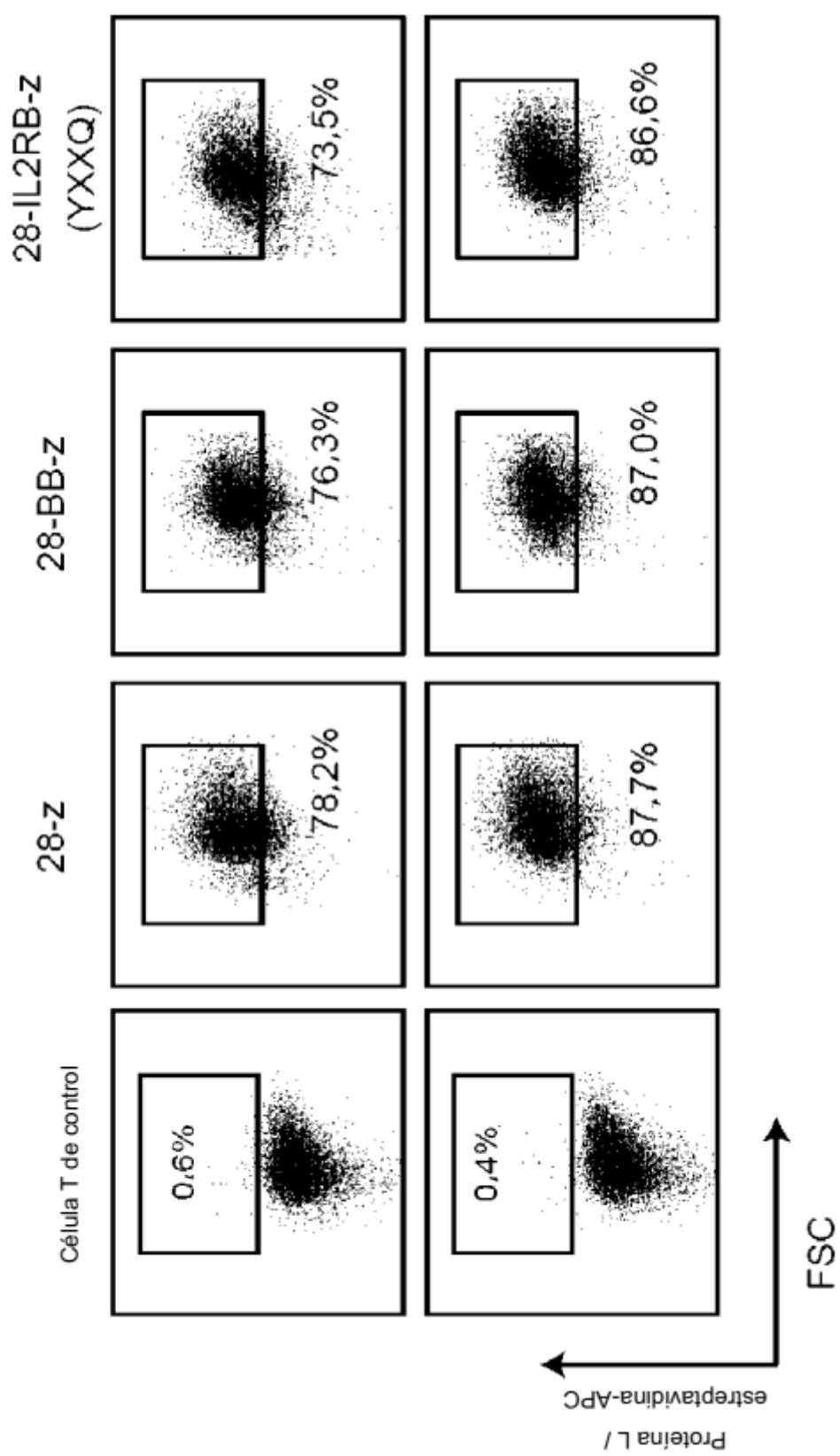
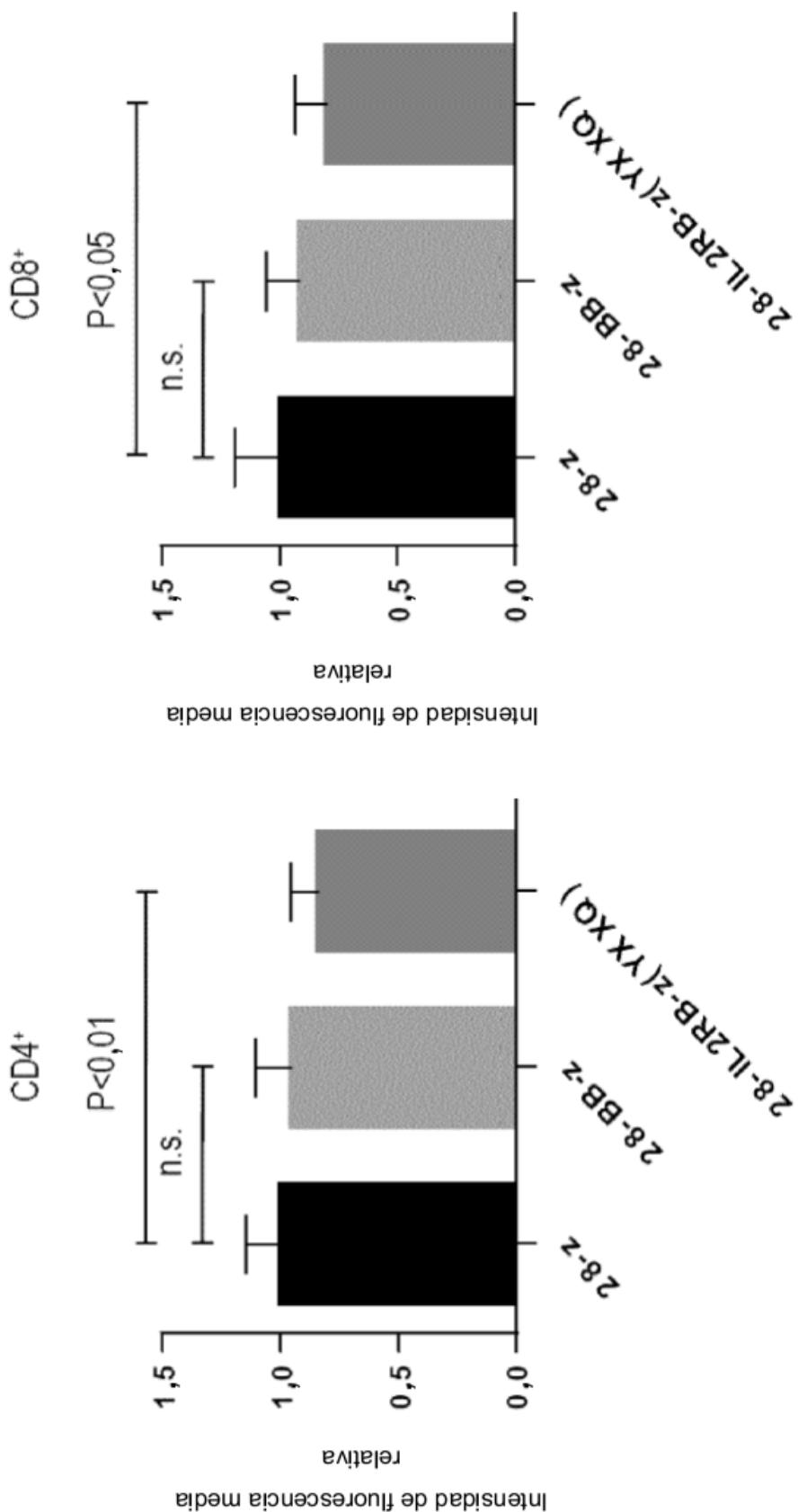


Figura 3



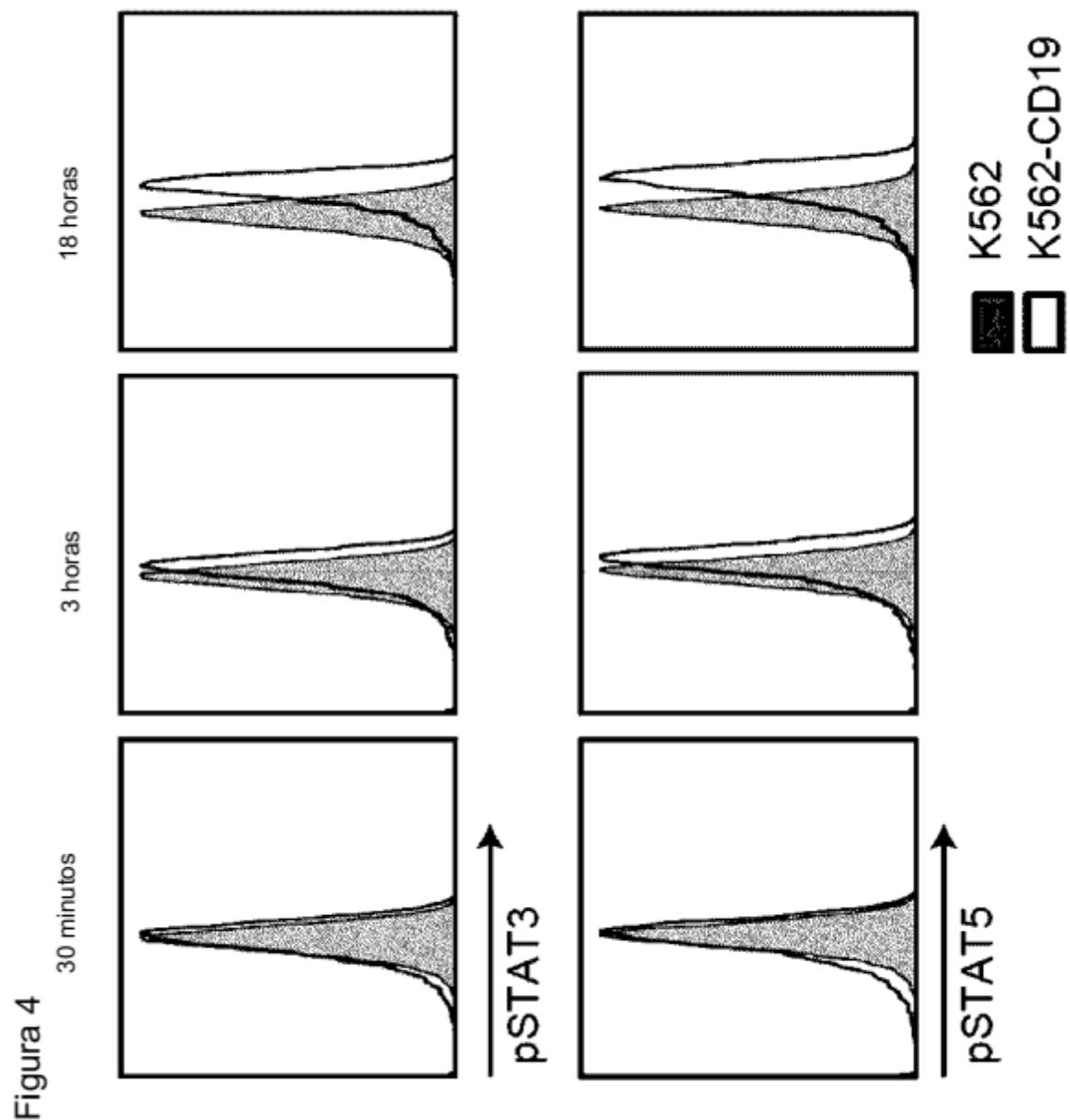


Figura 5

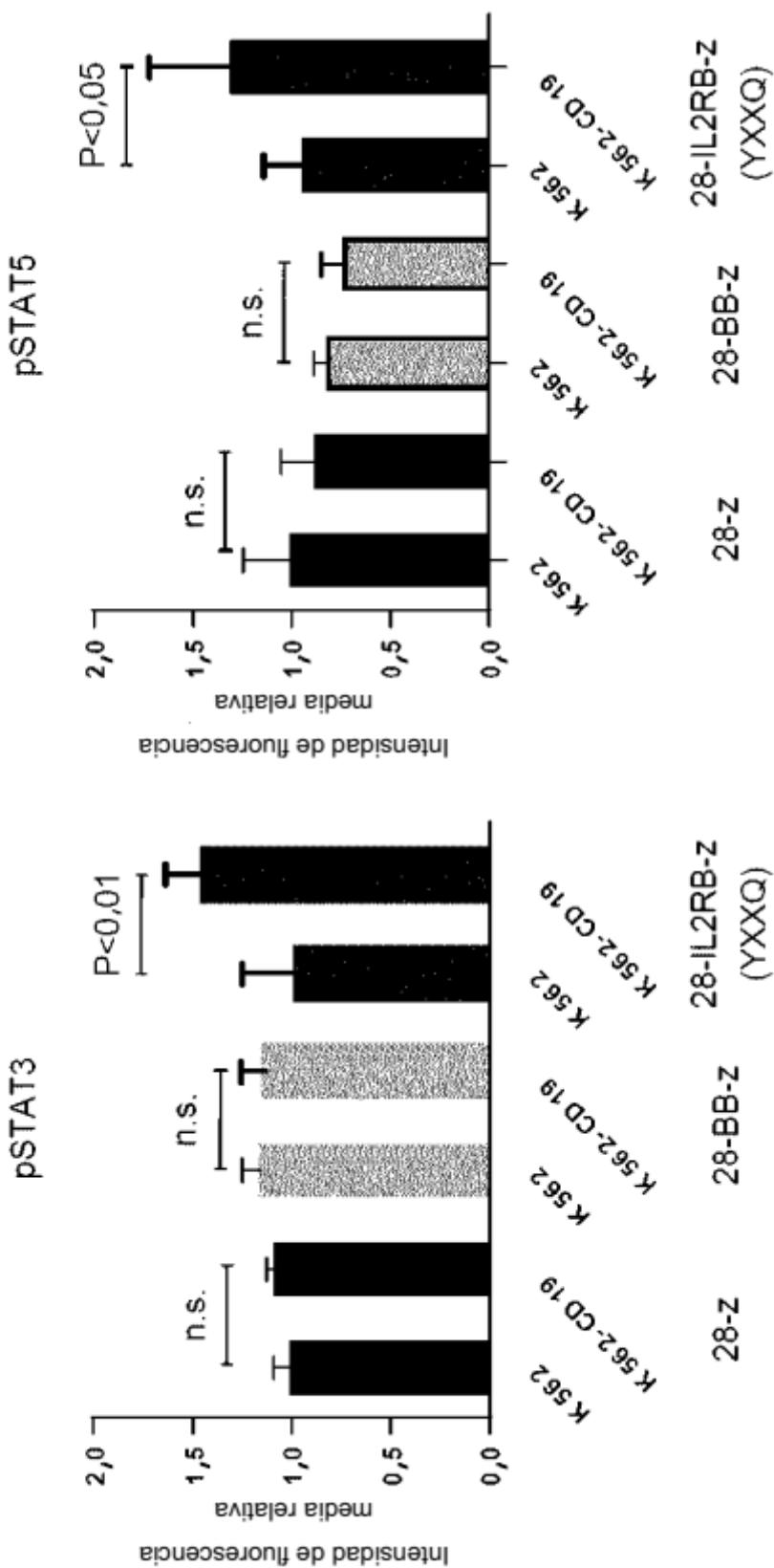


Figura 6

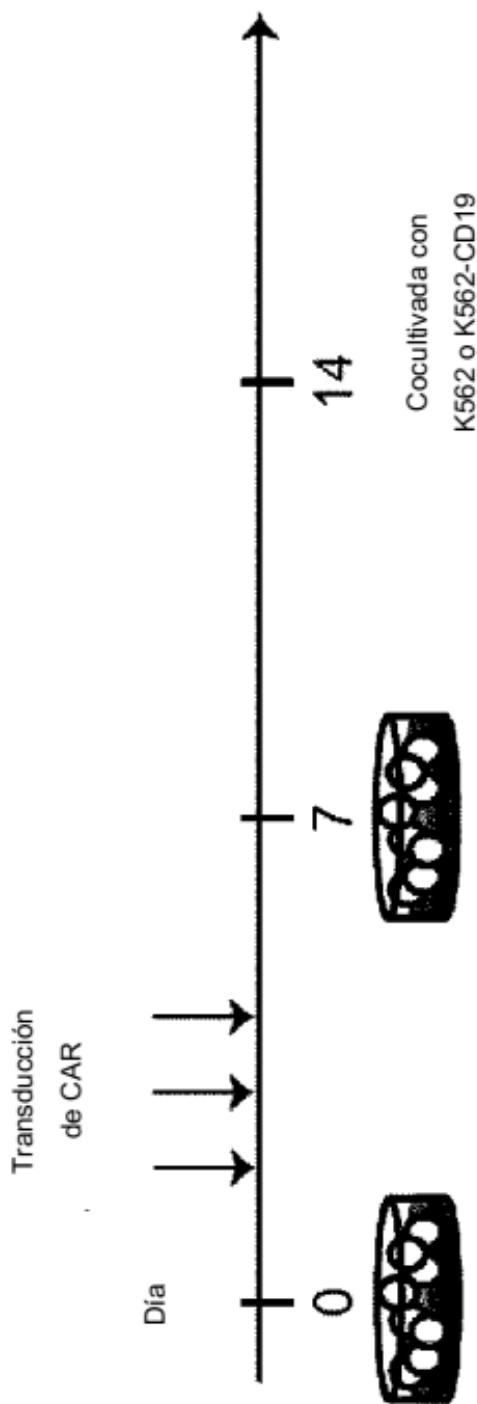


Figura 7

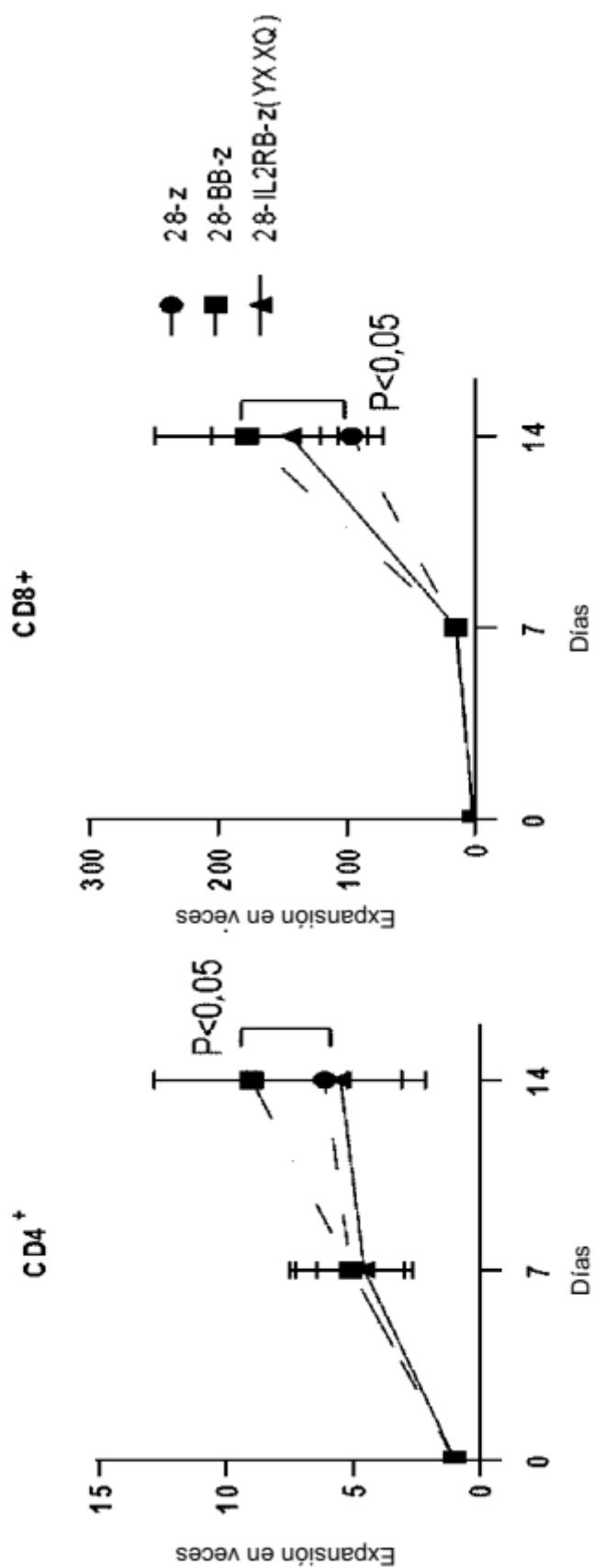


Figura 8

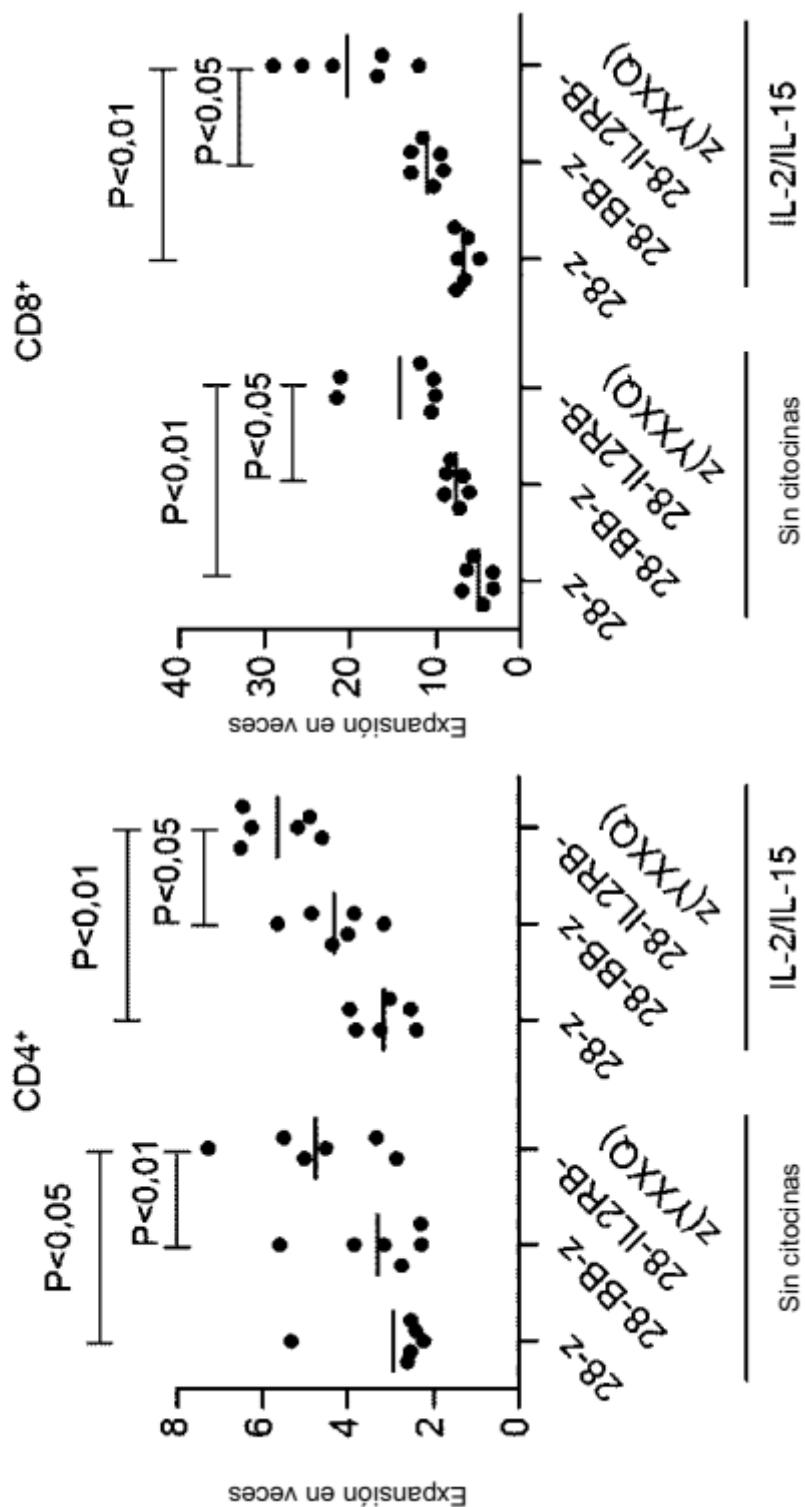


Figura 9

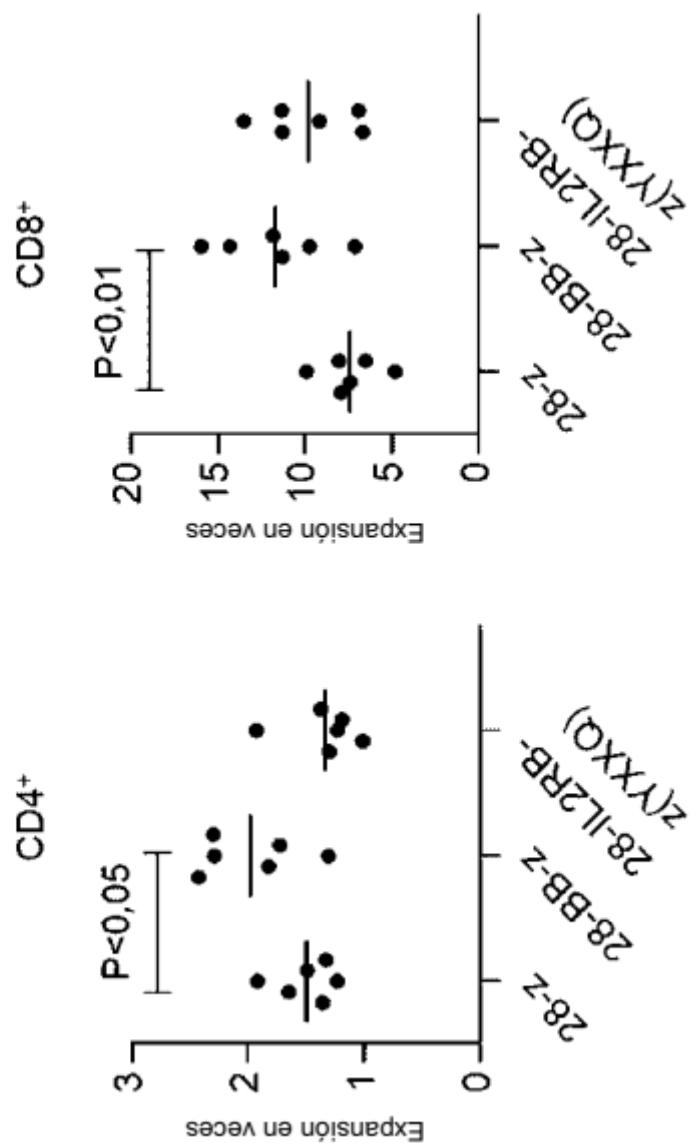


Figura 10

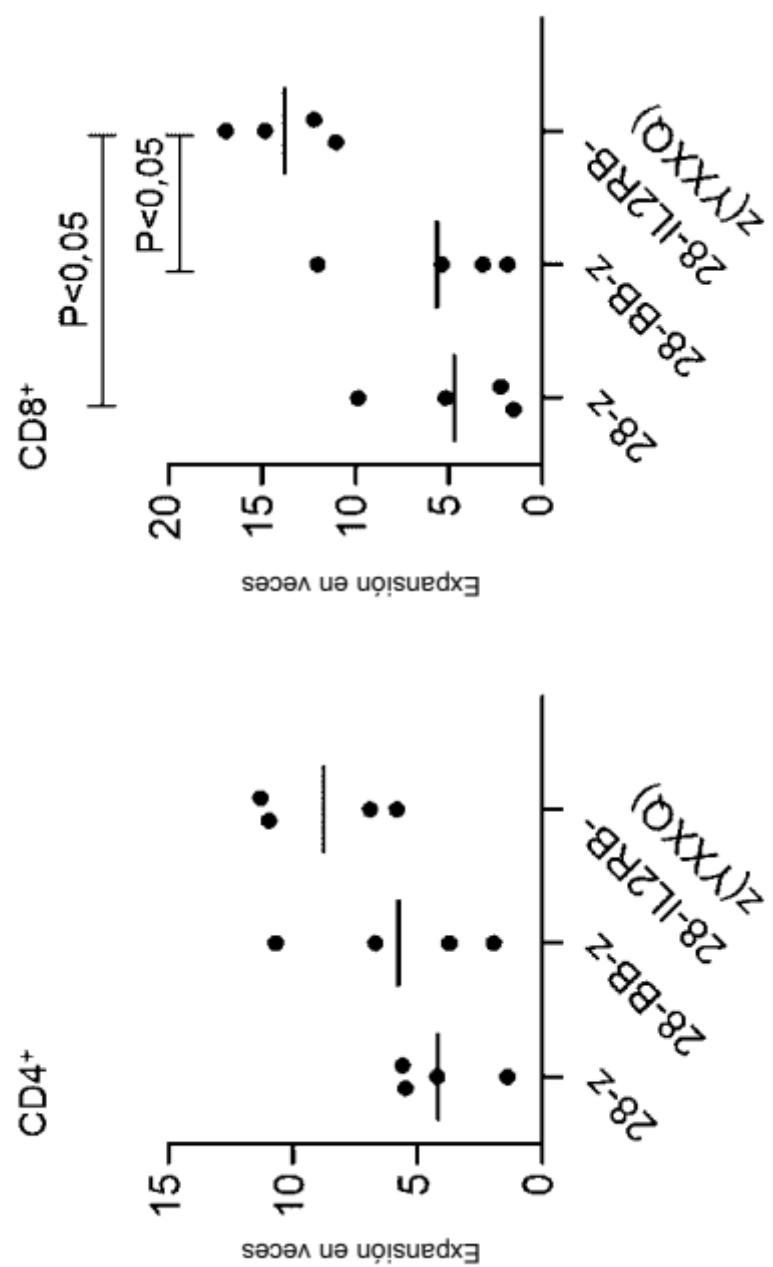


Figura 11

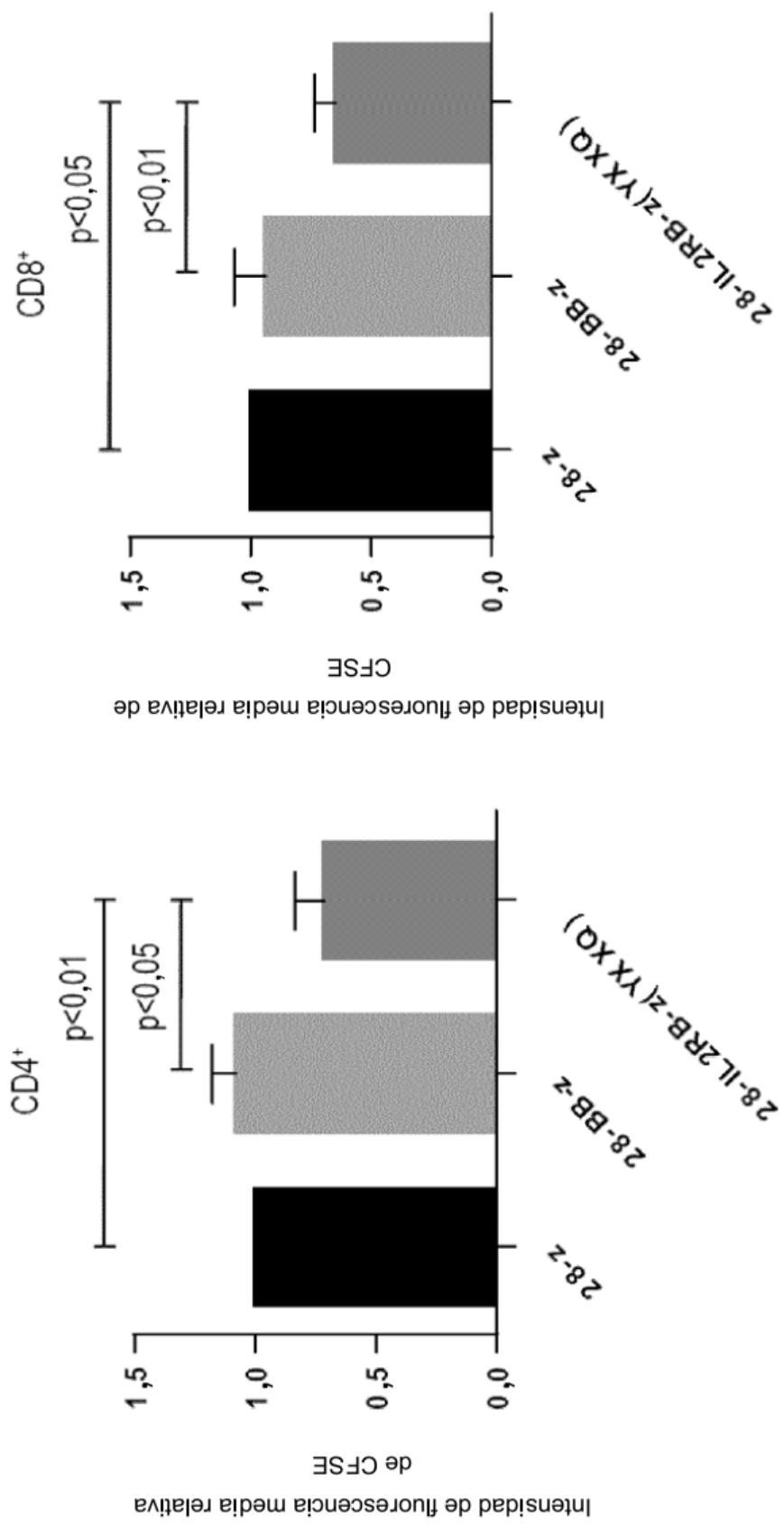


Figura 12

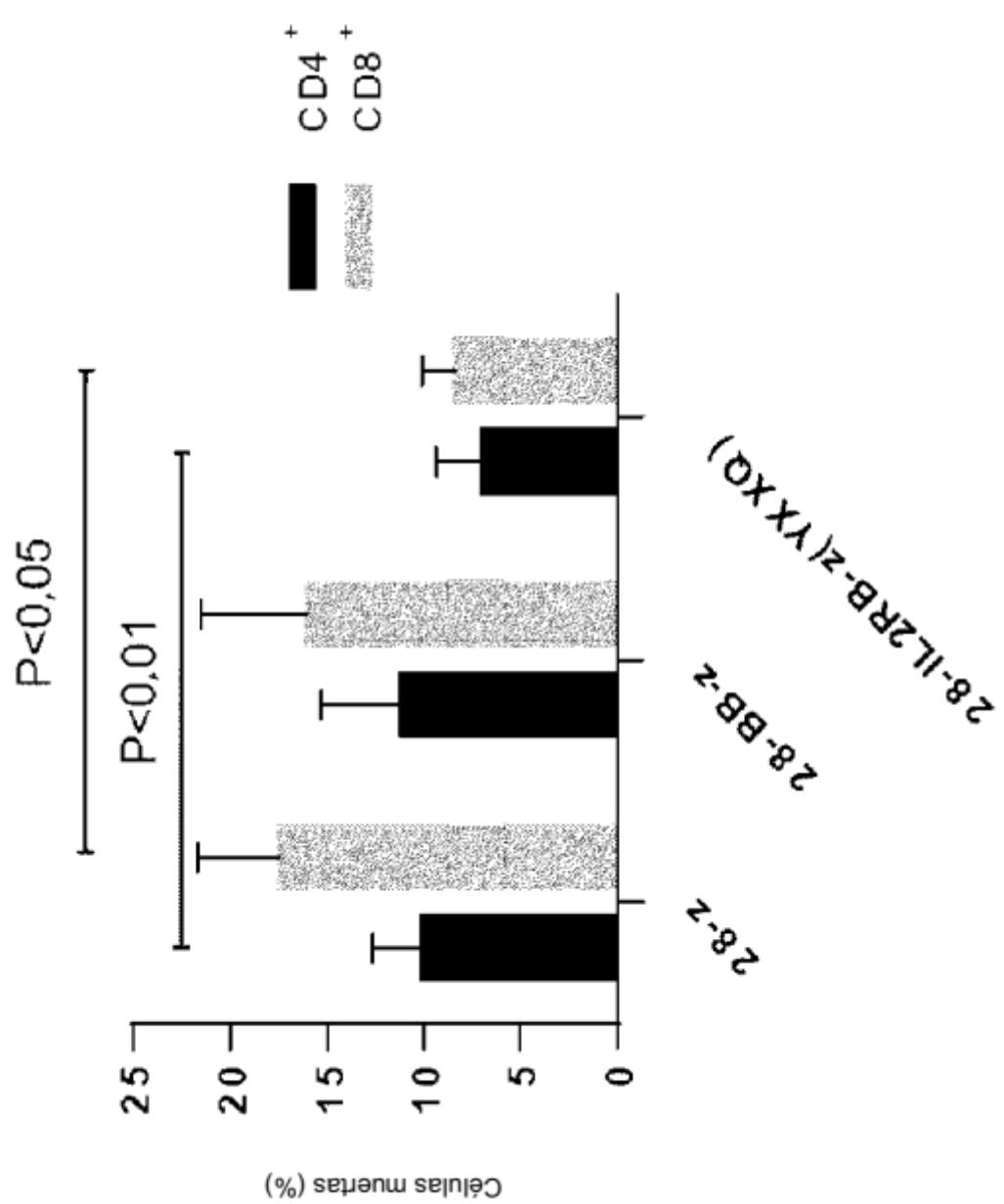


Figura 13

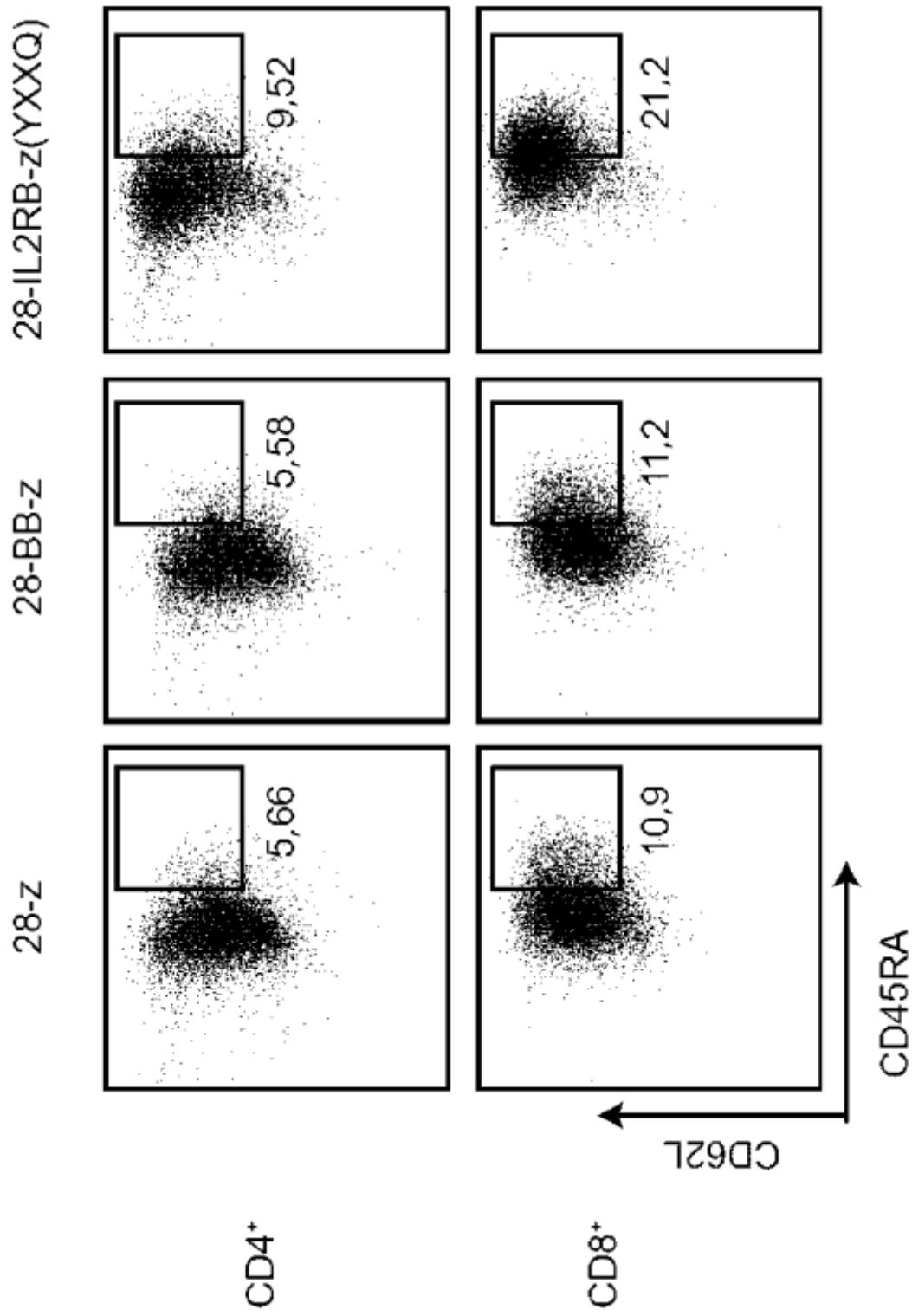


Figura 14

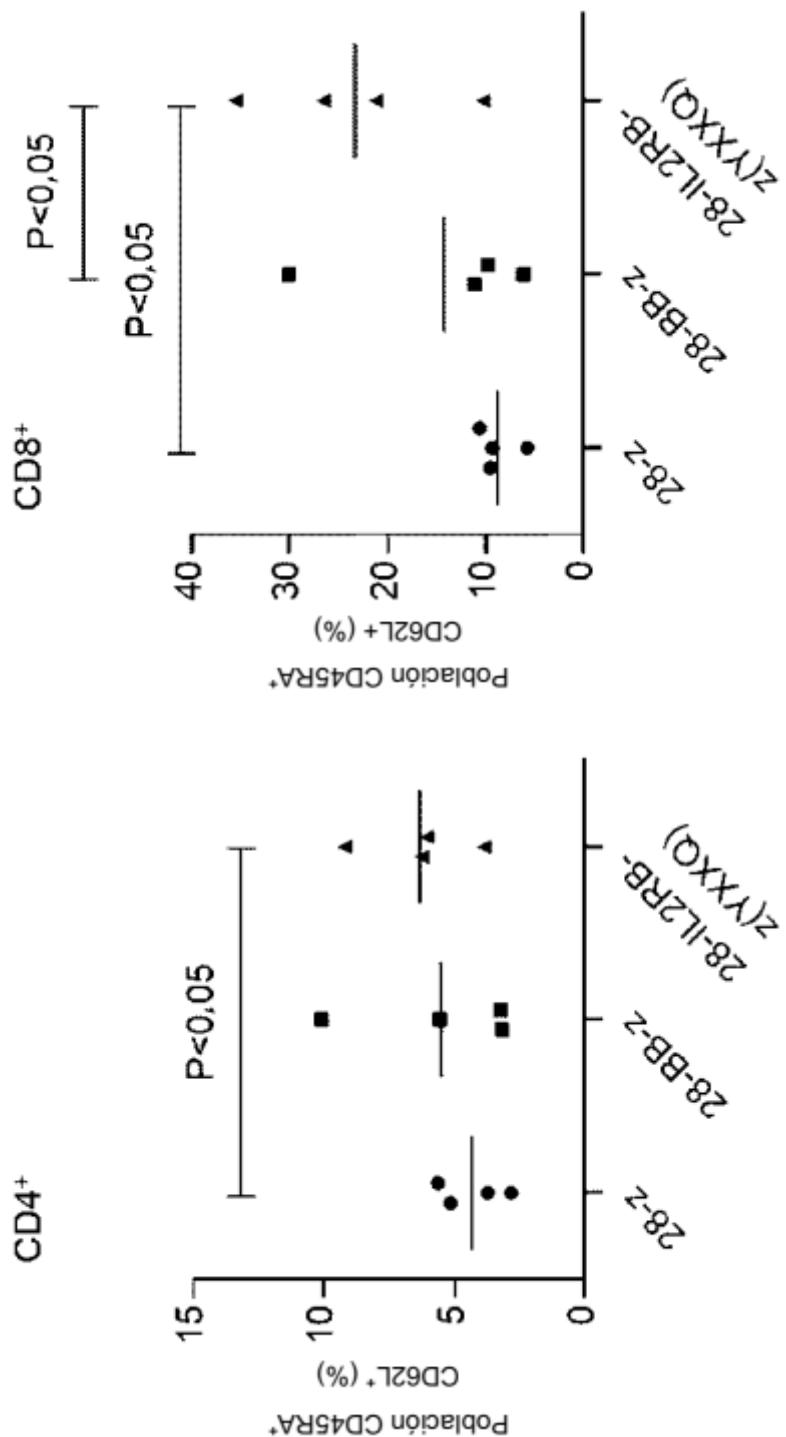


Figura 15

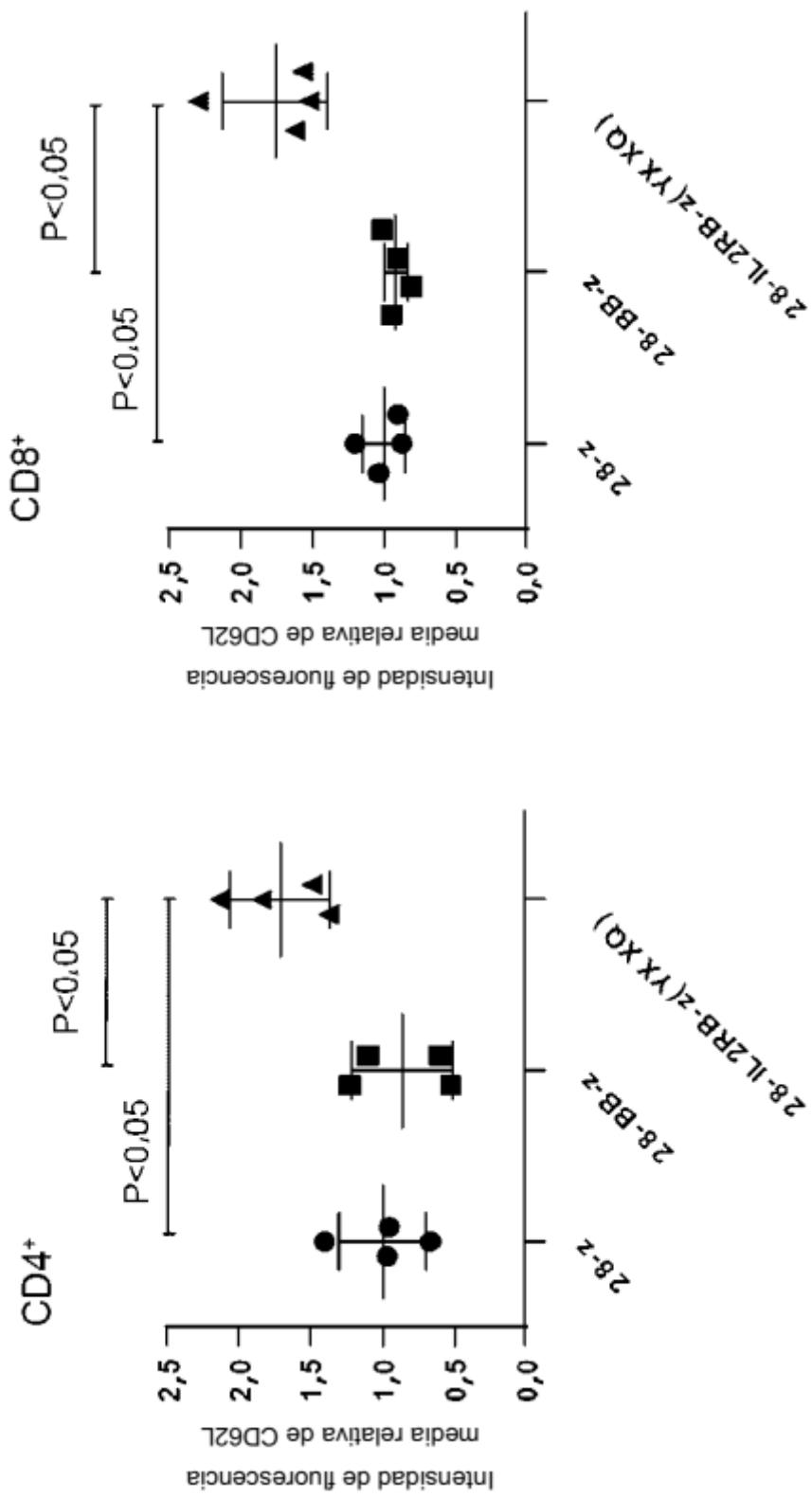


Figura 16

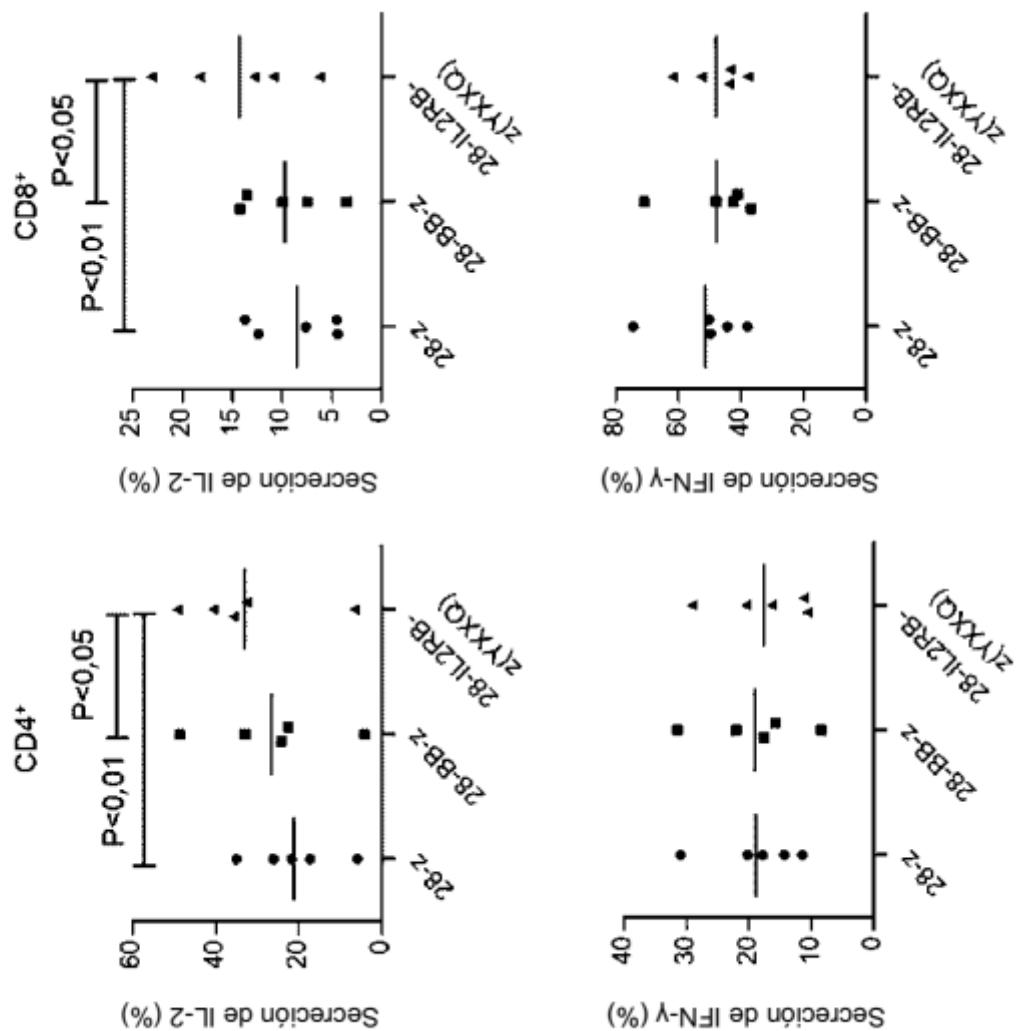


Figura 17

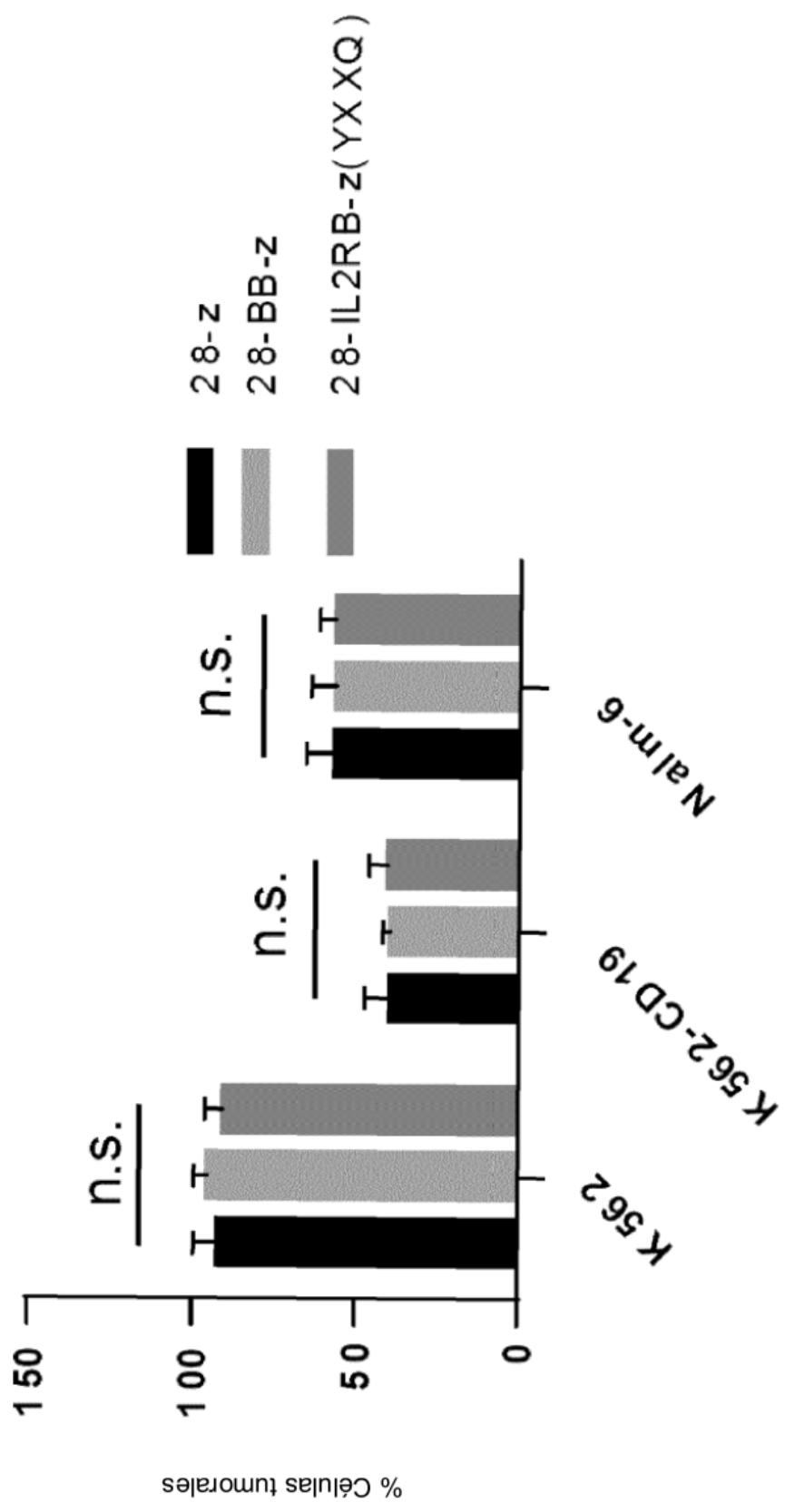
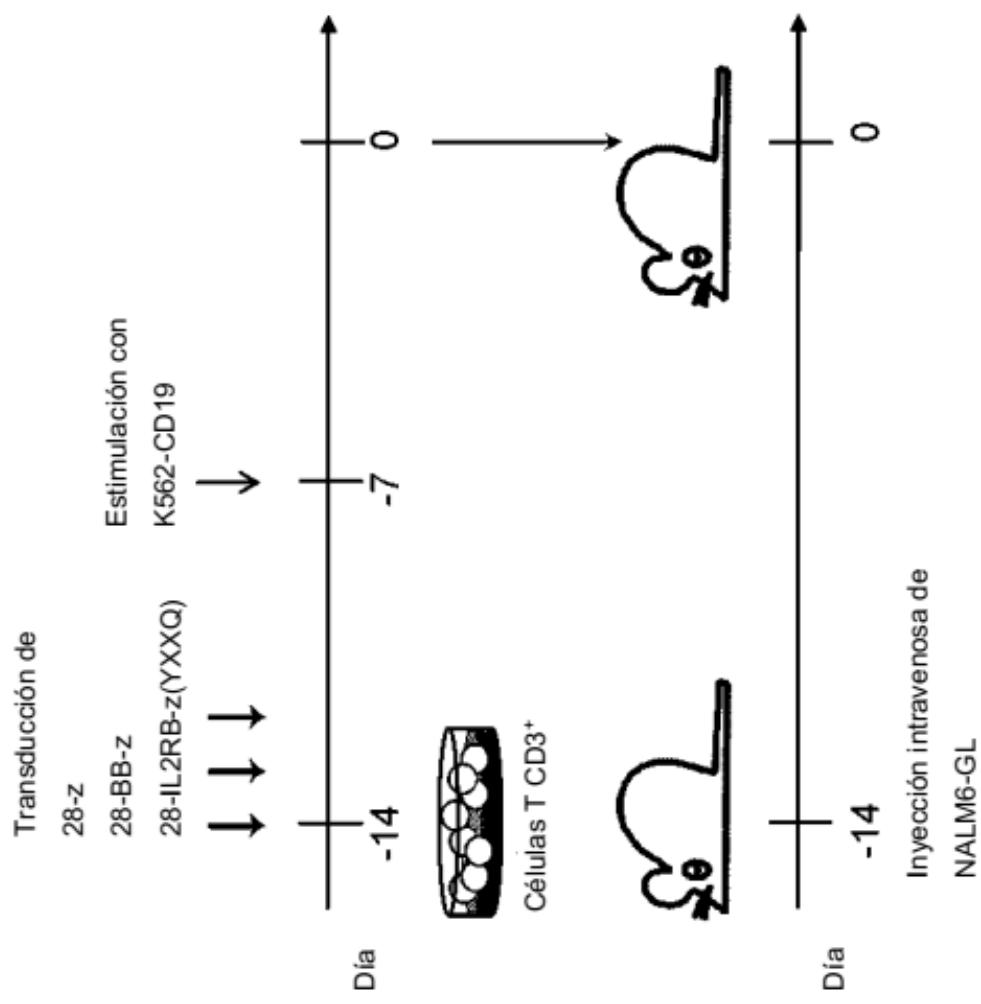


Figura 18



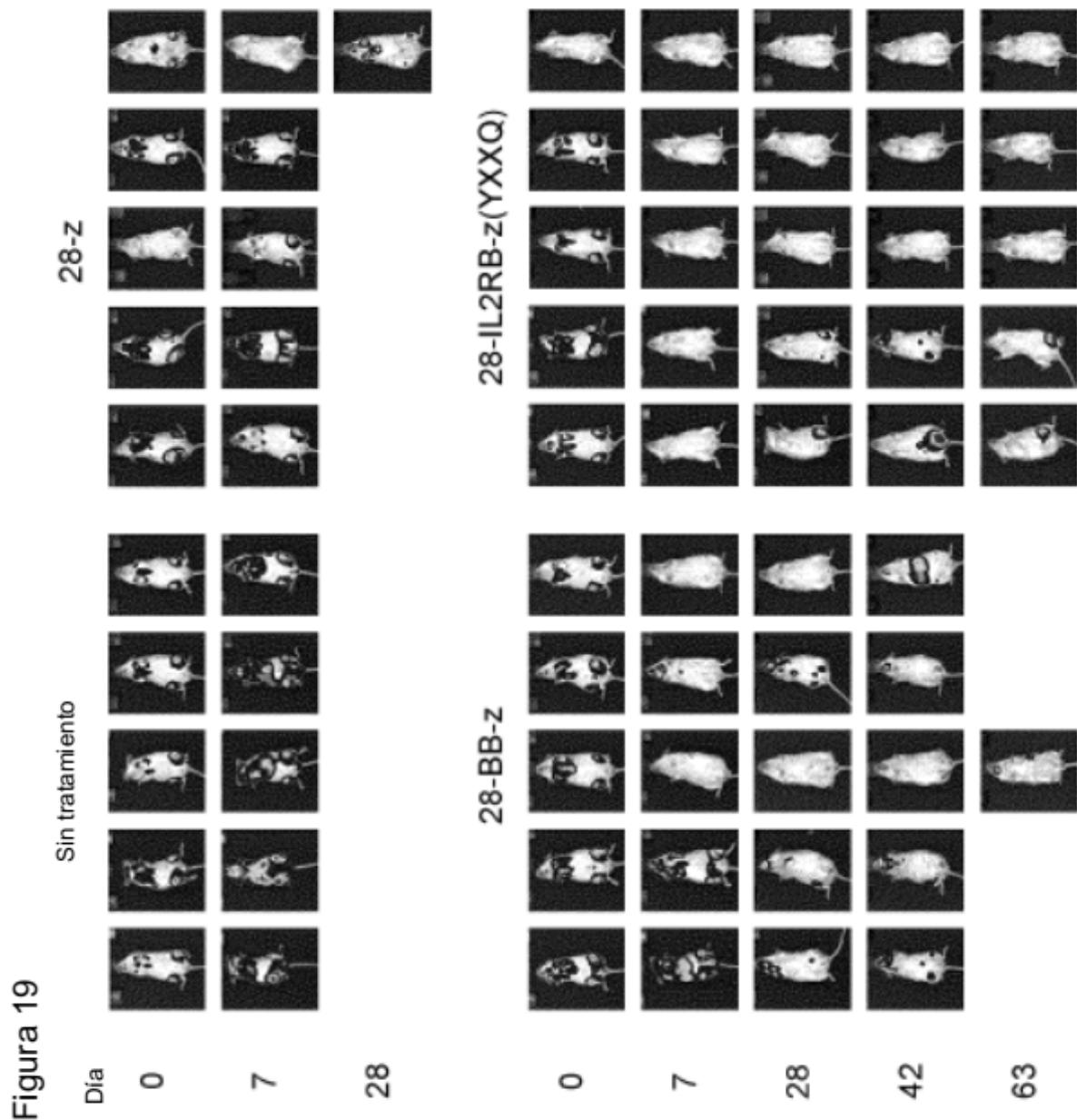


Figura 20

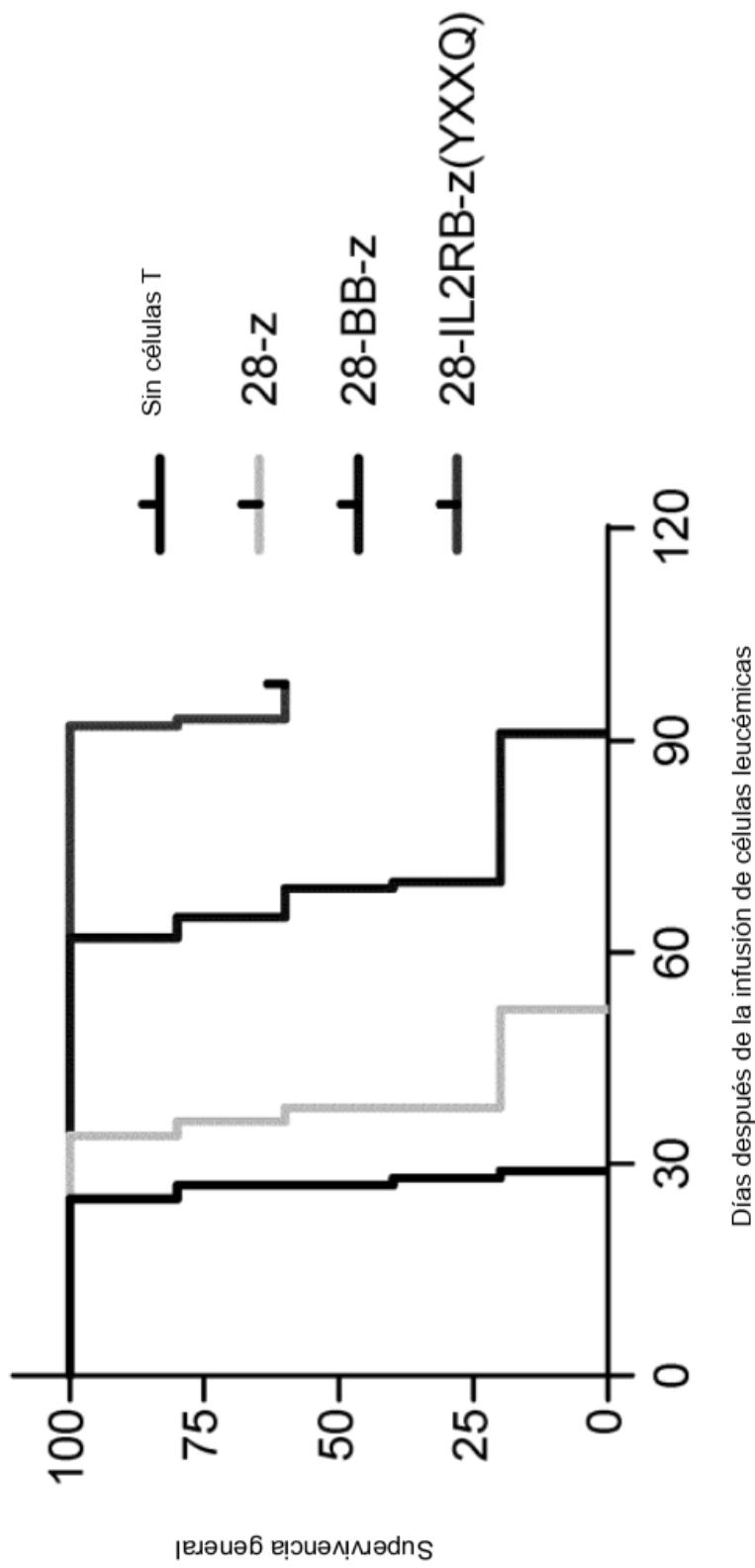


Figura 21

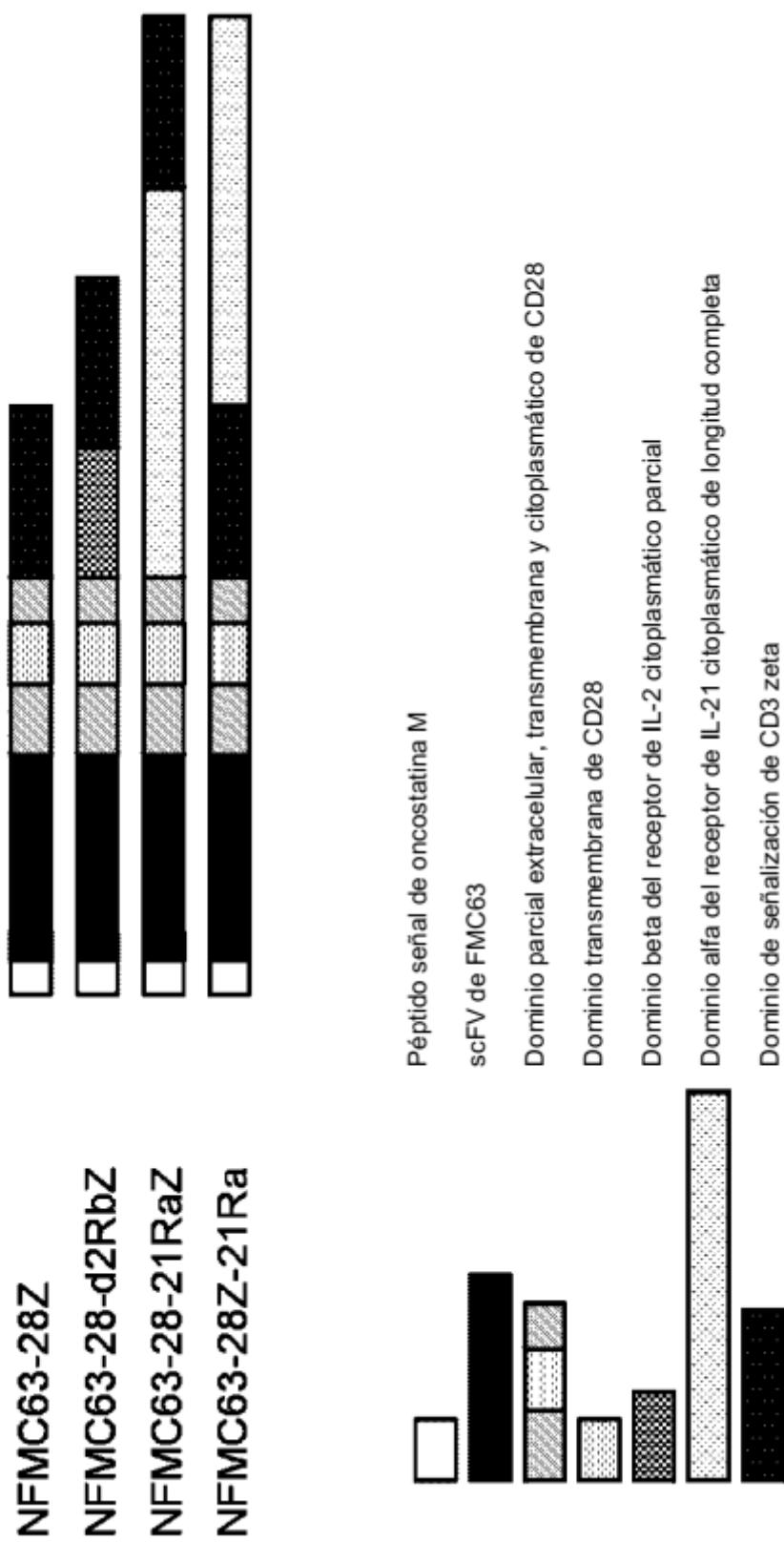


Figura 22

