

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 836 743**

(51) Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C07K 14/725** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2015 PCT/US2015/033473**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15187528**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2015 E 15729304 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2020 EP 3149044**

---

(54) Título: **Receptores de antígeno químicos que seleccionan como diana CD-19**

(30) Prioridad:

**02.06.2014 US 201462006313 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.06.2021**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**KOCHENDERFER, JAMES N.**

(74) Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 836 743 T3

---

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

**DESCRIPCIÓN**

Receptores de antígeno químéricos que seleccionan como diana CD-19

**5 Antecedentes de la invención**

Las neoplasias malignas de células B, tales como el linfoma y la leucemia, se producen cuando se interrumpe la regulación de la diferenciación y activación de las células B. Las neoplasias malignas de células B maduras incluyen linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Hodgkin, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal y leucemia linfocítica crónica (Shaffer *et al.*, *Nature Reviews Immunology*, 2: 920-933 (2002)). Las terapias convencionales tales como la quimioterapia, los anticuerpos monoclonales terapéuticos (por ejemplo, rituximab (RITUXAN™)) y el trasplante alogénico de células madre (aloHSCT) no curan las neoplasias malignas de células B (véanse, por ejemplo, Dreger *et al.*, *Leukemia*, 21(1): 12-17 (2007); Gribben, J.G., *Blood*, 109(11): 4617-4626 (2007); y Armitage, J.O., *Blood*, 110(1): 29-36 (2007)). En particular, los anticuerpos monoclonales no son curativos como agentes únicos y el aloHSCT se asocia con altos niveles de morbilidad (véanse, por ejemplo, Dreger *et al.*, citado anteriormente, Armitage *et al.*, citado anteriormente, y McLaughlin *et al.*, *Journal of Clinical Oncology*, 16(8): 2825-2833 (1998)).

Las células T pueden modificarse genéticamente para expresar receptores de antígeno químéricos (CAR), que son proteínas de fusión que se componen de un resto de reconocimiento de antígeno y dominios de activación de células T (véanse, por ejemplo, Kershaw *et al.*, citado anteriormente, Eshhar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(2): 720-724 (1993), y Sadelain *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 21(2): 215-223 (2009)). Para neoplasias malignas del linaje de células B, se han desarrollado enfoques adoptivos de células T que utilizan CAR que seleccionan como diana CD19 (véanse, por ejemplo, Jensen *et al.*, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16: 1245-1256 (2010); Kochenderfer *et al.*, *Blood*, 116(20): 4099-4102 (2010); Porter *et al.*, *The New England Journal of Medicine*, 365(8): 725-733 (2011); Savoldo *et al.*, *Journal of Clinical Investigation*, 121(5): 1822-1826 (2011), Cooper *et al.*, *Blood*, 101(4): 1637-1644 (2003); Brentjens *et al.*, *Nature Medicine*, 9(3): 279-286 (2003); Kalos *et al.*, *Science Translational Medicine*, 3(95): 95ra73 (2011); Cheadle *et al.*, *Journal of Immunology*, 184(4): 1885-1896 (2010); Brentjens *et al.*, *Cancer Research*, 13(18 Pt 1): 5426-5435 (2007); Kochenderfer *et al.*, *Blood*, 116(19): 3875-3886 (2010); Brentjens *et al.*, *Blood*, 118(18): 4817-4828 (2011); y Kochenderfer *et al.*, *Blood*, 8 de diciembre de 2011 (publicación electrónica antes de la edición impresa (2012)). El antígeno CD19 de células B se ha elegido como diana de los CAR debido a que su expresión se limita a células B normales y malignas (véase, por ejemplo, Nadler *et al.*, *Journal of Immunology*, 131(1): 244-250 (1983)).

Una desventaja asociada con las terapias con CAR anti-CD 19 presentadas hasta la fecha es que pueden inducir toxicidad significativa asociada con niveles elevados de citocinas en suero. La generación de respuestas inmunitarias de anticuerpos humanos anti-IgG de ratón también es un riesgo potencial asociado con los actuales CAR anti-CD19, que contienen secuencias murinas (véanse, por ejemplo, Jensen *et al.*, citado anteriormente; Lamers *et al.*, *Blood*, 117(1): 72-82 (2011); y Maus *et al.*, *Cancer Immunol Res*, 2: 112-120 (2014)).

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de composiciones que puedan usarse en métodos para tratar neoplasias malignas de células B que tengan toxicidad e inmunogenicidad reducidas en seres humanos. Esta invención proporciona tales composiciones, que se incluyen para su uso en tales métodos.

**45 Breve sumario de la invención**

La invención proporciona un receptor de antígeno químérico (CAR) dirigido contra CD19, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

**Breve descripción de las varias vistas del/de los dibujo(s)**

La figura 1 es un gráfico que representa resultados experimentales que ilustran la supervivencia *in vitro* de células T que expresan los CAR indicados tal como se describe en el ejemplo 2. Los porcentajes de células T que expresan los CAR indicados en el día 7 de cultivo fueron los siguientes: FMC63-28Z, 71%; FMC63-CD828Z, 88%; y FMC63-CD8BBZ, 87%.

Las figuras 2A-2D son imágenes de representaciones gráficas de FACS que ilustran la expresión de los CAR completamente humanos indicados que comprenden dominios de señalización intracelular de CD27 en la superficie de células T. Las representaciones gráficas se seleccionan en linfocitos CD3+ vivos.

Las figuras 3A y 3B son imágenes de representaciones gráficas de FACS que ilustran la expresión del CAR 47G4-CD828Z (figura 3A) en la superficie de células T en comparación con el control sin transducir (figura 3B). Las representaciones gráficas se seleccionan en linfocitos CD3+ vivos.

Las figuras 4A y 4B son gráficos que representan los resultados experimentales que ilustran la producción de TNF por células T que expresan los CAR FMC63-28Z, FMC63-CD828Z o FMC63-CD8BBZ en líneas de células T CD19+ CD19-K562 (figura 3A) y NALM6 (figura 3B). Se realizó un ELISA de TNF convencional para medir la cantidad de TNF (pg/ml) en los sobrenadantes de cultivo. Se normalizó el nivel de TNF a la fracción de células T en cada cultivo que expresaba cada CAR. Los resultados muestran la media y el error estándar de la media de niveles de TNF normalizados a partir de dos donantes diferentes.

5 La figura 5 es un gráfico que representa los resultados experimentales que ilustran la producción de IFN $\gamma$  por células T que expresan el CAR 47G4-CD828Z en líneas de células T CD19+ CD19-K562 y NALM6. A549, TC71 y CCRF-CEM son líneas celulares negativas para CD19.

10 Las figuras 6A-6D son representaciones gráficas de FACS que ilustran que las células T transducidas con los CAR indicados se desgranularon de una manera específica para CD19, tal como se mide mediante regulación por incremento de CD107a.

15 15 Las figuras 7A-7C son representaciones gráficas de FACS que ilustran que las células T que expresan los CAR indicados pueden proliferar en respuesta a CD19, tal como se midió mediante fluorescencia de éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). Las células T que expresan los CAR indicados se cultivaron con o bien la línea celular CD19+ CD19-K562 (curva rellena en negro) o bien la línea celular negativa para CD19 NGFR-K562 (curva en blanco) en medios que no contenían IL-2 durante cuatro días. Todas las representaciones gráficas se seleccionan en linfocitos CD3+CAR+ vivos.

20 20 La figura 8 es un gráfico que representa los resultados experimentales que ilustran que las células T transducidas con el plásmido MSGV-FMC63-CD828Z, que codifica para el CAR FMC63-CD828Z, son citotóxicas para células primarias de leucemia linfocítica crónica (LLC).

25 25 La figura 9 es un gráfico que representa los resultados experimentales que ilustran que las células T que expresan o bien el CAR FMC63-28Z o bien el CAR 47G4-CD828Z reducen el tamaño de tumores NALM6 en ratones NSG inmunodeprimidos.

### 30 **Descripción detallada de la invención**

35 La invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR), en el que el CAR comprende un resto de reconocimiento de antígeno y un resto de activación de células T. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) es una proteína o un polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv)) unido a dominios de señalización de células T o activación de células T. Los CAR tienen la capacidad de redirigir la especificidad y reactividad de las células T hacia una diana seleccionada de una manera no restringida por CMH, que explota las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos monoclonales. El reconocimiento de antígeno no restringido por CMH proporciona a las células T que expresan CAR la capacidad de reconocer un antígeno independiente del procesamiento del antígeno, desviando así un mecanismo principal del escape tumoral. Además, cuando se expresan en células T, los CAR no se dimerizan ventajosamente con las cadenas alfa y beta del receptor de células T (TCR) endógenas.

40 45 Por "aislado" se entiende la eliminación de una sustancia (por ejemplo, una proteína o un ácido nucleico) de su entorno natural. Por "purificado" se entiende que una sustancia dada (por ejemplo, una proteína o un ácido nucleico), ya sea una que se haya eliminado de la naturaleza (por ejemplo, ARNm y ADN genómico) o sintetizado (por ejemplo, ADNc) y/o amplificado en condiciones de laboratorio, ha aumentado su pureza, donde "pureza" es un término relativo, no "pureza absoluta". Sin embargo, debe entenderse que los ácidos nucleicos y las proteínas 50 pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y aun así aislarse con fines prácticos. Por ejemplo, las proteínas se mezclan normalmente con un portador o diluyente aceptable cuando se usan para su introducción en las células.

55 60 El CAR de la invención comprende un resto de reconocimiento de antígeno que se dirige contra CD19 (también conocido como antígeno de linfocitos B CD19, B4 y CVID3). CD19 es una molécula de la superficie celular expresada sólo por linfocitos B y células dendríticas foliculares del sistema hematopoyético. Es el más temprano de los antígenos restringidos al linaje B en expresarse y está presente en la mayoría de los precursores de células B y en la mayoría de las células de leucemia linfocítica aguda que no son células T y en las células de leucemia linfocítica crónica de tipo células B (Tedder y Isaacs, J. Immun., 143: 712-717 (1989)). CD19 actúa principalmente como un coreceptor de células B junto con CD21 y CD81 (Bradbury *et al.*, J. Immunol., 149(9): 2841-2850 (1992); Horvath *et al.*, J. Biol. Chem., 273 (46): 30537-30543 (1998); e Imai *et al.*, J. Immunol., 155 (3): 1229-1239 (1995)). Tras la activación, la cola citoplásica de CD19 se fosforila, lo que conduce a la unión de las cinasas de la familia Src y al reclutamiento de PI-3 cinasa. También se ha demostrado que CD19 interacciona con otras proteínas de señalización celular, tales como la proteína tirosina cinasa Lyn, que es la cinasa Src predominante en las células B (Fujimoto *et al.*, Immunity, 13: 47-57 (2000)), CD82 (Imai *et al.*, citado anteriormente), receptor del complemento 2 (Bradbury *et al.*, citado anteriormente; y Horvath *et al.*, citado anteriormente) y VAV2 (Doody *et al.*, EMBO J., 19 (22): 6173-6184 (2000)).

El CAR de la invención comprende un resto de reconocimiento de antígeno que contiene una porción de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD19. El término “anticuerpos monoclonales”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que se producen por un único clon de células B y se unen al mismo epítopo. Por el contrario, los “anticuerpos policlonales” se refieren a una población de anticuerpos que se producen por diferentes células B y se unen a diferentes epítopos del mismo antígeno. Un anticuerpo completo consiste normalmente en cuatro polipéptidos: dos copias idénticas de un polipéptido de cadena pesada (H) y dos copias idénticas de un polipéptido de cadena ligera (L). Cada una de las cadenas pesadas contiene una región variable (VH) N-terminal y tres regiones constantes (CH1, CH2 y CH3) C-terminales, y cada cadena ligera contiene una región variable (VL) N-terminal y una región constante (CL) C-terminal. Las regiones variables de cada par de cadenas ligeras y pesadas forman el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. Las regiones VH y VL tienen la misma estructura general, y cada región comprende cuatro regiones de entramado, cuyas secuencias están relativamente conservadas. Las regiones de entramado están conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las tres CDR, conocidas como CDR1, CDR2 y CDR3, forman la “región hipervariable” de un anticuerpo, que es responsable de la unión a antígeno.

Los términos “fragmento de un anticuerpo”, “fragmento de anticuerpo”, “fragmento funcional de un anticuerpo” y “porción de unión a antígeno” se usan indistintamente en el presente documento para significar uno o más fragmentos o porciones de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (véase, en general, Holliger *et al.*, Nat. Biotech., 23(9): 1126-1129 (2005)). El resto de reconocimiento de antígeno del CAR de la invención comprende un Fv de cadena sencilla (scFv) anti-CD 19 derivado o bien del anticuerpo monoclonal murino FMC63 (Nicholson *et al.*, Molecular Immunology, 34(16-17): 1157-1165 (1997)) o bien del anticuerpo monoclonal completamente humano 47G4 (publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0104509).

El CAR de la invención comprende una secuencia señal. La secuencia señal se coloca en el extremo amino terminal del resto de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, la región variable del anticuerpo anti-CD 19). La secuencia señal es una secuencia señal del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) humano o una secuencia señal de CD8 $\alpha$ . Por ejemplo, un CAR de la invención que comprende un scFv anti-CD 19 murino puede comprender una secuencia señal de GM-CSF, mientras que un CAR de la invención que comprende un scFv anti-CD 19 humano puede comprender una secuencia señal de CD8 $\alpha$ .

El CAR de la invención comprende una secuencia espaciadora extracelular. La secuencia espaciadora extracelular es una secuencia de aminoácidos corta que facilita la flexibilidad del anticuerpo (véase, por ejemplo, Woof *et al.*, Nat. Rev. Immunol., 4(2): 89-99 (2004)), y se coloca entre el resto de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, un scFv anti-CD 19) y el resto de activación de células T. La secuencia espaciadora extracelular puede comprender toda o una porción de una región extracelular de la molécula CD8 $\alpha$  humana.

El CAR de la invención también comprende un dominio transmembrana de una molécula CD8 $\alpha$ . CD8 es una glicoproteína transmembrana que actúa como coreceptor del receptor de células T (TCR) y se expresa principalmente en la superficie de las células T citotóxicas. La forma de CD8 más común existe como un dímero compuesto por una cadena de CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$ . La CD8 $\alpha$  es humana.

El CAR de la invención comprende un resto de activación de células T. El resto de activación de células T comprende múltiples (es decir, dos o más) dominios de señalización de células T intracelulares (es decir, citoplásmicos) (también denominados “dominios coestimuladores”). Los dominios de señalización de células T intercelulares pueden obtenerse a partir de una molécula CD28, una molécula CD3 zeta ( $\zeta$ ), la cadena gamma de un receptor de alta afinidad de IgE humana (Fc $\epsilon$ RI), una molécula CD27 o una molécula 4-1BB. CD28 es un marcador de células T importante en la coestimulación de células T. 4-1BB, también conocido como CD137, transmite una potente señal coestimuladora a las células T, que fomenta la diferenciación y mejora la supervivencia a largo plazo de los linfocitos T. CD27 es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF y es necesario para la generación y el mantenimiento a largo plazo de la inmunidad de las células T. El receptor de alta afinidad de IgE humana (Fc $\epsilon$ RI) es un complejo de receptor tetramérico que consiste en una cadena alfa, una cadena beta y dos puentes disulfuro conectados a cadenas gamma. Fc $\epsilon$ RI se expresa constitutivamente en mastocitos y basófilos y es inducible en eosinófilos.

Los dominios de señalización de células T intracelulares son humanos.

El CAR de la invención puede comprender uno cualquiera de los dominios transmembrana mencionados anteriormente y uno cualquiera o 2 ó 3 de los dominios de señalización de células T intracelulares mencionados anteriormente en cualquier combinación. Por ejemplo, el CAR de la invención puede comprender un dominio transmembrana de CD8 $\alpha$  y dominios de señalización de células T intracelulares de CD28, CD3 $\zeta$  y la cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI, o 4-1BB. En otra realización, el CAR de la invención puede comprender un dominio transmembrana de CD8 $\alpha$  y dominios de señalización de células T intracelulares de CD28, CD3 $\zeta$  y CD27.

La invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico que codifica para el receptor de antígeno

químérico (CAR) de la invención. "Secuencia de ácido nucleico" pretende abarcar un polímero de ADN o ARN, es decir, un polinucleótido, que puede ser monocatenario o bicatenario y que puede contener nucleótidos no naturales o alterados. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN). Estos términos se refieren a la estructura primaria de la molécula y, por tanto, incluyen ADN bicatenario y monocatenario y ARN bicatenario y monocatenario. Los términos incluyen, como equivalentes, análogos de ARN o ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos y polinucleótidos modificados tales como, aunque sin limitarse a, polinucleótidos metilados y/u ocupados en los extremos.

10 El CAR dado a conocer puede comprender cualquier número de aminoácidos, siempre que el CAR retenga su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente a un antígeno, detectar células enfermas en un mamífero o tratar o prevenir una enfermedad en un mamífero, etc. Por ejemplo, el CAR puede comprender 50 o más (por ejemplo, 60 o más, 100 o más, o 500 o más) aminoácidos, pero menos de 1.000 (por ejemplo, 900 o menos, 800 o menos, 700 o menos, o 600 o menos) aminoácidos. Preferiblemente, el CAR es de aproximadamente 5 50 a aproximadamente 700 aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 550, o aproximadamente 650 aminoácidos), de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 125, aproximadamente 175, aproximadamente 225, aproximadamente 250, aproximadamente 275, aproximadamente 325, aproximadamente 350, aproximadamente 375, aproximadamente 425, aproximadamente 450, o aproximadamente 475 aminoácidos), o un intervalo definido por 15 dos cualesquiera de los valores anteriores.

20 En el alcance de la divulgación se incluyen porciones funcionales del CAR de la invención descrito en el presente documento. El término "porción funcional", cuando se usa en referencia a un CAR, se refiere a cualquier parte o fragmento del CAR de la invención, parte o fragmento que retiene la actividad biológica del CAR del que forma parte (el CAR original). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un CAR que retienen la 25 capacidad de reconocer las células diana, o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, en un grado similar, en el mismo grado o en un grado mayor que el CAR original. En referencia a una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR original, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una porción funcional del CAR puede 30 codificar para una proteína que comprende, por ejemplo, aproximadamente el 10%, el 25%, el 30%, el 50%, el 68%, el 80%, el 90%, el 95% o más del CAR original.

35 Una porción funcional de un CAR puede contener aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxilo terminal de la porción, o en ambos extremos terminales, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del CAR original. De manera deseable, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, reconocen las células diana, detectan el cáncer, tratan o previenen el cáncer, etc. De manera más deseable, los aminoácidos adicionales mejoran la actividad biológica del CAR, en comparación con la actividad biológica del CAR original.

40 La divulgación también proporciona variantes funcionales del CAR de la invención. El término "variante funcional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un CAR, a un polipéptido o a una proteína que tiene una identidad o similitud de secuencia sustancial o significativa con el CAR de la invención, variante funcional que retiene la actividad biológica del CAR del cual es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del CAR descritas en el presente documento (el CAR original) que retienen la capacidad de reconocer 45 células diana en un grado similar, en el mismo grado o en un grado mayor que el CAR original. En referencia a una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR original, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una variante funcional del CAR puede ser, por ejemplo, aproximadamente un 10% idéntica, aproximadamente un 25% idéntica, aproximadamente un 30% idéntica, aproximadamente un 50% idéntica, aproximadamente un 65% idéntica, aproximadamente un 80% idéntica, aproximadamente un 90% idéntica, aproximadamente un 95% idéntica 50 o aproximadamente un 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR original.

Una variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del CAR de la invención con al menos una sustitución conservadora de aminoácidos. La expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" o "mutación conservadora" se refiere al reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido con una propiedad común. 55 Una forma funcional de definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre proteínas correspondientes de organismos homólogos (Schulz, G. E. y Schirmer, R. H., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, Nueva York (1979)). Según tales análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos en los que los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferentemente entre sí y, por tanto, se parecen más entre sí en su impacto sobre la estructura general de la proteína (Schulz, G. E. y Schirmer, R. H., citado anteriormente). Los ejemplos de mutaciones conservadoras incluyen sustituciones de aminoácidos de aminoácidos dentro del mismo subgrupo de aminoácidos, por ejemplo, lisina por arginina y viceversa, de manera que pueda mantenerse una carga positiva; ácido glutámico por ácido aspártico y viceversa, de manera que pueda mantenerse una carga negativa; serina por treonina, de manera que pueda mantenerse un -OH libre; y glutamina por asparagina, de manera que pueda mantenerse un -NH<sub>2</sub> libre.

65 Alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del CAR

original con al menos una sustitución no conservadora de aminoácidos. Las "mutaciones no conservadoras" implican sustituciones de aminoácidos entre diferentes grupos, por ejemplo, lisina por triptófano o fenilalanina por serina, etc. En este caso, es preferible que la sustitución no conservadora de aminoácidos no interfiera o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. La sustitución no conservadora de aminoácidos puede potenciar la actividad biológica de la variante funcional, de manera que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con el CAR original.

5 El CAR dado a conocer (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo) puede comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos que se producen de manera natural. En la técnica se conocen tales aminoácidos sintéticos, e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexanocarboxílico, norleucina, ácido  $\alpha$ -amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3-hidroxiprolina y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina,  $\beta$ -fenilserina,  $\beta$ -hidroxifenilalanina, fenilglicina,  $\alpha$ -naftilanina, ciclohexilanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N,N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido  $\alpha$ -aminociclopentanocarboxílico, ácido  $\alpha$ -aminociclohexanocarboxílico, ácido  $\alpha$ -aminocicloheptanocarboxílico, ácido  $\alpha$ -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido  $\alpha,\gamma$ -diaminobutírico, ácido  $\alpha,\beta$ -diaminopropiónico, homofenilalanina y  $\alpha$ -terc-butilglicina.

10 15 20 El CAR de la invención (así como las porciones funcionales y las variantes funcionales del mismo dadas a conocer) pueden glicosilarse, amidarse, carboxilarse, fosforilarse, esterificarse, N-acilarse, ciclarse a través de, por ejemplo, un puente disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

25 La invención también proporciona un CAR dirigido a cualquier molécula diana de interés (es decir, comprende cualquier resto de reconocimiento de antígeno) que puede comprender (i) un espaciador extracelular de CD8 $\alpha$ , (ii) un dominio transmembrana de una molécula CD8 $\alpha$  humana y (iii) dominios de señalización de células T intracelulares de (a) una o ambas de una molécula CD28 humana y una molécula CD27 humana y (b) una molécula CD3 $\zeta$  humana (tal como se emplea en el CAR de SEQ ID NO: 4). En otra realización, el CAR de la invención puede comprender (i) un espaciador extracelular de CD8 $\alpha$ , (ii) un dominio transmembrana de una molécula CD8 $\alpha$  humana y (iii) dominios de señalización de células T intracelulares de (a) una o ambas de una molécula CD28 humana y una molécula CD27 humana y (b) la cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI (tal como se emplea en el CAR de SEQ ID NO: 10). En aún otra realización, el CAR de la invención puede comprender (i) un espaciador extracelular de CD8 $\alpha$ , (ii) un dominio transmembrana de una molécula CD8 $\alpha$  humana y (iii) dominios de señalización de células T intracelulares de una molécula CD28 humana y la cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI (tal como se emplea en el CAR de SEQ ID NO: 12).

35 30 35 El CAR de la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

40 45 50 El CAR de la invención puede generarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico, los polipéptidos y las proteínas pueden producirse de manera recombinante usando la metodología de ADN recombinante convencional (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994). Además, una secuencia de ácido nucleico producida de manera sintética que codifica para el CAR puede obtenerse a partir de una fuente, tal como una planta, una bacteria, un insecto o un mamífero, por ejemplo, una rata, un ser humano, etc. En la técnica se conocen bien los métodos de obtención. Alternativamente, las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden sintetizarse comercialmente. A este respecto, la secuencia de ácido nucleico puede ser sintética, recombinante, aislada y/o purificada.

55 La invención también proporciona un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR de la invención. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, un cósmido, un vector viral (por ejemplo, retroviral o adenoviral) o un fago. En la técnica se conocen vectores adecuados y métodos de preparación de vectores (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente).

60 55 60 Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR de la invención, el vector comprende preferiblemente secuencias de control de la expresión, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores de la transcripción, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) y similares, que proporcionan la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped. En la técnica se conocen secuencias de control de la expresión a modo de ejemplo, y se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

65 En la técnica se conoce bien un gran número de promotores, incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles, a partir de una variedad de fuentes diferentes. Las fuentes representativas de promotores incluyen, por ejemplo, virus, mamífero, insecto, planta, levadura y bacterias, y los promotores adecuados a partir de estas fuentes

están fácilmente disponibles, o pueden fabricarse de manera sintética, basándose en secuencias disponibles al público, por ejemplo, a partir de depósitos tales como la ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales. Los promotores pueden ser unidireccionales (es decir, inician la transcripción en una dirección) o bidireccionales (es decir, inician la transcripción en una dirección 3' ó 5'). Los ejemplos no limitativos de promotores incluyen, por ejemplo, el sistema de expresión bacteriano T7, el sistema de expresión bacteriano pBAD (*araA*), el promotor del citomegalovirus (CMV), el promotor de VS40 y el promotor de VSR. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, el sistema Tet (patentes estadounidenses 5.464.758 y 5.814.618), el sistema inducible por ecdisona (No *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 3346-3351 (1996)), el sistema T-REX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), el sistema LACSWITCH™ (Stratagene, San Diego, CA) y el sistema de recombinasa inducible por tamoxifeno de Cre-ERT (Indra *et al.*, Nuc. Acid. Res., 27: 4324-4327 (1999); Nuc. Acid. Res., 28: e99 (2000); patente estadounidense 7.112.715; y Kramer y Fussenegger, Methods Mol. Biol., 308: 123-144 (2005)).

El término "potenciador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN que aumenta la transcripción de, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico a la que está unida operativamente. Los potenciadores pueden ubicarse a muchas kilobases de la región codificante de la secuencia de ácido nucleico y pueden mediar en la unión de factores reguladores, patrones de metilación del ADN o cambios en la estructura del ADN. En la técnica se conoce bien un gran número de potenciadores a partir de una variedad de fuentes diferentes y están disponibles como o dentro de polinucleótidos clonados (de, por ejemplo, depósitos tales como la ATCC, así como de otras fuentes comerciales o individuales). Varios polinucleótidos que comprenden promotores (tales como el promotor de CMV usado comúnmente) también comprenden secuencias potenciadoras. Los potenciadores pueden ubicarse en el sentido de 5', dentro o en el sentido de 3' de las secuencias codificantes. El término "potenciadores de Ig" se refiere a elementos potenciadores derivados de regiones potenciadoras mapeadas dentro del locus de inmunoglobulina (Ig) (tales potenciadores incluyen, por ejemplo, los potenciadores 5' de cadena pesada (mu), potenciadores 5' de cadena ligera (kappa), potenciadores intrónicos kappa y mu, y potenciadores 3' (véanse, en general, Paul W.E. (ed), Fundamental Immunology, 3<sup>a</sup> edición, Raven Press, Nueva York (1993), páginas 353-363; y la patente estadounidense 5.885.827).

El vector también puede comprender un "gen marcador seleccionable". El término "gen marcador seleccionable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que permite que las células que expresan la secuencia de ácido nucleico se seleccionen específicamente a favor o en contra, en presencia de un agente selectivo correspondiente. En la técnica se conocen genes marcadores seleccionables adecuados, y se describen, por ejemplo, en las publicaciones de solicitudes de patentes internacionales WO 1992/08796 y WO 1994/28143; Wigler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527 (1981); Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072 (1981); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol., 150: 1 (1981); Santerre *et al.*, Gene, 30: 147 (1984); Kent *et al.*, Science, 237: 901-903 (1987); Wigler *et al.*, Cell, 11: 223 (1977); Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026 (1962); Lowy *et al.*, Cell, 22: 817 (1980); y las patentes estadounidenses 5.122.464 y 5.770.359.

En algunas realizaciones, el vector es un "vector de expresión episómico" o "episoma", que puede replicarse en una célula huésped y persiste como un segmento extracromosómico de ADN dentro de la célula huésped en presencia de una presión selectiva apropiada (véase, por ejemplo, Conese *et al.*, Gene Therapy, 11: 1735-1742 (2004)). Los vectores de expresión episómicos disponibles comercialmente representativos incluyen, pero no se limitan a, plásmidos episómicos que utilizan el antígeno nuclear 1 de Epstein Barr (EBNA1) y el origen de replicación del virus de Epstein Barr (VEB) (oriP). Los vectores pREP4, pCEP4, pREP7 y pcDNA3.1 de Invitrogen (Carlsbad, CA) y pBK-CMV de Stratagene (La Jolla, CA) representan ejemplos no limitativos de un vector episómico que usa antígeno de células T y el origen de replicación de VS40 en lugar de EBNA1 y oriP.

Otros vectores adecuados incluyen vectores de expresión integrantes, que pueden integrarse de manera aleatoria en el ADN de la célula huésped o pueden incluir un sitio de recombinación para permitir la recombinación específica entre el vector de expresión y el cromosoma de la célula huésped. Tales vectores de expresión integrantes pueden utilizar las secuencias de control de la expresión endógenas de los cromosomas de la célula huésped para efectuar la expresión de la proteína deseada. Los ejemplos de vectores que se integran de una manera específica del sitio incluyen, por ejemplo, componentes del sistema flp-in de Invitrogen (Carlsbad, CA) (por ejemplo, pcDNA™5/FRT) o el sistema cre-lox, tal como pueden encontrarse en los vectores pExchange-6 Core de Stratagene (La Jolla, CA). Los ejemplos de vectores que se integran de manera aleatoria en los cromosomas de la célula huésped incluyen, por ejemplo, pcDNA3.1 (cuando se introduce en ausencia de antígeno de células T) de Invitrogen (Carlsbad, CA) y pCI o pFN10A (ACT) FLEXI™ de Promega (Madison, WI).

También pueden usarse vectores virales. Los vectores de expresión viral representativos incluyen, pero no se limitan a, los vectores basados en adenovirus (por ejemplo, el sistema Per.C6 basado en adenovirus disponible de Crucell, Inc. (Leiden, Países Bajos)), vectores basados en lentivirus (por ejemplo, el pLP1 basado en lentivirus de Life Technologies (Carlsbad, CA)) y vectores retrovirales (por ejemplo, el pFB-ERV más pCFB-EGSH de Stratagene (La Jolla, CA)). En una realización preferida, el vector viral es un vector de lentivirus.

El vector que comprende un ácido nucleico que codifica para el CAR de la invención puede introducirse en una célula huésped que pueda expresar el CAR, incluyendo cualquier célula procariota o eucariota adecuada. Las

células huésped preferidas son aquellas que pueden hacerse crecer de forma fácil y fiable, tienen tasas de crecimiento razonablemente rápidas, tienen sistemas de expresión bien caracterizados y pueden transformarse o transfectarse de forma fácil y eficaz.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una planta, un animal, hongos o algas, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacterias o protozoos. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente a partir de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. En la técnica se conocen células huésped adecuadas, e incluyen, por ejemplo, células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. Con el fin de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula huésped puede ser una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5 $\alpha$ . Con el fin de producir un CAR recombinante, la célula huésped puede ser una célula de mamífero. Preferiblemente, la célula huésped es una célula humana. La célula huésped puede ser de cualquier tipo de célula, puede originarse a partir de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier fase de desarrollo. La célula huésped también puede ser un linfocito de sangre periférica (PBL), una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un linfocito citolítico natural (NK) o una célula T. Preferiblemente, la célula huésped es una célula T. En la técnica se conocen métodos para seleccionar células huésped de mamífero adecuadas y métodos para la transformación, el cultivo, la amplificación, el cribado y la purificación de células.
- 10
- 15
- 20
- La invención proporciona una célula T que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR de la invención descrito en el presente documento. La célula T de la invención puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivadas, o una célula T obtenida a partir de un mamífero. Si se obtiene a partir de un mamífero, la célula T puede obtenerse a partir de numerosas fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, timo u otros tejidos o fluidos. Las células T también pueden enriquecerse o purificarse. La célula T es preferiblemente una célula T humana (por ejemplo, aislada de un ser humano). La célula T puede estar en cualquier fase de desarrollo, incluyendo, pero sin limitarse a, una célula T doble positiva CD4 $^+$ /CD8 $^+$ , una célula T auxiliar CD4 $^+$ , por ejemplo, células Th<sub>1</sub> y Th<sub>2</sub>, una célula T CD8 $^+$  (por ejemplo, una célula T citotóxica), una célula infiltrante de tumor, una célula T de memoria, una célula T indiferenciada, y similares. En una realización, la célula T es una célula T CD8 $^+$  o una célula T CD4 $^+$ . Las líneas de células T están disponibles, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ), e incluyen, por ejemplo, células Jurkat (ATCC TIB-152), células Sup-T1 (ATCC CRL-1942), células RPMI 8402 (DSMZ ACC-290), células Karpas 45 (DSMZ ACC-545) y derivados de las mismas.
- 25
- 30
- 35
- Una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR de la invención puede introducirse en una célula mediante "transfección", "transformación" o "transducción". Los términos "transfección", "transformación" o "transducción", tal como se usan en el presente documento, se refieren a la introducción de uno o más polinucleótidos exógenos en una célula huésped mediante el uso de métodos físicos o químicos. En la técnica se conocen muchas técnicas de transfección, e incluyen, por ejemplo, la coprecipitación de ADN con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, Murray E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)); DEAE-dextrano; electroporación; transfección mediada por liposomas catiónicos; bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio (Brash *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)). Pueden introducirse fagos o vectores virales en las células huésped después del crecimiento de partículas infecciosas en células de empaquetamiento adecuadas, muchas de las cuales están disponibles comercialmente.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- Sin estar ligado a una teoría o un mecanismo particular, se cree que provocando una respuesta específica de antígeno contra CD19, los CAR de la invención proporcionan uno o más de lo siguiente: seleccionar como diana y destruir células cancerosas que expresan CD19, reducir o eliminar células cancerosas, facilitar la infiltración de células inmunitarias al/a los sitio(s) tumoral(es) y mejorar/aumentar las respuestas anticancerígenas. Por tanto, la invención proporciona un método de destrucción de células B malignas *in vitro*, que comprende poner en contacto una o más de las células T mencionadas anteriormente con una población de células B malignas que expresan CD19, mediante lo cual el CAR se une a CD19 en las células B malignas y se destruyen las células B malignas. Tal como se comentó anteriormente, el tratamiento de neoplasias malignas de células B implica normalmente quimioterapia, anticuerpos monoclonales terapéuticos y trasplante alogénico de células madre; sin embargo, es común una alta tasa de recaída en pacientes que se han sometido a tal tratamiento. Tal como se comentó anteriormente, CD19 se expresa altamente por células B malignas (véase, por ejemplo, Nadler *et al.*, citado anteriormente). Las neoplasias malignas de células B maduras incluyen, pero no se limitan a, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Hodgkin, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal y leucemia linfocítica crónica (Shaffer *et al.*, citado anteriormente).
- 65
- Una o más células T que comprenden un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un CAR anti-CD 19 de la invención descrito en el presente documento pueden ponerse en contacto con una población de células B malignas que expresan CD19 *ex vivo*, *in vivo* o *in vitro*. "Ex vivo" se refiere a métodos

realizados dentro o sobre células o tejidos en un ambiente artificial fuera de un organismo con mínima alteración de las condiciones naturales. Por el contrario, el término “*in vivo*” se refiere a un método que se realiza dentro de organismos vivos en su estado normal e intacto, mientras que un método “*in vitro*” se realiza usando componentes de un organismo que se han aislado de su contexto biológico habitual. El método dado a conocer implica preferiblemente componentes *ex vivo* e *in vivo*. A este respecto, por ejemplo, las células T descritas anteriormente pueden cultivarse *ex vivo* en condiciones para expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR anti-CD 19 de la invención, y luego se transfieren directamente a un mamífero (preferiblemente un ser humano) afectado por una neoplasia maligna de células B. Un método de transferencia celular de este tipo se denomina en la técnica “transferencia celular adoptiva (ACT)”, en el que las células derivadas del sistema inmunitario se transfieren de forma pasiva a un nuevo huésped receptor para transferir la funcionalidad de las células derivadas del sistema inmunitario del donante al nuevo huésped. En la técnica se conocen métodos de transferencia celular adoptiva para tratar diversos tipos de cánceres, incluyendo los cánceres hematológicos tales como las neoplasias malignas de células B, y se dan a conocer, por ejemplo, en Gattinoni *et al.*, Nat. Rev. Immunol., 6(5): 383-393 (2006); June, CH, J. Clin. Invest., 117(6): 1466-76 (2007); Rapoport *et al.*, Blood, 117(3): 788-797 (2011); y Barber *et al.*, Gene Therapy, 18: 509-516 (2011)).

Cuando se administran células T a un mamífero, las células pueden ser alogénicas o autólogas del mamífero. En los métodos de administración “autólogos”, las células (por ejemplo, linfocitos o células madre hematopoyéticas) se extraen de un mamífero, se almacenan (y opcionalmente se modifican) y se devuelven al mismo mamífero. En los métodos de administración “alogénicos”, un mamífero recibe células (por ejemplo, linfocitos o células madre hematopoyéticas) de un donante genéticamente similar, pero no idéntico. Preferiblemente, las células son autólogas del mamífero.

De manera deseable, las células T se administran a un ser humano en forma de una composición, tal como una composición farmacéutica. Alternativamente, una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR de la invención, o un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR, puede formularse en una composición, tal como una composición farmacéutica, y administrarse a un ser humano. La composición farmacéutica dada a conocer puede comprender una población de células T que expresa el CAR de la invención. Además de una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR de la invención, o las células huésped que expresan el CAR de la invención, la composición farmacéutica puede comprender otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterápicos, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorubicina, doxorrubícina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende una célula T aislada que expresa el CAR de la invención, más preferiblemente una población de células T que expresa el CAR de la invención.

Las células T de la invención pueden proporcionarse en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen las derivadas de ácidos minerales, tales como ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico y sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como ácidos tartárico, acético, cítrico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico y arilsulfónico, por ejemplo, ácido p-toluenosulfónico.

La elección del portador se determinará en parte por el CAR de la invención particular, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR, el vector o las células huésped que expresan el CAR, así como por el método particular usado para administrar el CAR de la invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR, el vector o las células huésped que expresan el CAR. Por consiguiente, existe una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la divulgación. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. Opcionalmente, puede usarse una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o las mezclas de los mismos están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 2% en peso de la composición total.

Además, pueden usarse agentes tamponantes en la composición. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y diversos otros ácidos y sales. Opcionalmente, puede usarse una mezcla de dos o más agentes tamponantes. El agente tamponante o las mezclas de los mismos están normalmente presentes en una cantidad de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 4% en peso de la composición total.

Los expertos en la técnica conocen métodos para preparar composiciones administrables (por ejemplo, administrables por vía parenteral), y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science And Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21<sup>a</sup> ed. (2005).

La composición que comprende el CAR de la invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR, el vector o las células huésped que expresan el CAR pueden formularse como un complejo de inclusión, tal como un complejo de inclusión de ciclodextrina, o como un liposoma. Los liposomas pueden servir para dirigir las células huésped (por ejemplo, células T o linfocitos citolíticos naturales) o la secuencia de ácido nucleico de la invención a

un tejido particular. Los liposomas también pueden usarse para aumentar la semivida de la secuencia de ácido nucleico de la invención. Existen muchos métodos disponibles para preparar liposomas, tales como los descritos en, por ejemplo, Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980) y las patentes estadounidenses 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

5 La composición puede emplear sistemas de administración de liberación prolongada, de liberación retardada y de liberación sostenida, de manera que la administración de la composición dada a conocer se produzca antes y con tiempo suficiente para provocar la sensibilización del sitio que va a tratarse. Están disponibles muchos tipos de sistemas de administración de liberación y se conocen por los expertos en la técnica. Tales sistemas pueden evitar 10 administraciones repetidas de la composición, aumentando así la conveniencia para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para determinadas realizaciones de la composición de la divulgación.

De manera deseable, la composición comprende las células huésped que expresan una secuencia de ácido nucleico 15 que codifica para el CAR de la invención o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de este tipo, en una cantidad que es eficaz para tratar o prevenir una neoplasia maligna de células B. Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Preferiblemente, el efecto es terapéutico, es decir, el efecto cura parcial o completamente una enfermedad y/o un síntoma adverso atribuible a la enfermedad. Con este fin, el método dado a 20 conocer comprende administrar una "cantidad terapéuticamente eficaz" de la composición que comprende las células huésped que expresan el CAR de la invención o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según factores tales como el estadio de la enfermedad, la edad, el 25 sexo y el peso del individuo y la capacidad del CAR de provocar una respuesta deseada en el individuo. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz del CAR de la invención es una cantidad que se une a CD19 en células de mieloma múltiple y las destruye.

Alternativamente, el efecto farmacológico y/o fisiológico puede ser profiláctico, es decir, el efecto previene total o 30 parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma. A este respecto, el método dado a conocer comprende administrar una "cantidad profilácticamente eficaz" de la composición que comprende las células huésped que expresan el CAR de la invención o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR a un mamífero con predisposición a una neoplasia maligna de células B. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado profiláctico deseado (por ejemplo, prevención de la aparición de la enfermedad).

35 Una cantidad típica de células huésped administrada a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) puede estar, por ejemplo, en el intervalo de un millón a 100.000 millones de células; sin embargo, las cantidades por debajo o por encima de este intervalo a modo de ejemplo están dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, la dosis diaria de células huésped de la invención puede ser de aproximadamente 1 millón a aproximadamente 50.000 millones de 40 células (por ejemplo, aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente 1000 millones de células, aproximadamente 5.000 millones de células, aproximadamente 20.000 millones de células, aproximadamente 30.000 millones de células, aproximadamente 40.000 millones de células, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), preferiblemente de aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100.000 millones de células (por 45 ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10.000 millones de células, aproximadamente 25.000 millones de células, aproximadamente 50.000 millones de células, aproximadamente 75.000 millones de células, aproximadamente 90.000 millones de células, o un intervalo 50 definido por dos cualesquiera de los valores anteriores), más preferiblemente de aproximadamente 100 millones de células a aproximadamente 50.000 millones de células (por ejemplo, aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3.000 millones de células, aproximadamente 30.000 millones de células, aproximadamente 45.000 millones de células, o un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores anteriores).

55 La eficacia terapéutica o profiláctica puede monitorizarse mediante la evaluación periódica de los pacientes tratados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo del estado, el tratamiento se repite hasta 60 que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otras pautas posológicas pueden ser útiles y están dentro del alcance de la divulgación. La dosificación deseada puede administrarse mediante la administración de un bolo individual de la composición, mediante múltiples administraciones en bolo de la composición o mediante la administración por infusión continua de la composición.

65 La composición que comprende las células huésped que expresan el CAR de la invención o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR puede administrarse a un mamífero usando

técnicas de administración convencionales, incluyendo administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorios. Preferiblemente, la composición es adecuada para administración parenteral. El término "parenteral", tal como se usa en el presente documento, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. Más preferiblemente, la composición se administra a un mamífero usando administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

5 La composición que comprende las células huésped que expresan el CAR de la invención o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR puede administrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales, que pueden administrarse conjuntamente al mamífero. Por "administración conjunta" se entiende la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales y la composición que comprende las células huésped de la invención o el vector de la invención lo suficientemente próximas en el tiempo para que el CAR de la invención pueda mejorar el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. A este

10 respecto, la composición que comprende las células huésped de la invención o el vector de la invención puede administrarse en primer lugar, y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse en segundo lugar, o viceversa. Alternativamente, la composición que comprende las células huésped de la invención o el vector de la invención y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse simultáneamente. Un ejemplo

15 de un agente terapéutico que puede administrarse conjuntamente con la composición que comprende las células huésped de la invención o el vector de la invención es IL-2.

20 Una vez que se administra la composición que comprende células huésped que expresan el CAR de la invención o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el CAR a un mamífero (por ejemplo, un ser humano), la actividad biológica del CAR puede medirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Según el método dado a conocer, el CAR se une a CD19 en las células B malignas y se destruyen las

25 células B malignas. La unión del CAR a CD19 en las células B malignas de la superficie puede someterse a ensayo usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISA y citometría de flujo. La capacidad del CAR de destruir células B malignas puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, tal como los ensayos de citotoxicidad descritos en, por ejemplo, Kochenderfer *et al.*, *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009), y Herman *et al.* *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). La actividad biológica del

30 CAR también puede medirse sometiendo a ensayo la expresión de determinadas citocinas, tales como CD107a, IFN $\gamma$ , IL-2 y TNF.

35 Un experto en la técnica apreciará fácilmente que el CAR, tal como se describe en el presente documento, puede modificarse de varias formas, de manera que la eficacia terapéutica o profiláctica del CAR se aumenta a través de la modificación. Por ejemplo, el CAR puede conjugarse directa o indirectamente a través de un ligador con un resto de dirección. En la técnica se conoce la práctica de conjugación de compuestos, por ejemplo, el CAR, con restos de dirección. Véanse, por ejemplo, Wadwa *et al.*, *J. Drug Targeting* 3: 111 (1995), y la patente estadounidense 5.087.616.

40 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención

#### Ejemplo 1

45 Este ejemplo demuestra métodos para generar los receptores de antígeno químicos (CAR) anti-CD 19 de la invención.

Se diseñaron y sintetizaron una serie de CAR anti-CD 19. Todos los CAR contenían un dominio de reconocimiento de antígeno que se componía de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de o bien el anticuerpo monoclonal murino FMC63 (Nicholson *et al.*, *Molecular Immunology*, 34(16-17): 1157-1165 (1997)) o bien el anticuerpo monoclonal completamente humano 47G4 (publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0104509). Los CAR comprendían una secuencia señal del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) humano, o una secuencia señal de la molécula CD8 humana. Los CAR contenían una combinación de dos o más dominios de señalización de células T intracelulares (o "dominios coestimuladores") derivados de la molécula CD3 zeta (CD3 $\zeta$ ) humana, la molécula CD28 humana, la molécula 4-1BB humana, la molécula CD27 humana y/o la cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI.

Más específicamente, se construyó un plásmido denominado FMC63-CD828Z, que codifica para un CAR que comprende un scFv derivado de FMC63, una secuencia de señal del receptor de GM-CSF, componentes extracelulares y transmembrana de CD8 y dominios de señalización de células T intracelulares de las moléculas CD3 $\zeta$  y CD28 humanas usando el plásmido MSGV-FMC63-28Z (descrito en Kochenderfer *et al.*, *Journal of Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009)) como material de partida. Se escindió en primer lugar el plásmido MSGV-FMC63-28Z con las enzimas de restricción NotI y BmgBI (New England Biolabs, Ipswich, MA), que eliminó toda la porción de CD28 de este plásmido. A continuación, se ligó un fragmento de ADN (sintetizado por Invitrogen, Carlsbad, CA) que codifica para parte de la región extracelular y toda la región transmembrana de la molécula CD8 humana, la porción citoplasmática de la molécula CD28 y la parte citoplasmática de la molécula CD3 $\zeta$  en el plásmido

MSGV-FMC63-28Z escindido. Las secuencias de CD8, CD28 y CD3 $\zeta$  humanas se obtuvieron del sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica. Las instrucciones con respecto a las porciones de cada molécula para incluir en los CAR se obtuvo de Kochenderfer *et al.*, Journal of Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009).

- 5 Se generaron CAR anti-CD 19 completamente humanos mediante la utilización de secuencias del anticuerpo monoclonal 47G4 completamente humano (descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0104509). Se generó el anticuerpo 47G4 vacunando ratones de la raza KM, que portan un transgén de cadena ligera kappa humana y un transcromosoma de cadena pesada humana. Las secuencias de las regiones 10 variables de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo 47G4 se obtuvieron de la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0104509. Se diseñó un scFv de 47G4 que comprendía los siguientes elementos desde 5' hasta 3': una secuencia señal de CD8, la región variable de cadena ligera del anticuerpo 47G4, un péptido ligador que comprende la secuencia de aminoácidos GSTSGSGKPGSSEGSTKG (SEQ ID NO: 14) (véase Cooper *et al.*, Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)) y la región variable de cadena pesada del anticuerpo 47G4. Luego se diseñó 15 una secuencia de ADN que codifica para un CAR que comprendía los siguientes componentes desde 5' hasta 3': el scFv de 47G4 descrito anteriormente, parte de la región extracelular y toda la región transmembrana de la molécula CD8 humana y las porciones citoplásmicas de la molécula CD28 humana y la molécula CD3 $\zeta$  humana. Este CAR se denominó 47G4-CD828Z y la secuencia se sintetizó por Invitrogen (Carlsbad, CA).
- 20 Usando métodos convencionales, se modificó el plásmido lentiviral pRRLSIN.cPPT.MSCV.coDMF5.oPRE (descrito en Yang *et al.*, Journal of Immunotherapy, 33(6): 648-658 (2010)) para reemplazar la porción coDMF5 del plásmido por la secuencia del CAR 47G4-CD828Z descrita anteriormente. El plásmido resultante se denominó LSIN-47G4-CD8CD28Z.
- 25 Se construyó un plásmido denominado MSGV-47G4-CD8BBZ modificando el plásmido MSGV-FMC63-CD828Z descrito anteriormente usando métodos convencionales. El plásmido MSGV-47G4-CD8BBZ codifica para un CAR denominado 47G4-CD8BBZ que comprende, desde 5' hasta 3': el scFv de 47G4 descrito anteriormente, parte de la región extracelular y toda la región transmembrana de la molécula CD8 humana, una porción de la molécula 4-1BB humana (CD137) que comprende la secuencia de aminoácidos 30 RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 15) y la porción citoplásmica de la molécula CD3 $\zeta$ .
- 35 Se construyó un plásmido denominado MSGV-FMC63-CD8BBZ que codifica para un CAR denominado CAR FMC63-CD8BBZ reemplazando la secuencia de CD28 del plásmido MSGV-FMC63-CD828Z por la misma secuencia de 4-1BB incluida en MSGV-47G4-CD8BBZ.
- 40 Se ligó el ADN que codifica para un scFv de SP6 (Ochi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80(20):6351-6355 (1983)) en el vector retroviral MSGV-FMC63-CD828Z después de la escisión del ADN que codifica para el scFv de FMC63 para formar el MSGV-SP6-CD828Z, que reconoció el ácido hapteno-2,4,6-trinitrobencenosulfónico y sirvió como control negativo en algunos experimentos.

Todos los CAR anti-CD 19 generados usando los métodos descritos anteriormente se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

CAR anti-CD19	SEQ ID NO de aminoácidos	Secuencia señal	Regiones extracelulares y transmembrana	Dominio de señalización de células T intracelular
47G4-CD828Z	1	CD8 $\alpha$ humana	CD8 $\alpha$ humana	CD28
				CD3 $\zeta$
47G4-CD8BBZ	2	CD8 $\alpha$ humana	CD8 $\alpha$ humana	4-1BB
				CD3 $\zeta$
47G4-CD827Z	3	CD8 $\alpha$ humana	CD8 $\alpha$ humana	CD27
				CD3 $\zeta$
47G4-CD82827Z	4	CD8 $\alpha$ humana	CD8 $\alpha$ humana	CD28
				CD27
				CD3 $\zeta$
47G4-CD827BBZ	5	CD8 $\alpha$ humana	CD8 $\alpha$ humana	4-1BB
				CD27

				CD3 $\zeta$
FMC63-CD828Z	6	Receptor del GM-CSF	CD8 $\alpha$ humana	CD28
				CD3 $\zeta$
				CD27
FMC63-CD827BBZ	7	Receptor del GM-CSF	CD8 $\alpha$ humana	4-1BB
				CD3 $\zeta$
FMC63-CD827Z				CD27
	8	Receptor del GM-CSF	CD8 $\alpha$ humana	CD3 $\zeta$
FMC63-CD82827Z				CD28
				CD27
	9	Receptor del GM-CSF	CD8 $\alpha$ humana	CD3 $\zeta$
47G4-CD82827GAMMA				CD28
				CD27
	10	CD8 $\alpha$ humana	CD8 $\alpha$ humana	Cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI
FMC63-CD82827GAMMA				CD28
				CD27
	11	CD8 $\alpha$ humana	CD8 $\alpha$ humana	Cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI
47G4-CD828GAMMA				CD28
				Cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI
FMC63-CD828GAMMA	12	CD8 $\alpha$ humana	CD8 $\alpha$ humana	CD28
				Cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI
	13	Receptor del GM-CSF	CD8 $\alpha$ humana	CD28
				Cadena gamma de Fc $\epsilon$ RI

Los resultados de este ejemplo demuestran la generación de CAR anti-CD 19 basados en un anticuerpo monoclonal anti-CD 19 completamente humano y un anticuerpo monoclonal anti-CD 19 murino.

## 5 Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra un método de generación de células T que expresan secuencias de ácido nucleico que codifican para los CAR de la invención.

- 10 Se produjeron gammaretrovirus o lentivirus incompetentes para la replicación que codifican para los CAR descritos anteriormente y se usaron para transducir células T. Para producir de manear transitoria gammaretrovirus incompetentes para la replicación, se transfecaron células de empaquetamiento 293GP (Burns *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90(17): 8033-8037 (1993)) con plásmidos que codifican para los CAR descritos en el ejemplo 1 junto con un plásmido que codifica para la proteína de la envuelta RD114 (Porter *et al.*, Human Gene Therapy, 7(8): 913-919 (1996)) usando LIPOFECTAMINE™ 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA). Se incubaron las células transfectadas a 37°C durante 6-8 horas en medio D10 sin antibióticos. Luego se reemplazó el medio usado para la transfección por medio D10 recién preparado y se incubaron las células durante otras 36-48 horas. Durante y después de la transfección, se cultivaron las células 293GP en placas recubiertas de poli-D-lisina (BD Biosciences, San José, CA). Se retiró de las placas el sobrenadante que contenía los retrovirus y se centrifugó para eliminar los residuos celulares. Se almacenó el sobrenadante a -80°C.

Se produjo el sobrenadante que contenía los lentivirus que codifican para cada uno de los CAR descritos en el ejemplo 1 usando el protocolo descrito en Yang *et al.*, Journal of Immunotherapy, 33(6): 648-658 (2010)).

- 25 Se descongelaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se lavaron una vez en medio de células T. Se suspendieron las PBMC a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio de células T que contenía 50 ng/ml del anticuerpo monoclonal anti-CD3 OKT3 (Ortho, Bridgewater, NJ) y 300 UI/ml de IL-2. Se añadieron veinte ml de esta suspensión a matraces de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, Corning, NY). Se cultivaron los matraces en posición vertical a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> (véase, por ejemplo, Kochenderfer *et al.*, Journal of Immunotherapy, 32(7): 689-702

(2009)).

Se llevó a cabo la transducción gammaretroviral de células T disolviendo en primer lugar RETRONECTIN™ (Takara/Clontech Laboratories, Mountain View, CA) a una concentración de 10 g/ml en PBS, y se añadieron dos ml de este RetroNectin™ en disolución de PBS a cada pocillo de placas de 6 pocillos recubiertas sin cultivo de tejido (BD Biosciences). Se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Después de la incubación, se aspiró la disolución de RETRONECTIN™ y se añadieron 2 ml de una disolución de bloqueo que consistía en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) más albúmina sérica bovina (BSA) al 2% a cada pocillo recubierto con RETRONECTIN™. Se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró la disolución de bloqueo y se enjuagaron los pocillos con una disolución de HBSS+HEPES al 2,5%. Se descongeló rápidamente el sobrenadante gammaretroviral y se diluyó 1:1 en medio de células T. Luego se añadieron dos ml del sobrenadante diluido a cada pocillo revestido con RETRONECTIN™.

Después de la adición de los sobrenadantes, se centrifugaron las placas a 2000 x g durante 2 horas a 32°C. Luego se aspiró el sobrenadante de los pocillos y se añadieron a cada pocillo 2x10<sup>6</sup> células T cultivadas con OKT3 e IL-2 durante 2 días. Cuando se añadieron las células T a las placas recubiertas con retrovirus, se suspendieron a una concentración de 0,5x10<sup>6</sup> células por ml en medio de células T más 300 UI/ml de IL-2. Después de añadir las células T a cada pocillo, se centrifugaron las placas durante 10 minutos a 1000 x g y se incubaron durante la noche a 37°C. Después de una incubación de 24 a 30 horas, se retiraron las células T de las placas y se suspendieron en medio de células T recién preparado con 300 UI/ml de IL-2 a una concentración de 0,5x10<sup>6</sup> células por ml y se cultivaron a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>.

Para la transducción lentiviral de células T, se suspendieron PBMC activadas en sobrenadante lentiviral con sulfato de protamina y 300 UI/ml de IL-2. Se centrifugaron las células durante 1 hora a 1200 x g. Luego se cultivaron las células durante 3 horas a 37°C. A continuación, se diluyó 1:1 el sobrenadante con RPMI (Mediatech, Inc., Manassas, VA) + suero bovino fetal al 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA) e IL-2. Se cultivaron las células en el sobrenadante diluido durante la noche y luego volvieron a cultivarse en medio AIM V más suero AB humano al 5% con IL-2.

Se evaluó la expresión de los CAR basados en FMC63 en células T transducidas. Específicamente, se lavaron las células T transducidas y se suspendieron en tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato (PBS) más azida sódica al 0,1% y BSA al 0,4%). Se añadieron anticuerpos policlonales de cabra anti-F(ab)2 de ratón marcados con biotina (anti-Fab, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) para detectar el scFv de FMC63. Se incubaron las células a 4°C durante 25 minutos y se lavaron una vez. Se suspendieron las células en tampón FACS y se bloquearon con IgG de ratón normal (Invitrogen, Carlsbad, CA). Luego se tiñeron las células con estreptavidina marcada con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen, San Diego, CA), anticuerpo anti-CD4, anticuerpo anti-CD8 y anticuerpo anti-CD3. Se realizó la adquisición de citometría de flujo con un citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences) y se realizó el análisis con el software FlowJo (Treestar, Inc. Ashland, OR). Se evaluó la expresión de los CAR basados en 47G4 en células T transducidas usando un método casi idéntico, excepto que se usó proteína L marcada con biotina (GenScript, Piscataway, NJ) en lugar de los anticuerpos policlonales de cabra anti-F(ab)2 de ratón.

Se calculó el porcentaje de células T que expresan CAR (CAR+) como el porcentaje de células T en cultivos transducidos con CAR que se tiñeron con los anticuerpos anti-Fab o la proteína L menos el porcentaje de células T no transducidas cultivadas de manera idéntica del mismo donante que se tiñeron con anticuerpo anti-Fab o proteína L en cada experimento.

El día 7 de cultivo, los porcentajes de células T que expresan CAR que comprenden un scFv derivado del anticuerpo FMC63 murino fueron los siguientes: FMC63-28Z, 71%; FMC63-CD828Z, 88%; y FMC63-CD8BBZ, 87%. Las células T que expresan el CAR FMC63-28Z presentaron una supervivencia *in vitro* más corta en comparación con las células T que expresan el CAR FMC63-CD828Z o el CAR FMC63-CD8BB en cultivos que contienen IL-2, tal como se muestra en la figura 1. También se detectaron altos niveles de expresión de CAR en células T transducidas con gammaretrovirus que codifican para FMC63-CD828Z, FMC63-CD8BBZ y FMC63-CD827Z.

Los CAR que comprenden un scFv derivado del anticuerpo 47G4 se expresaron a niveles elevados en la superficie de las células T humanas. En particular, las figuras 2A-2D muestran la expresión de CAR basados en 47G4 que comprenden el dominio de señalización intracelular de CD27, mientras que las figuras 3A y 3B muestran la expresión del CAR 47G4-CD828Z.

Los resultados de este ejemplo demuestran que las células T pueden modificarse por ingeniería para expresar los CAR anti-CD 19 de la invención.

### Ejemplo 3

Este ejemplo describe una serie de experimentos usados para determinar la especificidad de los CAR de la invención para CD19.

*Muestras de pacientes y líneas celulares*

Se obtuvieron muestras de PBMC no leucémicas de pacientes con melanoma, leucemia linfocítica crónica (LLC) o linfoma que se inscribieron en protocolos aprobados por la junta de revisión institucional en la Rama de Cirugía del

5 Instituto Nacional del Cáncer (NCI). Se usaron células de 5 pacientes diferentes. El donante 1 tenía LLC, el donante 2 era un donante normal, el donante 3 y el donante 5 tenían linfoma y el donante 4 tenía melanoma. Se crioconservaron las PBMC en FBS al 90% más DMSO al 10% (Sigma, St. Louis, MO). En experimentos que usaron células de LLC primarias como células diana, se usaron PBMC sin manipular de pacientes con LLC. Se usaron las siguientes líneas celulares inmortalizadas que expresan CD19: NALM-6 (leucemia linfoide aguda de la DSMZ,

10 Braunschweig, Alemania) y CD19-K562. Se usaron las siguientes líneas celulares negativas para CD19: A549 (carcinoma de pulmón, de la ATCC), CCRF-CEM (leucemia de células T de la ATCC), MDA231 (carcinoma de mama de la ATCC) y TC71 (sarcoma de Ewing, un amable obsequio del Dr. M. Tsokos, Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda, MD). Se mantuvieron todas las líneas celulares en medio R10. Cuando se usaron PBMC de LLC

15 como dianas en los ensayos, se cultivaron las células en medio R10 durante 12-18 horas antes del ensayo.

*Ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) de interferón y TNF*

La aparición de hipotensión y otras toxicidades en pacientes que recibieron infusiones de células T que expresan el CAR FMC63-28Z en ensayos clínicos impulsó una comparación de la producción de TNF por células T que expresan FMC63-28Z con la producción de TNF por células T que expresan los CAR de la invención.

20 Se lavaron las células diana y se suspendieron a  $1 \times 10^6$  células por ml en medio de células T sin IL-2. Se añadieron 100.000 células diana de cada tipo de célula diana a cada uno de los dos pocillos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning, Tewksbury, MA). También se prepararon pocillos que contenían células T solas. Se incubaron 25 las placas a 37°C durante 18-20 horas. Después de la incubación, se realizó un ensayo de ELISA de IFN $\gamma$  o TNF usando métodos convencionales (Pierce, Rockford, IL). En algunos experimentos, se normalizaron los resultados de ELISA de TNF dividiendo los niveles de TNF entre el porcentaje de células T en los cultivos durante la noche que expresan un CAR dado. Se determinó la expresión de CAR tal como se describe en el ejemplo 2.

30 Cuando se normalizaron para la expresión de CAR en la superficie celular, las células T que expresan FMC63-28Z produjeron consistentemente más TNF que el CAR FMC-CD828Z y el CAR FMC63-CD8BBZ, tal como se muestra en las figuras 4A y 4B. La única diferencia entre el CAR FMC63-28Z y el CAR FMC63-CD828Z es el reemplazo de los componentes extracelulares y transmembrana de CD28 humana de FMC63-28Z por componentes extracelulares y transmembrana de la proteína CD8 humana en FMC63-CD828Z. La marcada diferencia en la persistencia de las 35 células T y la producción de citocinas inflamatorias entre FMC63-28Z y FMC63-CD828Z condujo al uso del espaciador extracelular de CD8 y componentes transmembrana en los diseños de CAR posteriores.

40 Las células T transducidas con los CAR anti-CD 19 produjeron grandes cantidades de IFN $\gamma$  cuando se cultivaron durante la noche con la línea celular que expresa CD19 CD19-K562, pero las células T transducidas con CAR solas produjeron niveles de fondo de IFN $\gamma$  cuando se cultivaron con las líneas de la línea celular de control negativo, tal como se indica en las tablas 2 y 3 (todas las unidades son pg/ml de IFN $\gamma$ ). En la figura 5 se muestran los resultados del ELISA de IFN $\gamma$  para el CAR 47G4-CD828Z.

Tabla 2

	Dianas positivas para CD19		Dianas negativas para CD19			Células T solas	% de células T CAR+
	Células efectoras	CD19-K562	LLC	NGFR-K562	CEM	A549	
47G4-CD8BBZ	33926	10498	5885	6342	8188	5300	90
FMC63-CD8BBZ	44327	13919	4211	4405	5407	4003	86
Sin transducir	<12	1060	16	<12	<12		0

Tabla 3

	Dianas positivas para CD19		Dianas negativas para CD19			
	Células efectoras	CD19-K562	LLC	NGFR-K562	MDA231	Células T solas
47G4-CD827Z	7435	1833	39	87	37	
47G4-CD828Z	13819	1300	22	45	16	
47G4-CD828GAMMA	9963	866	19	30	<12	
47G4-CD82827Z	11874	2436	32	68	27	

47G4-CD82827GAMMA	8351	870	23	46	18
47G4-CD8BBZ	13381	2394	87	175	82
Sin transducir	18	16	16	32	<12

La alta secreción de fondo de IFN $\gamma$  fue una observación consistente con los CAR que contienen un resto de 4-1BB. Las células T transducidas con el CAR FMC63-CD827Z produjeron IFN $\gamma$  de una manera específica de CD19. Se obtuvieron niveles mucho más bajos de IFN $\gamma$  cuando las células FMC63-CD827Z se cultivaron con células NGFR-K562 y CCRF-CEM, que son negativas para CD19. Las células T transducidas con FMC63-CD827Z también produjeron TNF de una manera específica de antígeno.

#### *Ensayo de CD107a*

- 10 Para cada cultivo de células T que se sometió a prueba, se prepararon dos o tres tubos por separado. Un tubo contenía células CD19-K562, un tubo contenía células de LLC primarias sin manipular y el otro tubo contenía células NGFR-K562. En algunos experimentos, se omitió el tubo de CD19-K562. Todos los tubos contenían células T transducidas con los CAR anti-CD 19 descritos anteriormente, 1 ml de medio AIM V™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) + suero humano al 5%, una concentración titulada de un anticuerpo anti-CD 107a (eBioscience, Inc., San Diego, CA; clon eBioH4A3) y 1  $\mu$ l de Golgi Stop (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Se incubaron todos los tubos a 37°C durante cuatro horas y luego se tiñeron para determinar la expresión de CD3, CD4 y CD8.

20 Las células T de diferentes sujetos que expresan los CAR FMC63-CD828Z, FMC63-CD827Z, FMC63-CD8BBZ, 47G4-CD827Z, 47G4-CD82827Z, 47G4-CD827BBZ o 47G4-CD8BBZ regularon por incremento CD107a específicamente en respuesta a la estimulación de células diana que expresan CD19, y los resultados del ensayo de CD107a para los CAR 47G4-CD827Z, 47G4-CD82827Z, 47G4-CD827BBZ se muestran en las figuras 6A-6D. Esto indica la aparición de desgranulación específica de CD19 de las células T, que es un requisito previo para la citotoxicidad mediada por perforina (véase, por ejemplo, Rubio *et al.*, Nature Medicine, 9(11): 1377-1382 (2003)).

#### *Ensayos de proliferación*

30 Se evaluó la capacidad de las células T transducidas con los CAR anti-CD 19 de proliferar cuando se estimulan con células diana que expresan CD19. Específicamente, se cultivaron conjuntamente  $0,5 \times 10^6$  células CD19-K562 irradiadas o  $0,5 \times 10^6$  células NGFR-K562 irradiadas con  $0,75 \times 10^6$  células T totales transducidas con un CAR anti-CD 19. Se marcaron las células T con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) (Life Technologies, Carlsbad, CA) tal como se describe en Mannerling *et al.*, J. Immunological Methods, 283(1-2): 173-183 (2003). El medio usado en los cocultivos fue medio AIM V™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) + suero AB humano al 5%. No se añadió IL-2 al medio. Cuatro días después del inicio, se contaron las células vivas en cada cocultivo con azul trípano para determinar la exclusión de células muertas y se realizó una citometría de flujo tal como se describe en el ejemplo 2.

40 Las células T que expresan los CAR FMC63-CD8BBZ, FMC63-CD828Z y 47G4-CD8BBZ presentaron todas una mayor dilución de CFSE cuando se cultivaron con las células CD19-K562 que cuando se cultivaron con células NGFR-K562 de control negativo, tal como se muestra en las figuras 7A-7C. Estos resultados indican que las células T transducidas con los CAR anti-CD 19 proliferaron específicamente cuando se estimularon con células diana que expresan CD19.

45 Los resultados de este ejemplo demuestran que las células T que expresan los CAR de la invención presentan producción, desgranulación y proliferación de citocinas específicas de CD19.

#### Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra que las células T que expresan un CAR anti-CD 19 de la invención pueden destruir las células de leucemia linfocítica crónica (LLC).

50 Se realizaron ensayos de citotoxicidad para determinar si las células T transducidas con el CAR FMC63-CD828Z de la invención podían destruir las PBMC sin manipular que expresan CD19 de pacientes con LLC. Específicamente, se midió la citotoxicidad de las células diana comparando la supervivencia de las células diana que expresan CD19 (es decir, PBMC de LLC) en relación con la supervivencia de las células CCRF-CEM de control negativo usando un ensayo descrito en, por ejemplo, Kochenderfer *et al.*, J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), y Hermans *et al.*, J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004).

60 Se suspendieron células CCRF-CEM en medio R10 a una concentración de  $1,5 \times 10^6$  células/ml, y se añadió el tinte fluorescente 5-(y-6)-(((4-clorometil)benzoil)amino)tetrametilrodamina (CMTMR) (Life Technologies, Carlsbad, CA) a una concentración de 5 M. Se mezclaron las células y luego se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Luego se lavaron las células, se suspendieron en medio de citotoxicidad y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Luego se

- lavaron las células dos veces y se suspendieron en medio de citotoxicidad. Se suspendieron PBMC de CLL en PBS + BSA al 0,1% a  $1 \times 10^6$  células/ml. Se añadió el tinte fluorescente éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) (Life Technologies, Carlsbad, CA) a esta suspensión celular a una concentración de 1 M. Se incubaron las células durante 10 minutos a 37°C. Después de la incubación, se detuvo la reacción de marcado añadiendo un volumen de FBS que era igual al volumen de la suspensión celular, y se incubaron las células durante dos minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron las células y se suspendieron en medio de citotoxicidad.
- 5 Se combinaron aproximadamente 50.000 PBMC de LLC que expresan CD19 y 50.000 células CCRF-CEM en los mismos tubos con diferentes números de células T transducidas con CAR. En todos los experimentos, se comparó la citotoxicidad de las células T efectoras que se transdijeron con el CAR FMC63-CD828Z con la citotoxicidad de las células T efectoras de control negativo del mismo sujeto que se transdijeron con el CAR de control SP6-28Z o no se transdijeron. Se establecieron cocultivos en tubos de ensayo estériles de 5 ml (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) por duplicado en las siguientes razones de células T:células diana: 20:1, 6,7:1, 2,2 y 0,7:1. Se incubaron los cultivos 10 durante cuatro horas a 37°C. Inmediatamente después de la incubación, se añadió 7-aminoactinomicina D (7AAD; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) según lo recomendado por el fabricante y se realizó la adquisición de citometría de flujo con un dispositivo BD FacsCanto II (BD Biosciences). Se realizó el análisis con el software FlowJo (Treestar, Inc. Ashland, OR). Se seleccionó el análisis en células negativas para 7AAD (vivas), y se determinaron los porcentajes de células diana de LLC vivas y células CCRF-CEM de control negativo vivas para cada cultivo de 15 células T más células diana.
- 15 Para cada cultivo, se determinó el porcentaje de supervivencia de PBMC de LLC dividiendo el porcentaje de PBMC de LLC vivas entre el porcentaje de células CCRF-CEM de control negativo vivas. Se calculó el porcentaje de supervivencia corregido de PBMC de LLC dividiendo el porcentaje de supervivencia de PBMC de LLC en cada cultivo de células T más células diana entre la razón del porcentaje de células diana de LLC:porcentaje de células 20 CCRF-CEM de control negativo en tubos que contenían sólo células diana de LLC y células CCRF-CEM de control negativo sin células T efectoras. Esta corrección fue necesaria para tener en cuenta la variación en el número de células iniciales y la muerte espontánea de las células diana. Se calculó la citotoxicidad como el porcentaje de 25 citotoxicidad de PBMC de LLC = 100-porcentaje de supervivencia corregido de PBMC de LLC. Para todas las razones efectoras:diana, se determinó la citotoxicidad por duplicado y se promediaron los resultados.
- 30 En la figura 8 se muestran los resultados del ensayo de citotoxicidad, y demuestran que puede usarse un CAR anti-CD 19 de la invención en un método de destrucción de células B malignas.
- 35 **Ejemplo 5**
- Este ejemplo demuestra que las células T que expresan un CAR anti-CD 19 de la invención pueden reducir el crecimiento de tumores de células B malignas en un modelo animal.
- 40 Se inyectaron por vía subcutánea a ratones NSG inmunodeprimidos 4 millones de células tumorales CD19+ NALM6. Seis días después, después de que se formaran tumores palpables, se trataron los ratones con una única inyección intravenosa de células T humanas que se habían transducido con un vector de CAR MSGV-FMC63-28Z (descrito en Kochenderfer *et al.*, Journal of Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)) o el vector de CAR LSIN-47G4-CD8CD28Z (descrito en el ejemplo 1). Se midieron los tumores cada tres días y se compararon con los tumores en ratones sin 45 tratar.
- Los resultados de este experimento, mostrados en la figura 9, indican que las células T que expresan o bien el CAR FMC63-28Z o bien el CAR 47G4-CD8CD28Z redujeron notablemente el tamaño del tumor en los ratones tratados.
- 50 El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y "al menos uno" y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse como que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso del término "al menos uno" seguido por una lista de uno o más elementos (por ejemplo, "al menos uno de A y B") debe interpretarse como un elemento seleccionado de los elementos enumerados (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los elementos enumerados (A y B), a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero sin limitarse a"), a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento está destinada simplemente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor por separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor por separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") 55 proporcionados en el presente documento está destinados simplemente a iluminar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la
- 60
- 65

memoria descriptiva debe interpretarse en el sentido de que indica algún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

En el presente documento se describen realizaciones preferidas de esta invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención.

### **Lista de secuencias**

10 <110> Los Estados Unidos de América, representados por el secretario del Departamento de Salud y Servicios Sociales

<120> RECEPTORES DE ANTÍGENO QUIMÉRICOS QUE SELECCIONAN COMO DIANA CD-19

15 <130> 720755

20 <150> documento US 62/006.313

25 <151> 02-06-2014

30 <160> 15

20 <170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1

25 <211> 502

25 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

30 <220>

30 <223> Sintética

30 <400> 1

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
50 55 60

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

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

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

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

ES 2 836 743 T3

145

150

155

160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe  
165 170 175

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala  
195 200 205

Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
210 215 220

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp  
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu  
260 265 270

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala  
275 280 285

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg  
290 295 300

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys  
305 310 315 320

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu  
325 330 335

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys  
340 345 350

Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg  
355 360 365

Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp  
370 375 380

Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
385 390 395 400

ES 2 836 743 T3

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
405 410 415

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
420 425 430

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
435 440 445

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
450 455 460

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
465 470 475 480

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
485 490 495

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
500

<210> 2

<211> 508

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 2

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
50 55 60

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

ES 2 836 743 T3

100                    105                    110

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

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

Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
145                    150                    155                    160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe  
165                    170                    175

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
180                    185                    190

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala  
195                    200                    205

Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
210                    215                    220

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
225                    230                    235                    240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp  
245                    250                    255

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu  
260                    265                    270

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala  
275                    280                    285

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg  
290                    295                    300

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys  
305                    310                    315                    320

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu  
325                    330                    335

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Phe Ser  
340                    345                    350

ES 2 836 743 T3

Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro  
355 360 365

Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys  
370 375 380

Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe  
385 390 395 400

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu  
405 410 415

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp  
420 425 430

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys  
435 440 445

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala  
450 455 460

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys  
465 470 475 480

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr  
485 490 495

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
500 505

<210> 3

<211> 509

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 3

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

# ES 2 836 743 T3

50

55

60

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 85                    90                    95

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 100                    105                    110

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

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

Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 145                    150                    155                    160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe  
 165                    170                    175

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 180                    185                    190

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala  
 195                    200                    205

Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
 210                    215                    220

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 225                    230                    235                    240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp  
 245                    250                    255

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu  
 260                    265                    270

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala  
 275                    280                    285

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg  
 290                    295                    300

ES 2 836 743 T3

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys  
305 310 315 320

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu  
325 330 335

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Gln Arg Arg  
340 345 350

Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro  
355 360 365

Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile  
370 375 380

Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Arg Val Lys  
385 390 395 400

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln  
405 410 415

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu  
420 425 430

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg  
435 440 445

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met  
450 455 460

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly  
465 470 475 480

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp  
485 490 495

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
500 505

<210> 4

<211> 550

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10 <400> 4

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

ES 2 836 743 T3

1

5

10

15

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

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
50 55 60

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

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

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

Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
145 150 155 160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe  
165 170 175

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala  
195 200 205

Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
210 215 220

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp  
245 250 255

ES 2 836 743 T3

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu  
260 265 270

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala  
275 280 285

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg  
290 295 300

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys  
305 310 315 320

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu  
325 330 335

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys  
340 345 350

Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg  
355 360 365

Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp  
370 375 380

Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly  
385 390 395 400

Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg  
405 410 415

Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro  
420 425 430

Glu Pro Ala Cys Ser Pro Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
435 440 445

Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
450 455 460

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
465 470 475 480

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
485 490 495

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
500 505 510

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
515 520 525

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
530 535 540

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
545 550

ES 2 836 743 T3

<210> 5  
<211> 556  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Sintética  
  
10 <400> 5  
  
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15  
  
His Ala Ala Arg Pro Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu  
20 25 30  
  
Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45  
  
Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
50 55 60  
  
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile  
65 70 75 80  
  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95  
  
Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110  
  
Tyr Gly Ser Ser Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile  
115 120 125  
  
Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser  
130 135 140  
  
Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
145 150 155 160

ES 2 836 743 T3

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe  
165 170 175

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala  
195 200 205

Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
210 215 220

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp  
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu  
260 265 270

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala  
275 280 285

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg  
290 295 300

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys  
305 310 315 320

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu  
325 330 335

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Gln Arg Arg  
340 345 350

Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro  
355 360 365

Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile  
370 375 380 385

Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Arg Phe Ser  
385 390 395 400

Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro  
405 410 415

ES 2 836 743 T3

Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys  
420 425 430

Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe  
435 440 445

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu  
450 455 460

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp  
465 470 475 480

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys  
485 490 495

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala  
500 505 510

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys  
515 520 525

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr  
530 535 540

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
545 550 555

<210> 6

<211> 506

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 6

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

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

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

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly  
50 55 60

ES 2 836 743 T3

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

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

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

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

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

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu  
165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser  
195 200 205

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

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Phe Val  
260 265 270

Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro  
275 280 285

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
290 295 300

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
305 310 315 320

ES 2 836 743 T3

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
325 330 335

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
340 345 350

Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met  
355 360 365

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala  
370 375 380

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg  
385 390 395 400

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn  
405 410 415

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
420 425 430

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro  
435 440 445

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala  
450 455 460

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His  
465 470 475 480

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp  
485 490 495

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
500 505

<210> 7

<211> 560

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10 <400> 7

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

ES 2 836 743 T3

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

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

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly  
50 55 60

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

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

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

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

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

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu  
165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser  
195 200 205

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

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val  
260 265 270

ES 2 836 743 T3

Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro  
275 280 285

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
290 295 300

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
305 310 315 320

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
325 330 335

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
340 345 350

Asn Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu  
355 360 365

Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser  
370 375 380

Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser  
385 390 395 400

Pro Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile  
405 410 415

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp  
420 425 430

Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
435 440 445

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
450 455 460

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
465 470 475 480

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys  
485 490 495

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
500 505 510

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
515 520 525

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
530 535 540

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
545 550 555 560

5 <210> 8  
<211> 513  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 836 743 T3

<220>  
<223> Sintética

5 <400> 8

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

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

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

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly  
50 55 60

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

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

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

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

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

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu  
165 170 175

ES 2 836 743 T3

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser  
195 200 205

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

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Phe Val  
260 265 270

Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro  
275 280 285

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
290 295 300

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
305 310 315 320

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
325 330 335

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
340 345 350

Asn Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu  
355 360 365

Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser  
370 375 380

Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser  
385 390 395 400

Pro Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln  
405 410 415

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu  
420 425 430

ES 2 836 743 T3

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly  
435 440 445

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln  
450 455 460

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu  
465 470 475 480

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr  
485 490 495

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro  
500 505 510

Arg

<210> 9

<211> 554

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 9

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

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

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

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly  
50 55 60

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

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

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

ES 2 836 743 T3

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

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

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Ieu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu  
165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser  
195 200 205

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

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Phe Val  
260 265 270

Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro  
275 280 285

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
290 295 300

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
305 310 315 320

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
325 330 335

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
340 345 350

Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met  
355 360 365

ES 2 836 743 T3

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala  
370 375 380

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Arg Arg Lys Tyr Arg  
385 390 395 400

Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr  
405 410 415

Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp  
420 425 430

Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Arg Val Lys Phe Ser Arg  
435 440 445

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn  
450 455 460

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
465 470 475 480

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro  
485 490 495

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala  
500 505 510

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His  
515 520 525

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp  
530 535 540

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
545 550

<210> 10

<211> 476

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 10

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

ES 2 836 743 T3

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

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
50 55 60

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

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

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

Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
145 150 155 160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe  
165 170 175

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala  
195 200 205

Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
210 215 220

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp  
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu  
260 265 270

ES 2 836 743 T3

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala  
275 280 285

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg  
290 295 300

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys  
305 310 315 320

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu  
325 330 335

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys  
340 345 350

Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg  
355 360 365

Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp  
370 375 380

Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly  
385 390 395 400

Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg  
405 410 415

Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro  
420 425 430

Glu Pro Ala Cys Ser Pro Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr  
435 440 445

Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu  
450 455 460

Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln  
465 470 475

<210> 11

<211> 480

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10 <400> 11

ES 2 836 743 T3

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

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

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

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly  
50 55 60

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

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

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

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

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

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu  
165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser  
195 200 205

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

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
245 250 255

# ES 2 836 743 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val  
260 265 270

Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro  
275 280 285

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
290 295 300

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
305 310 315 320

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
325 330 335

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
340 345 350

Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met  
355 360 365

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala  
370 375 380

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Arg Arg Lys Tyr Arg  
385 390 395 400

Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr  
405 410 415

Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp  
420 425 430

Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro Gln Val Arg Lys Ala Ala  
435 440 445

Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr  
450 455 460

Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln  
465 470 475 480

<210> 12

<211> 428

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10 <400> 12

ES 2 836 743 T3

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
50 55 60

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

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

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

Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
145 150 155 160

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Asp Ser Gly Gly Thr Phe  
165 170 175

Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala  
195 200 205

Gln Gln Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
210 215 220

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
225 230 235 240

ES 2 836 743 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Val Ala Ala Asp Trp Leu Asp Pro Trp  
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe Leu  
260 265 270

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala  
275 280 285

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg  
290 295 300

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys  
305 310 315 320

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu  
325 330 335

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys  
340 345 350

Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg  
355 360 365

Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp  
370 375 380

Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr  
385 390 395 400

Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu  
405 410 415

Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln  
420 425

<210> 13

<211> 432

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 13

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
1 5 10 15

ES 2 836 743 T3

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

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

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly  
50 55 60

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

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

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

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

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

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu  
165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu  
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser  
195 200 205

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

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr  
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val  
260 265 270

ES 2 836 743 T3

Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro  
275 280 285

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
290 295 300

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
305 310 315 320

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
325 330 335

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
340 345 350

Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met  
355 360 365

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala  
370 375 380

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Gln Val Arg Lys Ala Ala  
385 390 395 400

Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr  
405 410 415

Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln  
420 425 430

<210> 14

<211> 18

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

10

<400> 14

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr  
1 5 10 15

Lys Gly

15

<210> 15

<211> 47

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Sintética

<400> 15

ES 2 836 743 T3

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

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

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

**REIVINDICACIONES**

1. Receptor de antígeno químérico (CAR) dirigido contra CD19, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.
2. CAR según la reivindicación 1, en el que el CAR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.
3. Ácido nucleico aislado o purificado que codifica para el CAR según la reivindicación 1 ó 2.
4. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 3.
5. Célula T o linfocito citolítico natural aislados que comprenden el vector según la reivindicación 4.
6. Célula T o linfocito citolítico natural según la reivindicación 5, para su uso en la prevención o el tratamiento de una neoplasia maligna de células B en un sujeto.
7. Método de destrucción de células B malignas *in vitro*, método que comprende poner en contacto una o más de las células T o los linfocitos citolíticos naturales según la reivindicación 5 con una población de células B malignas que expresan CD19, mediante lo cual el CAR se une a CD19 en las células B malignas y se destruyen las células B malignas.
8. Método según la reivindicación 7, en el que las células B malignas son células de linfoma.
9. Método según la reivindicación 7, en el que las células B malignas son células de leucemia.
10. Método de elaboración de una célula que expresa un receptor de antígeno químérico (CAR), comprendiendo el método introducir un vector que codifica para el CAR según la reivindicación 1 ó 2 en una célula T o un linfocito citolítico natural aislados.

FIG. 1

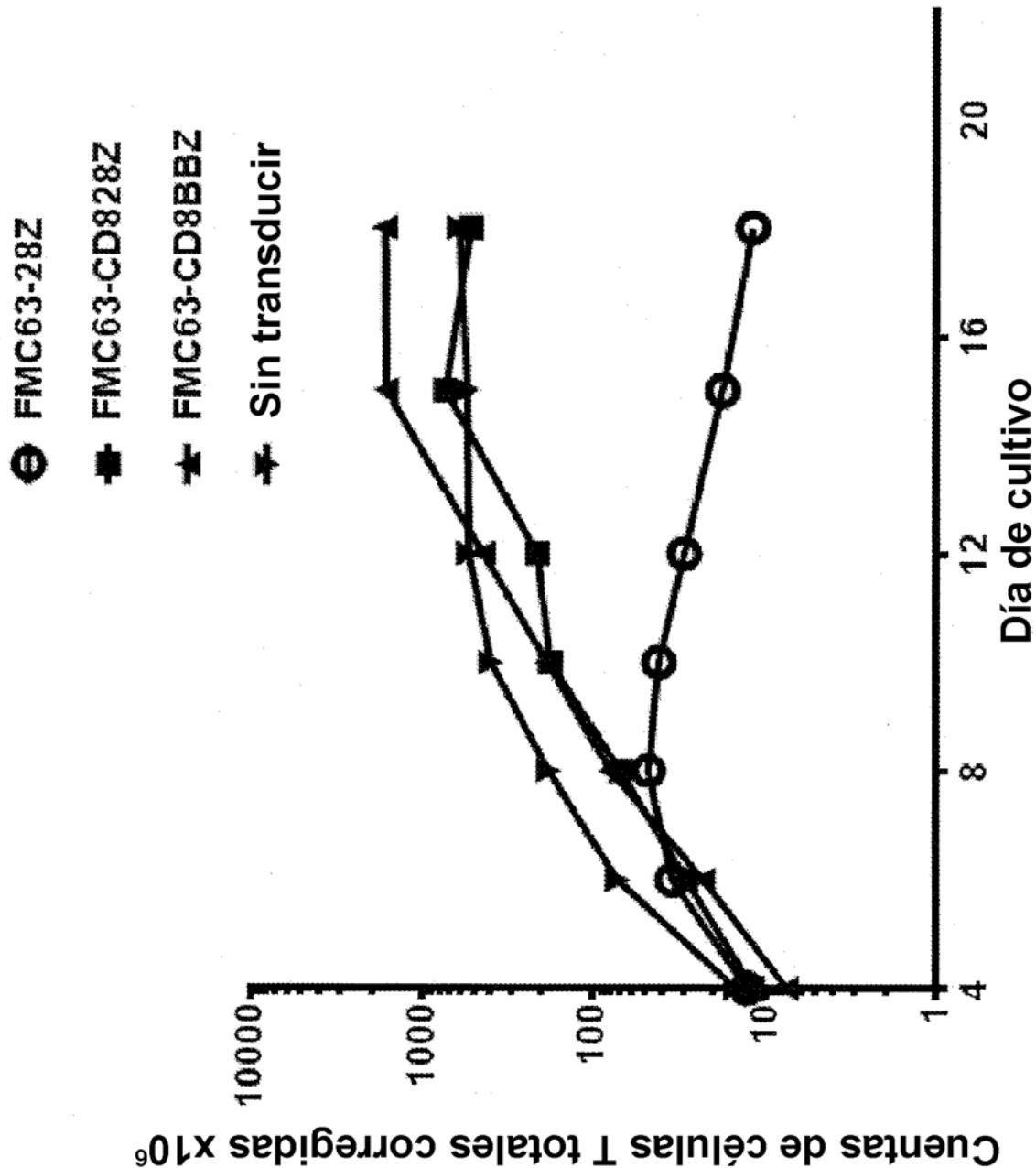


FIG. 2A

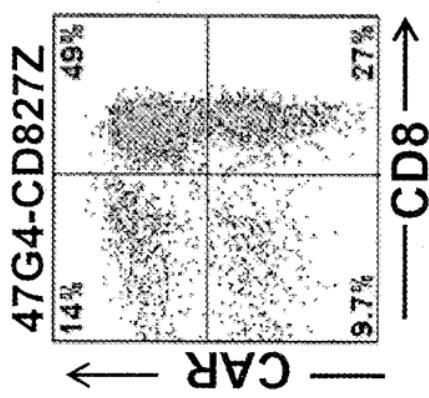


FIG. 2B

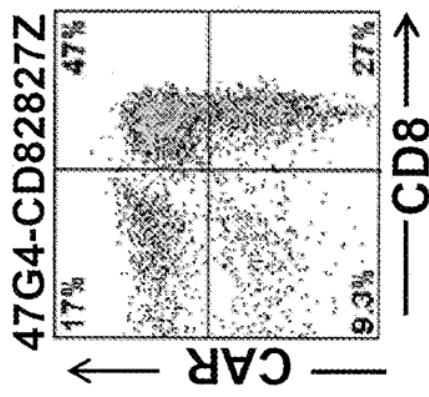


FIG. 2C

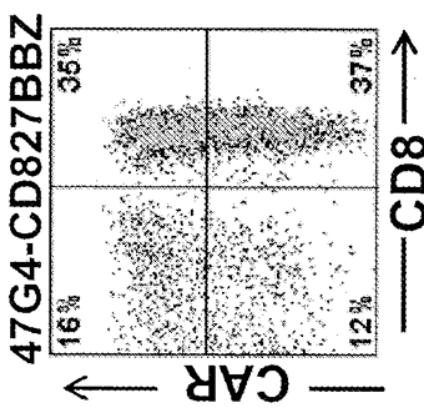


FIG. 2D

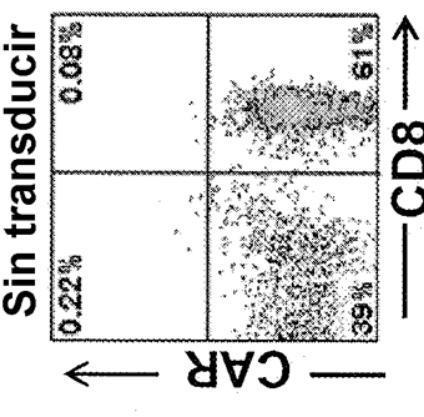


FIG. 3A

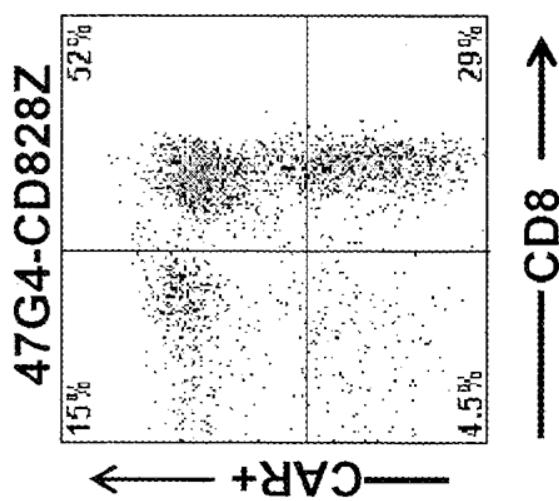


FIG. 3B

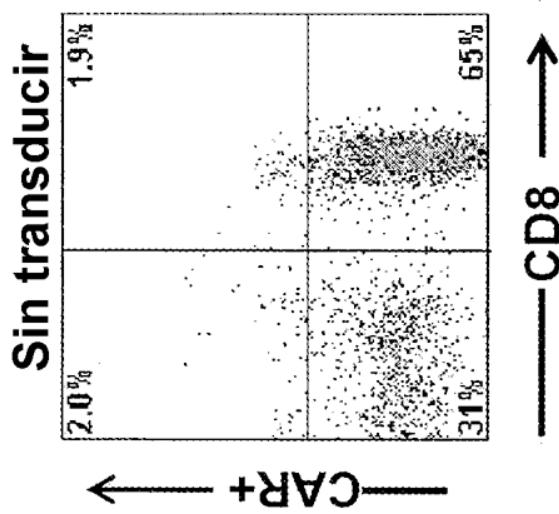


FIG. 4A

CD19-K562

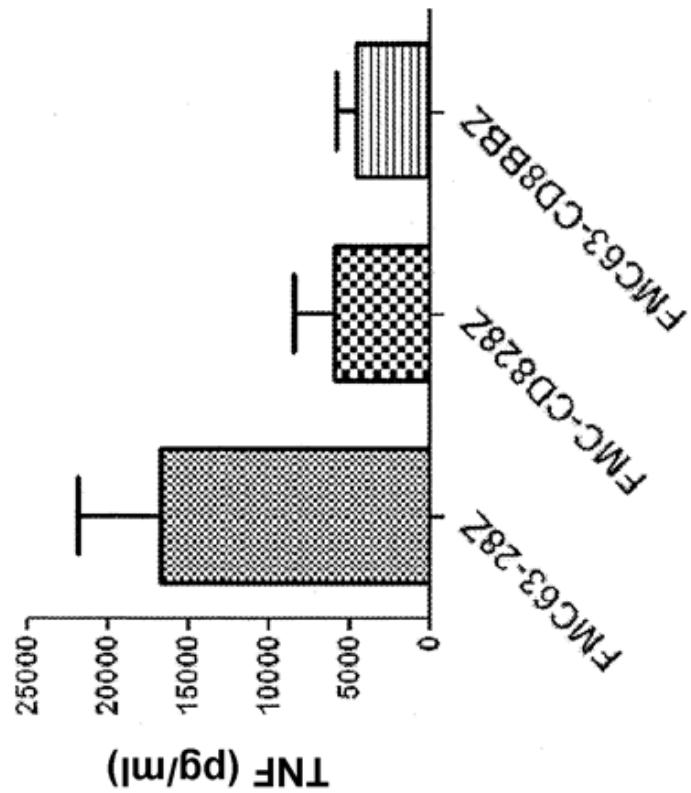


FIG. 4B

NALM6

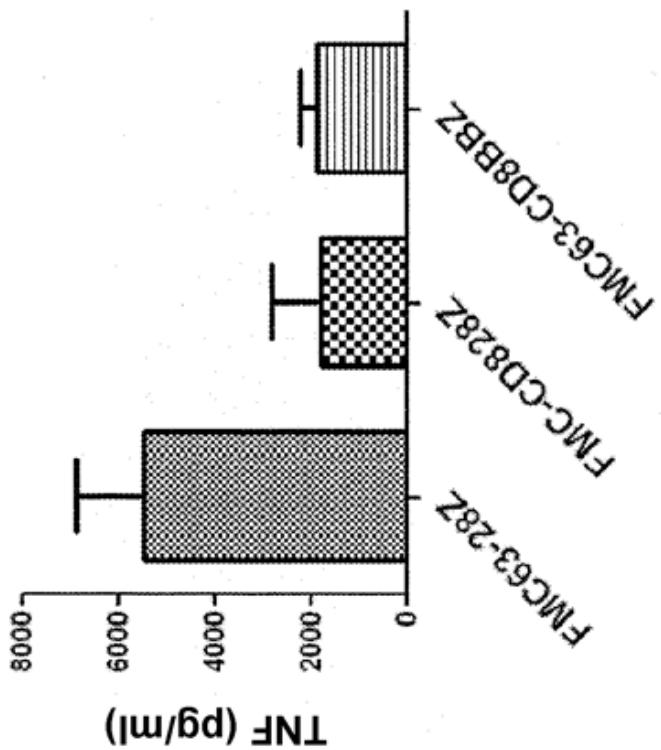


FIG. 5

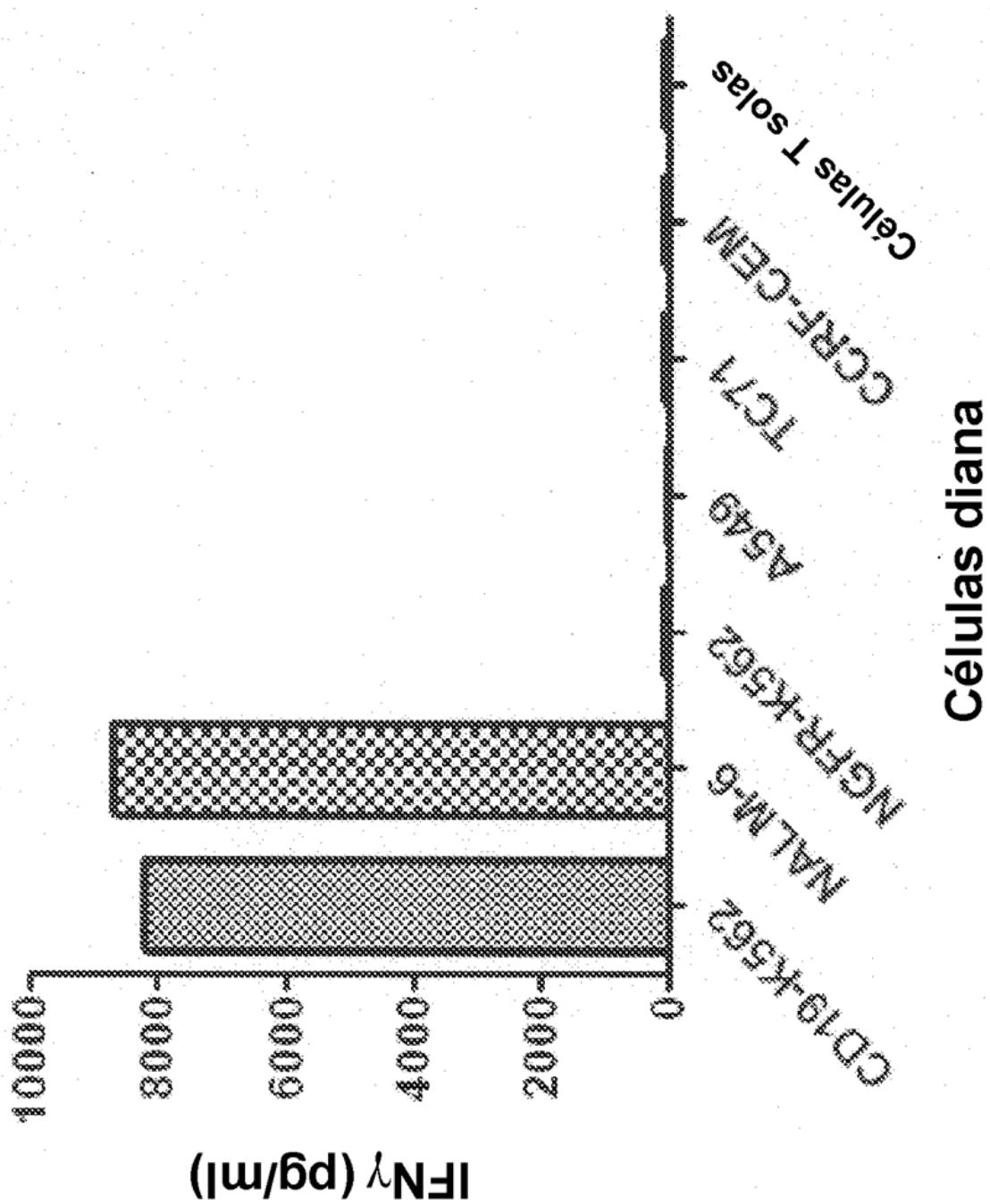


FIG. 6A

47G4-CD8227Z

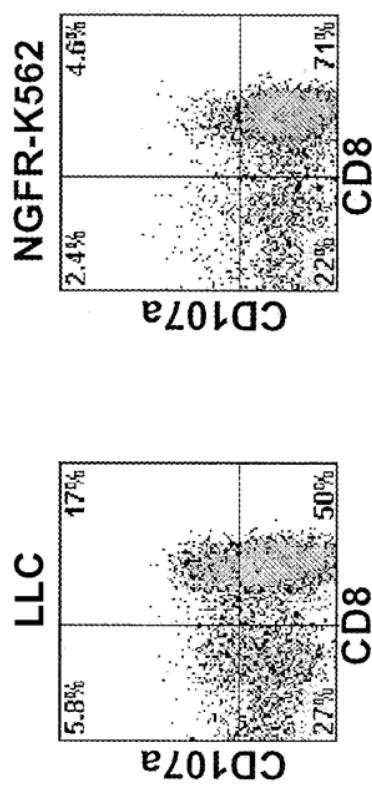


FIG. 6B

47G4-CD82827Z

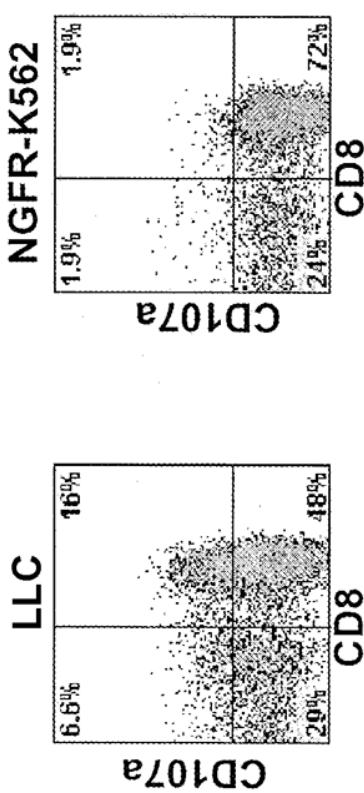


FIG. 6C

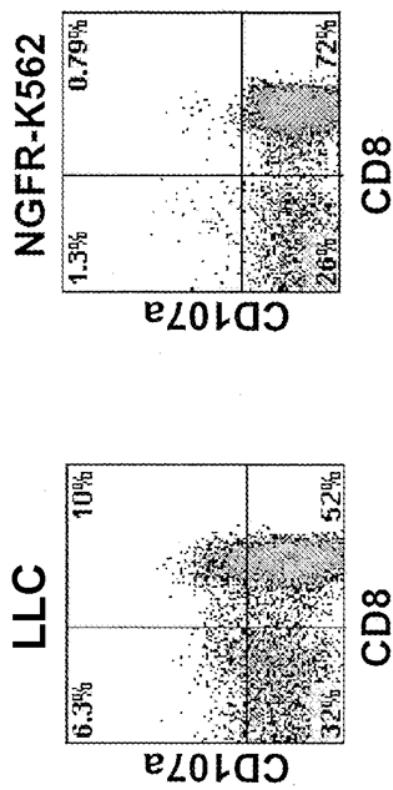
**47G4-CD827BBZ**

FIG. 6D

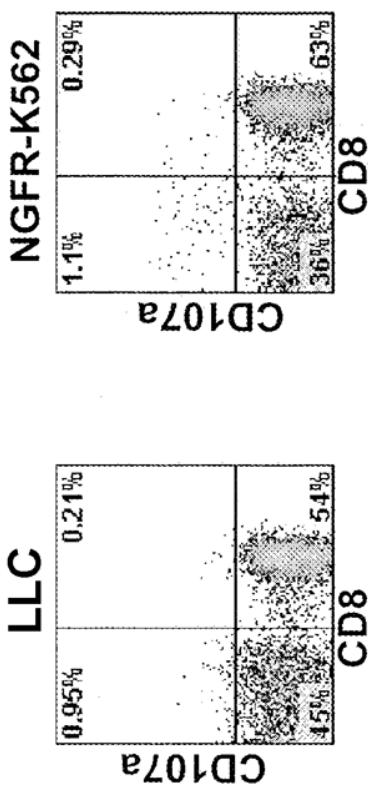
**Sin transducir**

FIG. 7A

FMC63-CD8BBZ

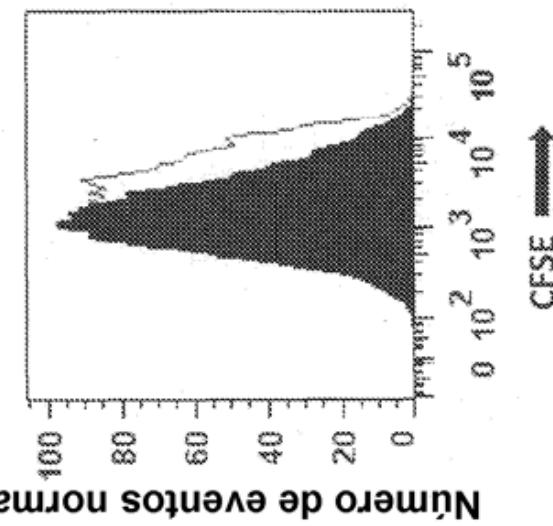


FIG. 7B

FMC63-CD828Z

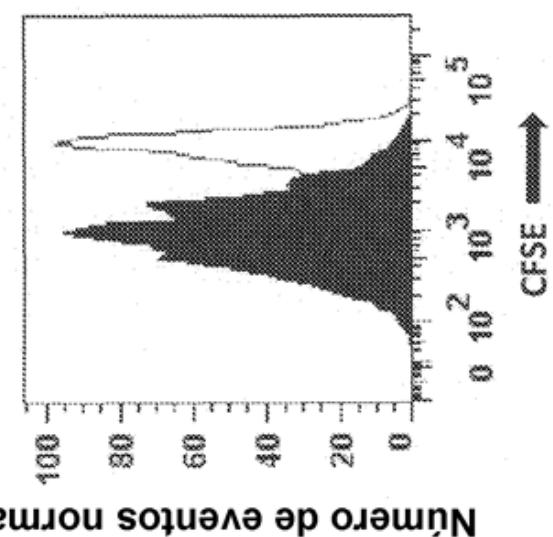


FIG. 7C

47G4-CD8BBZ

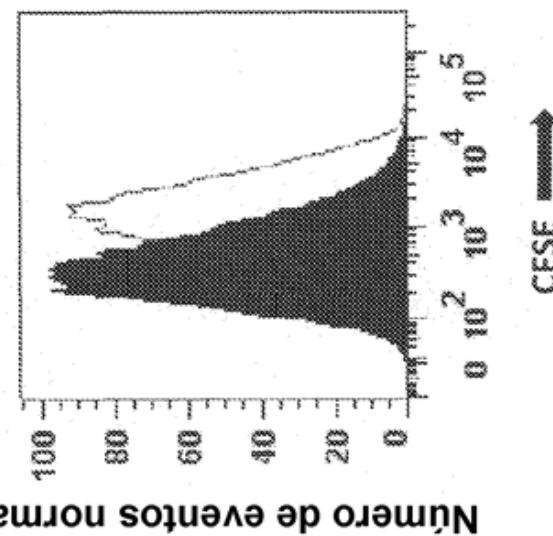


FIG. 8

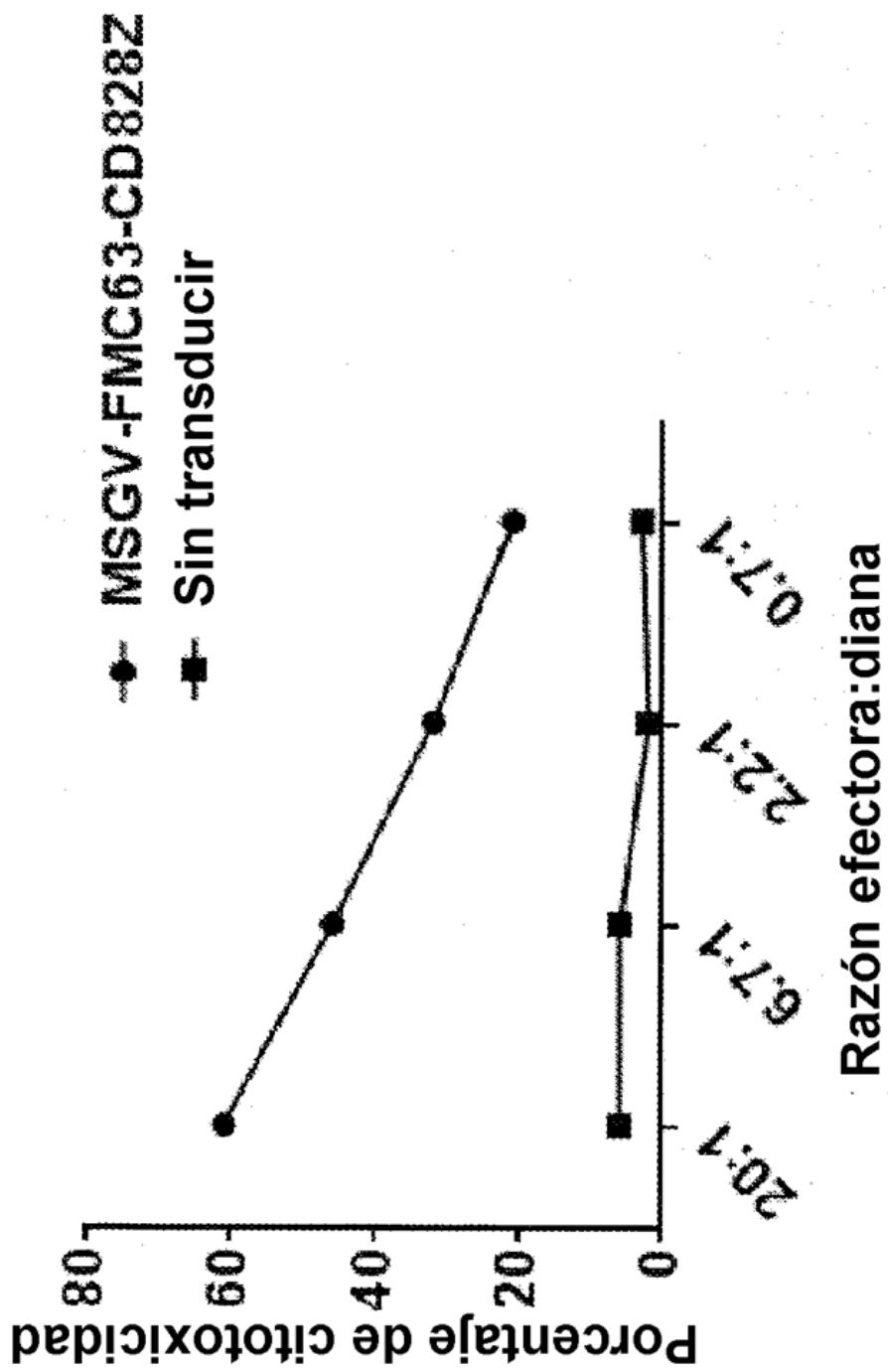
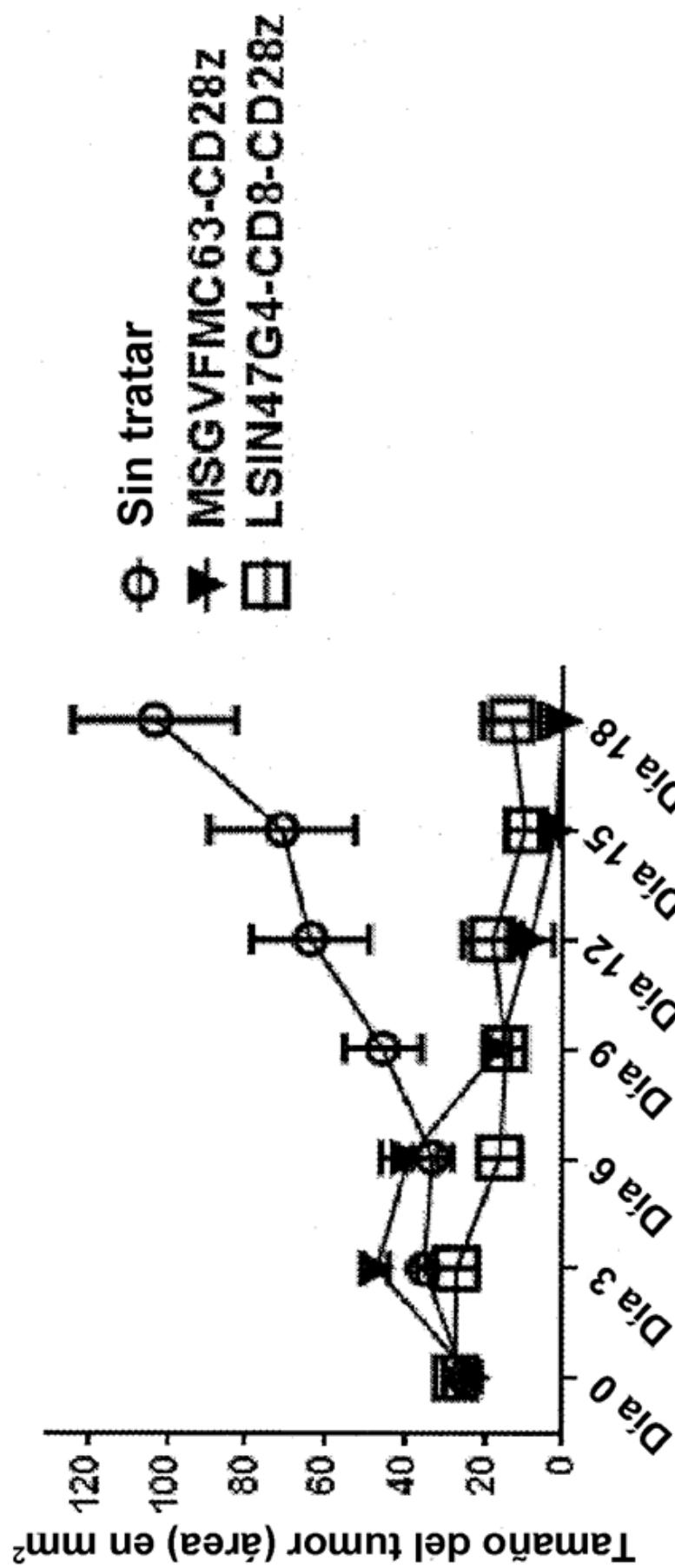


FIG. 9



Días después de la infusión de células T