

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 174**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2009 E 15188601 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.10.2021 EP 3006459**

54 Título: **Método y composiciones para el funcionamiento mejorado del efecto antitumoral de las células T**

30 Prioridad:

26.08.2008 US 91915 P

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

10.03.2022

73 Titular/es:

**CITY OF HOPE (100.0%)
1500 East Duarte Road
Duarte, CA 91010, US**

72 Inventor/es:

JENSEN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 899 174 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

Método y composiciones para el funcionamiento mejorado del efecto antitumoral de las células T

5 Declaración sobre investigación patrocinada federalmente

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno en forma de Subvención de Apoyo al Centro de Cáncer núm. P30-CA33572-21 del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Institutos Nacionales de Salud. El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

10

Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

15 La invención se refiere al campo de la biomedicina y específicamente a métodos útiles para la terapia del cáncer. En particular, la invención se refiere a un receptor de antígeno quimérico (CAR) para estrategias inmunoterapéuticas CTL específicas para el cáncer que incluyen el uso de linfocitos T modificados genéticamente que expresan inmunorreceptores quiméricos en el tratamiento de tumores cerebrales humanos y otros cánceres.

20 2. Descripción de la técnica anterior

Se han investigado inmunoterapias basadas en células T específicas de tumor para el tratamiento antitumoral, sin embargo, las células T adolecen del problema de no sobrevivir y permanecer activas in vivo durante un período suficientemente largo. A menudo, las células T transferidas de forma adoptiva no tienen la potencia y duración deseadas para la destrucción de las células tumorales. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de terapias contra el cáncer específicas de tumores con funcionamiento antitumoral a más largo plazo.

Las inmunoterapias dirigidas contra el cáncer tradicionalmente se centran en provocar respuestas de CTL CD8⁺. Sin embargo, la estimulación de las respuestas de las células T CD4⁺ (auxiliares) también es importante para una inmunoterapia exitosa contra el cáncer. Las células T CD4⁺ pueden influir en las respuestas CTL específicas de tumores naturales directa o indirectamente, mediante el acondicionamiento de células presentadoras de antígenos profesionales a través de CD40-CD40L y mediante la producción de citocinas como IL2 e IFN- γ . Los mecanismos efectoras citocidas utilizados por las células T CD4⁺ están mediados por la liberación de citocinas que activan los receptores de muerte en la superficie de la célula tumoral, o por contacto celular directo donde Fas/FasL, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) o las rutas dependientes de granzima perforina median la apoptosis de las células tumorales. Estas células auxiliares pueden aumentar la expansión clonal temprana y la generación de efectores primarios de CTL CD8⁺, y también pueden afectar tanto la generación como la expansión de las células T CD8⁺ de memoria funcional.

La activación completa de las células T CD4⁺ naturales requiere una señal específica de antígeno a través del acoplamiento del complejo receptor de células T/CD3 con complejos de péptido/MHC clase II apropiados y señales coestimuladoras. Estas señales coestimuladoras suelen ser entregadas por ligandos que se expresan selectivamente en células especializadas presentadoras de antígenos. Se cree que la coestimulación de células T ayuda a mantener la tolerancia a los autoantígenos normales expresados por tejidos que no envían esta señal secundaria. Debido a que la mayoría de las células tumorales, al igual que los tejidos normales, no expresan MHC de clase II o moléculas coestimuladoras, es lógico que tampoco promuevan directamente la estimulación de las células T CD4⁺. Esta teoría está respaldada por varios estudios que han demostrado una mayor inmunidad antitumoral mediada por células T mediante la vacunación con células tumorales que fueron transfectadas con el ligando coestimulador B7-1.

Aunque alterar la expresión de las células tumorales de moléculas coestimuladoras es una forma de ayudar a impulsar la activación de las células T, serían muy deseables estrategias alternativas, en particular estrategias que implican permitir que las células T reciban y actúen sobre señales coestimuladoras sin la necesidad de un ligando coestimulador real (s).

El documento WO2008/095141 divulga células T reguladoras redirigidas dotadas de especificidad hacia un antígeno o ligando diana seleccionado y su uso en la supresión de enfermedades autoinmunes. El documento US2003/0171546 A1 se refiere a inmunorreceptores transmembrana quiméricos para redirigir la especificidad antigénica de las células T, con aplicación al tratamiento de una variedad de cánceres. En particular, el documento US2003/0171546 A1 divulga un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico de tumor con un dispositivo de señalización coestimuladora de CD28. El documento US2005/0113564 A1 divulga un método para potenciar la actividad de un receptor de antígeno quimérico contra un tumor, que comprende añadir un dominio de señalización CD28 o 4-1BB a dicho receptor.

Resumen de la invención

65 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) como se reivindica en la reivindicación 1 a continuación, para el funcionamiento efector antitumoral mejorado de las células T

CD4⁺ y CD8⁺ para la inmunoterapia del cáncer. Los inmunorreceptores transmembrana quiméricos (denominados receptores de antígenos quiméricos o "CAR") comprenden un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El dominio extracelular está formado por un ligando de receptor soluble (que es específico para un antígeno tumoral diana u otra molécula de la superficie de la célula tumoral) unido a una región de soporte opcional capaz de unir el dominio extracelular a la superficie celular. El dominio de señalización intracelular contiene el dominio de señalización de la cadena zeta del complejo CD3 humano (CD3ζ) y los dominios de señalización coestimuladores de CD28 y 4-1BB. El dominio extracelular contiene un elemento de reconocimiento que permite al CAR, cuando se expresa en la superficie de una célula T, dirigir la actividad de la célula T a aquellas células que expresan un receptor o ligando para el que este elemento de reconocimiento es específico. Por ejemplo, un CAR que contiene un dominio extracelular que contiene un elemento de reconocimiento específico para un antígeno tumoral puede dirigir la actividad de las células T a las células tumorales que portan este antígeno. La región intracelular permite que la célula T reciba señales coestimuladoras. Los dominios de señalización coestimuladores son CD28 y 4-1BB. El receptor quimérico comprende una región transmembrana de CD4 humana, una Fc de IgG₄ humana y un receptor o ligando de IL13 que es específico de tumor. La molécula IL13 contiene la mutación E13Y, como en IL13-CD28-41BBζ.

Las realizaciones de la invención también abarcan linfocitos T aislados que expresan el CAR discutido en el presente documento. Además, las realizaciones de la invención incluyen métodos de inmunoterapia contra el cáncer que comprenden administrar a un paciente que lo necesite tales linfocitos T, incluidos los tratamientos para cualquiera de los siguientes cánceres: glioblastoma, meduloblastoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer, sarcoma de Kaposi, leucemia mielógena aguda y neoplasias malignas de linaje B.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de las moléculas de proteína del receptor de antígeno quimérico (CAR) IE13ζ e IL13-CD28-41BBζ.

La Figura 2 muestra las ubicaciones de cebadores ejemplares para la construcción de CAR de IE13ζ en la secuencia de IL13 nativa como se indica. Las flechas indican la posición de los cebadores en la secuencia de IL13.

La Figura 3 (proporcionada como Figuras 3A-3C) proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la zetaquina IL13 ejemplar (SEQ ID NO: 5, cadena superior; SEQ ID NO: 6, cadena inferior). Los segmentos de ADN en la secuencia incluyen el péptido señal alfa de GM-CSFR (SEQ ID NO: 7), IL13 (E13Y) (SEQ ID NO: 8), IgG₄ (SmP) (SEQ ID NO: 9), CD4_{tm} (SEQ ID NO: 10) y CD3zeta (SEQ ID NO: 11). La secuencia de aminoácidos completa se proporciona como SEQ ID NO: 4.

La Figura 4 es un mapa del vector IL13zetaquina/HyTK-pMG. En la Figura 5 se proporciona una secuencia ejemplar de dicho vector.

La Figura 5 (dada como Figuras 5A-5L) proporciona la secuencia de un ejemplo de vector de ADN plasmídico (SEQ ID NO: 13, cadena superior; SEQ ID NO: 14, cadena inferior). También se indican una secuencia de aminoácidos de IL13zetaquina (SEQ ID NO: 15) y una secuencia de aminoácidos de HyTk (SEQ ID NO: 16). Los segmentos de ADN que componen la secuencia completa incluyen hEFlp (nucleótidos 6-549; SEQ ID NO: 41), IL13zetaquina (nucleótidos 690-2183; SEQ ID NO: 42), sv40pAn tardío (nucleótidos 2230-2498; SEQ ID NO: 43), Ori ColE1 (nucleótidos 2499-3245; SEQ ID NO: 44), SpAn (nucleótidos 3246-3432; SEQ ID NO: 45), hCMV-1Aprom (nucleótidos 3433-4075; SEQ ID NO: 46), HyTK (nucleótidos 4244-6319; SEQ ID NO: 47) y BGh pAna (nucleótidos 6320-6618; SEQ ID NO: 48).

La Figura 6 contiene dos representaciones esquemáticas de construcciones de plásmidos lineales CAR ejemplares. La Figura 6A muestra una construcción IL13ζ y la Figura 6B muestra una construcción IL13-CD28-41BBζ.

La Figura 7 muestra el análisis de transferencia Western de lisados celulares derivados de células T CD4⁺ transfectadas con IL13ζ e IL13-CD28-41BBζ para expresión de CAR usando un mAb específico de CD3ζ antihumano de ratón.

La Figura 8 es un panel de ocho análisis de citometría de flujo que comparan el fenotipo de la superficie celular de las células CD4⁺ en volumen que expresan IL13ζ e IL13-CD28-41BBζ.

La Figura 9 es un panel de seis gráficos que muestran los resultados de la citometría de flujo de la tinción de la superficie de HLA-A2 y HLA-DR (moléculas MHC), IL13Rα2 y las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD137-L (4-1BBL) (histogramas rellenos) como se indica, en comparación con controles de isotipo (histogramas abiertos) en células diana de glioma U87.

La Figura 10 es una serie de inmunotransferencias que muestran los resultados de un ensayo de quinasa para determinar la cinética de la activación de JNK y p38 (3A) y AKT (3B), que se mide mediante la fosforilación de sus respectivos sustratos (es decir, P-cJun (protooncogén c-Jun fosforilado), p-GSK3 (glucógeno de sintasa quinasa 3 fosforilada) y P-ATF2 (factor 2 de transcripción activador fosforilado)).

La Figura 11 muestra la polarización Th₁ mejorada de células T IL13-CD28-41BBζ⁺ CD4⁺ en términos de ARNm de citocina Th₁ de células T (Figura 11A) y producción de proteína de citocina Th₁ y Th₂ (Figura 11B).

5 La Figura 12A proporciona datos que muestran una actividad citotóxica mejorada de las células T IL13-CD28-41BBζ⁺ CD4⁺ (■) contra las dianas U87 en comparación con la de las células T IL13ζ⁺ CD4⁺ (○) en la relación E: T indicada en un ensayo de citotoxicidad de luciferasa de 4 horas (LCA). La Figura 12B muestra datos similares para las células T IL13-CD28-41BBζ⁺ CD4⁺ (barras negras) y las células T IL13ζ⁺ CD4⁺ (barras blancas) cocultivadas durante 48 horas en una relación E: T de 2: 1, y luego nuevamente co-cultivado durante 48 horas adicionales después de la adición de dianas frescas en la misma proporción E: T. La Figura 12C proporciona datos obtenidos con imágenes de video de células T que expresan el CAR indicado cocultivado con células U87 adherentes, lo que indica el número de células viables por imagen.

15 La Figura 13 proporciona datos de flujo que muestran un efecto antitumoral sostenido contra xenoinjertos de glioblastoma establecidos in vivo por células T IL13-CD28-41BBζ⁺ CD4⁺. También se muestran los resultados observados con células T transfectadas con IL13ζ y simuladamente.

La Figura 14 proporciona la secuencia de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-Zeta (CO)(SEQ ID NO: 36).

20 La Figura 15 proporciona la secuencia de IL13-IgG₄-cd4tm-CD28-4-1BB-Zeta, también denominada en el presente documento IL13-CD28-41BBζ utilizada/discutida anteriormente con respecto a los ejemplos siguientes (SEQ ID NO: 37). Esta secuencia se usó para alterar genéticamente las células T para expresar el CAR de IL13-CD28-41BBζ como se describe y se usa en las Figuras 1, 6, 7, 8, 10, 11, 12 y 13.

25 La Figura 16 proporciona la secuencia de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28-Ox40-Zeta (SEQ ID NO: 38).

La Figura 17 proporciona la secuencia de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-4-1BB-Zeta (SEQ ID NO: 39).

30 La Figura 18 proporciona la secuencia de H-13-IgG₄-cd28tm-CD28gg¹⁹⁹-4-1BB-Zeta (SEQ ID NO: 40).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

35 La inmunoterapia adoptiva que utiliza linfocitos T que expresan receptores de antígenos quiméricos (CAR) específicos de tumores puede ser una poderosa estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer. Los CAR están formados por un elemento de reconocimiento específico extracelular (como un receptor que se une a un antígeno tumoral) unido a través de un dominio transmembrana al dominio de señalización citoplásmico CD3ζ. Por lo tanto, estos receptores son capaces tanto de unirse al antígeno como de transducir la activación de las células T, independientemente de la restricción del MHC. Por tanto, los CAR son inmunorreceptores “universales” que pueden tratar una población de pacientes con tumores con antígeno positivo independientemente de su genotipo HLA.

40 De acuerdo con las realizaciones de esta invención, los CAR contienen el dominio de señalización para CD3ζ y los dominios de señalización de uno o más receptores coestimuladores que promueven aún más el reciclaje, supervivencia y/o expansión de células transferidas adoptivamente que expresan los CAR, además de receptores que permiten que las células se involucren en objetivos como los tumores. Los dominios de señalización de los receptores coestimuladores son las porciones intracelulares de cada proteína receptora que generan la señal de activación en la célula. Son ejemplos los aminoácidos 180-220 de la molécula CD28 nativa y los aminoácidos 214-255 de la molécula 4-1BB nativa. Un CAR especialmente preferido comprende un elemento de reconocimiento extracelular que es específico para un receptor de superficie de células cancerosas único, es estable in vivo y tiene baja inmunogenicidad. La derivación de una molécula de señal celular soluble de origen natural ayuda a lograr estos objetivos.

50 El término “CAR” se refiere a un receptor de antígeno quimérico que es una biomolécula recombinante que contiene un dominio de reconocimiento extracelular, una región transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El término “antígeno”, por lo tanto, no se limita a moléculas que se unen a anticuerpos, sino a cualquier molécula que pueda unirse específicamente a cualquier receptor. Por tanto, “antígeno” se refiere al dominio de reconocimiento del CAR. El dominio de reconocimiento extracelular (también denominado dominio extracelular o simplemente por el elemento de reconocimiento que contiene) comprende un elemento de reconocimiento que se une específicamente a una molécula presente en la superficie celular de una célula diana. La región transmembrana ancla el CAR en la membrana. El dominio de señalización intracelular comprende el dominio de señalización de la cadena zeta del complejo CD3 humano y opcionalmente comprende uno o más dominios de señalización coestimuladores.

60 Un CAR que contiene el dominio IL13 con la mutación E13Y (IL13 (E13Y)) y el dominio de señalización de la cadena zeta de CD3 se denomina en el presente documento “IL13ζ”. Este término incluye cualquier receptor de antígeno quimérico (CAR) que contiene un dominio de reconocimiento extracelular de IL13 (un dominio que reconoce específicamente IL13Rα2 en células tumorales), una región transmembrana y un dominio de señalización intracelular de la cadena zeta de CD3. En los Ejemplos 8-12 se proporcionan ejemplos no limitantes de tales CAR. Un CAR que

contiene IL13 (E13Y) y también contiene los dominios intracelulares coestimuladores opcionales CD28 y 4-1BB se denomina en el presente documento "IL13-CD28-41BBζ".

Los expertos reconocerán que cualquier secuencia de nucleótidos que codifique IL13 (E13Y) también sería adecuada para este mismo propósito. La secuencia no mutada del dominio de señalización de IL13 también es adecuada. Aquí se puede usar cualquier secuencia que codifique IL13 o IL13 (E13Y), incluidas variantes con 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de homología con la secuencia nativa. Tales secuencias que son útiles para reconocer específicamente un antígeno tumoral del receptor de IL13 tal como IL13Rα2, por lo tanto incluyen aquellas codificadas por el ácido nucleico nativo (ver Smernov et al., Gene 155: 277-281, 1995, cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia), la misma secuencia de ácido nucleico que carece de la mutación E13Y, secuencias que son 95 %, 98 % o 99 % homólogas a estas secuencias, secuencias más largas que comprenden esas secuencias pero que también incluyen nucleótidos adicionales en el extremo 3' o 5', por ejemplo, cualquier número de nucleótidos o codones adicionales, como 3, 6, 9, 12 o más nucleótidos, o hasta aproximadamente 12, 20, 50 o 100 nucleótidos adicionales, y cualquier secuencia que codifique la misma secuencia de aminoácidos que estos ácidos nucleicos debido a la degeneración del código genético. En particular, las secuencias que tienen codones optimizados (CO) para la expresión del huésped deseado se contemplan como parte de la invención.

Los elementos de reconocimiento solubles como se usan en esta invención se derivan de polipéptidos sintetizados de novo, como se describe para la secuencia codificante de IL13 (E13Y) en el Ejemplo 1 o de polipéptidos de genotecas combinatorias tales como genotecas de presentación de fagos o genotecas sintetizadas químicamente. Los elementos de reconocimiento solubles preferidos son de origen humano y, por lo tanto, no son inmunogénicos, pero se pueden adaptar en afinidad o especificidad mediante mutagénesis. Tras su expresión en las células T, los elementos de reconocimiento solubles son capaces de unirse a un elemento diana en la célula diana (por ejemplo, una célula tumoral, pero no en un grado apreciable en las células no diana), de tal manera que resulta en células T activación. Por lo tanto, los elementos de reconocimiento solubles que son adecuados para esta invención tienen ciertas ventajas sobre los fragmentos de anticuerpos o las moléculas de adhesión celular para la especificidad de la diana en los CAR de la invención, ya que es más probable que sean estables en el entorno extracelular, no antigénicos y más selectivos, y por lo tanto son los preferidos. Los ejemplos de elementos receptores solubles adecuados incluyen factores de crecimiento autocrinos y paracrinos, quimiocinas, citocinas, hormonas y ligandos de moléculas pequeñas artificiales manipulados que exhiben la especificidad requerida. Las secuencias de ligandos naturales se pueden diseñar para aumentar su especificidad para una célula diana particular. La selección de un elemento de reconocimiento para su uso en un CAR particular se rige por la naturaleza de la célula diana y las cualidades discutidas anteriormente. En una realización preferida de la invención, el CAR aprovecha la expresión restringida por tumores de IL13Rα2 por glioma maligno, carcinoma de células renales y otros tumores utilizando como elemento de reconocimiento un mutante de IL13 (E13Y) para dirigir las células T específicamente a IL13Rα2 que expresan células tumorales. Se pueden crear elementos de reconocimiento análogos que son específicos para cualquiera de una variedad de tipos de células cancerosas que expresan selectivamente antígenos receptores o cualquier molécula específica en sus superficies celulares, para los cuales se conocen o pueden diseñarse elementos de reconocimiento selectivo.

Los ejemplos de regiones de soporte (transmembrana) adecuadas para su uso con la invención incluyen las regiones constantes (Fc) de inmunoglobinas, CD8a humano y enlazadores artificiales que sirven para alejar la fracción de direccionamiento de la superficie celular para mejorar el acceso y la unión en las células diana. Una región de soporte preferida es la región Fc de una IgG (tal como IgG4). Los ejemplos de dominios transmembrana adecuados incluyen los dominios transmembrana de los marcadores CD de leucocitos, preferiblemente los de CD4 o CD28. Los ejemplos de dominios de señalización del receptor intracelular incluyen el complejo de receptor de antígeno de células T, preferiblemente la cadena zeta de CD3, sin embargo, se puede usar cualquier región transmembrana suficiente para anclar el CAR en la membrana. Los expertos conocen numerosas regiones transmembrana y los elementos estructurales (tales como regiones de aminoácidos lipófilicos) que producen dominios transmembrana en numerosas proteínas de membrana y, por lo tanto, pueden sustituir cualquier secuencia conveniente. Los receptores de señalización coestimuladores de células T adecuados para mejorar la función y actividad de las células que expresan CAR incluyen, pero no se limitan a, CD28 y 4-1BB también conocidos como (CD137) y OX-40.

La señalización a través de CD28 es necesaria para la producción y proliferación de IL2, pero no cumple una función principal en el mantenimiento de la función y actividad de las células T. 4-1BB (un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral expresado después de la activación de CD28) y OX-40 están involucrados en impulsar la supervivencia a largo plazo de las células T y la acumulación de células T. Los ligandos para estos receptores se expresan típicamente en células presentadoras de antígenos profesionales, como células dendríticas y macrófagos activados, pero no en células tumorales. La expresión de un CAR que incorpora dominios de señalización CD28 y/o 4-1BB en las células T CD4⁺ mejora la actividad y la potencia antitumoral de esas células en comparación con las que expresan un CAR que contiene solo el dominio de señalización CD3ζ. Preferiblemente, los CAR de la invención contienen dominios de señalización tanto CD28 como 4-1BB.

Para que el CAR se dirija a las células tumorales, contienen una molécula de unión extracelular que se une a un marcador de superficie tumoral y preferiblemente se une específicamente a una molécula de superficie tumoral única. Algunos cánceres expresan o sobreexpresan moléculas del sistema inmunológico. Los gliomas, por ejemplo, expresan receptores de IL13 y, en particular, receptores de IL13 de alta afinidad. Sin embargo, a diferencia del complejo

trimolecular del receptor de IL13 utilizado por el sistema inmunitario (que consta de IL13R α 1, IL4R β y γ c), las células de glioma sobreexpresan una cadena única de IL13R α 2 capaz de unirse a IL13 independientemente del requisito de IL4R β o γ c44. Al igual que su homólogo IL4, IL13 tiene actividad inmunorreguladora pleotrópica fuera del SNC. Tanto la IL13 como la IL4 estimulan la producción de IgE por los linfocitos B y suprimen la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos.

Los estudios detallados que utilizan autorradiografía con IL13 radiomarcada han demostrado una unión abundante de IL13 en casi todos los tejidos de glioma maligno estudiados. Esta unión es muy homogénea dentro de las secciones tumorales y en el análisis de células individuales. Sin embargo, el análisis de sonda molecular específico para ARNm de IL13R α 2 no detectó la expresión del receptor específico de glioma por elementos cerebrales normales y la autorradiografía con IL13 radiomarcada tampoco pudo detectar la unión específica de IL13 en el SNC normal. Estos estudios sugieren que el receptor IL13R α 1/IL4 β / γ c compartido no se expresa de forma detectable en el SNC normal. Por lo tanto, IL13R α 2 es una diana de la superficie celular muy específico para el glioma y es una diana muy adecuada para esta invención. Los expertos conocen otras dianas adecuadas para los CAR, que se expresan o sobreexpresan en las células que se van a dirigir y preferiblemente no se expresan, o se expresan en un grado mucho menor, en otras células. Otro ejemplo de una diana específica de tumor adecuada para dirigirse con CAR es el receptor de IL3 (IL3R; por ejemplo, expresado en células de leucemia mieloide aguda (AML).

Sin embargo, la unión de citotoxinas basadas en IL13 al complejo receptor IL13P α 1/IE4 β / γ c ampliamente expresado tiene el potencial de mediar toxicidades no deseadas en tejidos normales fuera del SNC y, por tanto, limita la administración sistémica de estos agentes. Una sustitución de aminoácidos en la hélice A de IL13 alfa en el aminoácido 13 de la tirosina por el ácido glutámico nativo reduce selectivamente la afinidad de IL13 por el receptor de IL13R α 1/IL4 β / γ c. Sin embargo, la unión de este mutante (denominado IL13 (E13Y) a IL13R α 2 aumentó 50 veces en relación con la IL13 de tipo silvestre. Por lo tanto, este análogo de IL13 mínimamente alterado aumenta simultáneamente la especificidad y afinidad de IL13 por las células de glioma. Por lo tanto, la invención emplea una IL13 que contiene una mutación en el aminoácido 13. Sin embargo, la IL13 que tiene la secuencia natural también puede usarse y puede ser útil, particularmente en situaciones en las que las células T modificadas deben administrarse localmente, como por inyección directamente en una masa tumoral.

Un tipo preferido de CAR para dirigirse específicamente a tumores que expresan IL13R α 2 se compone de una citoquina mutante de IL13 extracelular en la que la proteína IL13 contiene una sustitución de tirosina por el ácido glutámico natural en el aminoácido 13 de la proteína (denominado IL13 (E13Y) aquí), conectado a una región de soporte del dominio Fc bisagra de IgG₄ humana que se fusiona con un dominio transmembrana de CD4 y una secuencia de señalización de CD3 ζ citoplásmica. Vea la Figura 1, lado izquierdo. Este CAR se denomina en el presente documento "IL13 ζ CAR". Cuando este CAR también contiene los dominios de señalización CD28 y 4-1BB, se denomina IL13-CD28-41BB ζ . Vea la Figura 1, lado derecho.

Un inmunorreceptor de acuerdo con la presente invención se puede producir por cualquier medio conocido en la técnica, aunque preferiblemente se produce usando técnicas de ADN recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican las diversas regiones del receptor quimérico se pueden preparar y ensamblar en una secuencia codificante completa mediante técnicas estándar de clonación molecular conocidas en la técnica (cribado de colecciones genómicas, PCR, ligación asistida por cebadores, mutagénesis dirigida al sitio, etc.) como sea conveniente. La región codificante resultante se inserta preferiblemente en un vector de expresión y se usa para transformar una estirpe celular huésped de expresión adecuada, preferiblemente una estirpe celular de linfocitos T, y lo más preferiblemente una estirpe celular de linfocitos T autólogos.

Brevemente, se puede construir un CAR IL13 ζ usando métodos conocidos como sigue. El ADN mutante de IL13 IL13 (E13Y) puede sintetizarse mediante PCR con cebadores basados en la secuencia conocida de ARNm de IL13. La secuencia completa del gen IL13 se describe en Smernov et al., "Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization". Gene 155: 277-281, 1995, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia. La síntesis de novo de IL13 (E13Y) se realizó usando el cebador directo IL13P1 y cuatro cebadores inversos, IL13P2, IL13P3, IL13P4 e IL13P5, que se muestran en la Tabla I, a continuación, y en la Figura 2. Esta secuencia mutante de IL13 puede modificarse luego para que contenga una secuencia líder 5', si se desea. Un ancla transmembrana tal como la transmembrana IgG₄-CD4 humana (IgG₄-CD4_{tm}) y las secuencias citoplásmicas de la cadena zeta de CD3 (CD3 ζ) también se pueden añadir al extremo 3' mediante técnicas de fusión por PCR o cualquier método conveniente. La secuencia completa de IL13 ζ se muestra en la Figura 3 como ejemplo de la invención. Se pueden usar los mismos métodos para construir moléculas equivalentes usando diferentes elementos de reconocimiento. A continuación, la construcción final se puede ligar en cualquier vector de expresión de plásmido adecuado. Un vector de expresión de plásmido preferido es pMG (disponible de Invivogen™).

El CAR que contiene IL13 (E13Y) dirige específicamente a las células T para que se dirijan al receptor de IL13 α 2 (denominado aquí IL13R α 2) que expresan células de glioma, células de carcinoma renal y células de cualquier cáncer que exprese IL13R α 2 de una manera independiente de MHC. Se generaron efectores de células T CD4⁺ antitumorales para ser redirigidos para reconocer células tumorales usando un CAR que contiene los dominios de señalización derivados de CD3- ζ , CD28 y 4-1BB. Se transfeció el CAR de IL13 ζ o IL13-CD28-41BB ζ en células T primarias humanas usando un vector plasmídico no viral (pEK) y métodos de electroporación (Nucleofector Technology_ de

Amaxa Biosystems_, Gaithersburg, MD). Se compararon las células T CD4⁺ que expresan CAR (IL13ζ o IL13-CD28-41BBζ) en cuanto a su potencial para activar vías de señalización asociadas al efector, producir citocinas, lisar células diana y controlar el crecimiento tumoral in vivo. Los resultados mostraron que la adición de los dominios de señalización CD28 y 4-1BB a IE13ζ mejora las funciones efectoras antitumorales de las células T CD4⁺ que expresan las células T CAR Efectoras que expresan el inmunorreceptor IL13-CD28-41BBζ fueron capaces de mediar señales coestimuladoras a través de JNK, p38 y AKT quinasa en el entorno tumoral donde se esperaría que la coestimulación fuera limitante. La coestimulación forzada en las células T CD4⁺ primarias humanas apoya la polarización de estas células a un fenotipo Th₁ de una manera que se asocia con una eficacia antitumoral sostenida tanto in vitro como in vivo. Se demostraron las señales efectoras posterior del CAR en las células T CD4⁺. Estas señales efectoras se correlacionaron con el sesgo Th₁ observado y la actividad efectora antitumoral prolongada de estas células tanto in vitro como in vivo.

La señalización de CD3ζ por sí sola impulsa la activación de ERK. Esto se correlaciona bien con el hallazgo aquí de que la actividad de ERK no aumenta en las células que expresan IL13-CD28-41BBζ en comparación con los controles que expresan IL13ζ (ambos CAR contienen el dominio de señalización de CD3ζ). La coestimulación de CD3 con CD28 impulsa la activación de JNK y p38; La coestimulación de CD3 mediada por 4-1BB también implica la activación de JNK. Tanto JNK como p38 desempeñan funciones principales en la conducción de las respuestas inmunitarias polarizadas en Th₁ por las células T CD4⁺, incluida su producción de IL2, IFN-γ y TNF-α. La activación de la cinasa AKT, otro componente de señalización descendente tanto de CD28 como de 4-1BB, también participa en la regulación al alza de IL2 e INF-γ, pero no de las citocinas Th₂. La asociación de un fenotipo Th₁ pronunciado (ver ejemplos a continuación) con una inducción mejorada de JNK y p38 MAP quinasa y activación sostenida de ATK (ver ejemplos a continuación) en células T que expresan IL13-CD28-41BBζ indica claramente que CD28 y 4-1BB los restos de señalización trabajan con el dominio de señalización de CD3ζ en este receptor quimérico para retener la capacidad de transducir las vías de señalización posterior normalmente asociadas con estos receptores coestimuladores. Independientemente de cuán fuerte pueda ser el fenotipo Th₁ activado impulsado por señales de dominio coestimulador, la retención y reciclaje de células T CD4⁺ efectoras antitumorales funcionales dentro del microambiente tumoral ayuda en gran medida a lograr la potencia antitumoral.

En comparación con la activación mediada por CD3ζ sola, las células T efectoras CD4⁺ que expresan el CAR IL13-CD28-41BBζ exhibieron actividad MAPK y AKT aumentada/sostenida, producción de citocinas Th₁ regulada al alza y potencia citolítica mejorada contra dianas tumorales. Además, tras la estimulación recursiva con el tumor, las células IL13-CD28-41BBζ⁺ CD4⁺ retuvieron/reciclaron su función lítica mientras que las células IL13ζ⁺ CD4⁺ fueron eficaces, pero antes se volvieron anérgicas/agotadas. Estas observaciones in vitro se correlacionaron con un control in vivo mejorado de xenoinjertos de glioma ortotópico del SNC establecido en ratones inmunodeficientes mediados por células T CD4⁺ expandidas ex vivo transferidas adoptivamente que expresan el CAR coestimulador. Estos estudios, por lo tanto, demuestran el efecto de integrar la coestimulación con eventos de señalización de CD3ζ para activar completamente CD4⁺ células efectoras antitumorales para una función sostenida en el microambiente tumoral.

Las señales coestimuladoras de CD28 y 4-1BB mediadas a través de AKT pueden inhibir la muerte celular inducida por activación a través de la regulación al alza de proteínas antiapoptóticas. La activación mejorada de AKT observada en las células T que expresan IL13-CD28-41BBζ se asoció con un mayor reciclaje de la actividad específica del tumor in vitro, así como un control prolongado del crecimiento del tumor in vivo. Por tanto, el CAR coestimulador puede mejorar la duración y/o la retención de la actividad antitumoral de una manera que puede mejorar significativamente la eficacia clínica de los protocolos de terapia adoptiva.

Los CAR específicos de tumor que contienen sus propios dominios de señalización coestimuladores proporcionan un nuevo enfoque para activar linfocitos T contra una variedad más amplia de tumores sólidos que no expresan estos ligandos coestimuladores. El IL13Rα2, por ejemplo, se ha identificado como un objetivo de la superficie celular sobreexpresado en varios tumores humanos, que incluyen cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario y sarcoma de Kaposi, así como gliomas. Por tanto, las células T que expresan un CAR que contiene una zetaquina IL13 y CD28 y 4-1BB pueden usarse para tratar glioblastomas (glioma) y cualquier cáncer, como los enumerados anteriormente, que tengan la diana IL13 en su superficie.

Los CAR que contienen CD3ζ, CD28 y 4-1BB (y/u otros dominios de señalización coestimuladores) pueden dirigirse a cualquier tumor al incorporar una fracción que se une a una diana tumoral expresada en la superficie celular, por ejemplo, un antígeno. Ejemplos de otros quelantes de diana específicos de tumores incluyen Her2/Neu (ErbB-2), integrina α3, CD20, CD19, EGFRVIII, IL3Ra (CD123), LEA, CD44v6 o cualquier diana específica de un tumor, preferiblemente un tumor sólido que no expresan el dominio de señalización coestimulador que está contenido en el CAR. Por lo tanto, las construcciones para atacar tumores humanos de esta manera pueden incluir aquellas con especificidades para Her2/Neu (ErbB-2), integrina α3, CD20, CD19, EGFRVIII, IL3Ra (CD123), LEA, CD44v6 o cualquier antígeno tumoral específico u otro componente de la superficie celular accesible para unirse mediante un receptor de células T quimérico. Los expertos conocen estos antígenos y receptores tumorales específicos que pueden explotarse para dirigirse a un tumor específico, y conocen los tumores que pueden dirigirse de esta manera.

Las funciones efectoras de las células T CD4⁺ y CD8⁺ pueden activarse a través de estos receptores, por lo tanto, ambos tipos de células T se contemplan para su uso con la invención. Las células T CD8⁺ que expresan los CAR de

IL13 de esta invención pueden usarse para lisar células diana y producir IL2 en presencia de células diana, entre las otras funciones de estas células. La expresión del CAR coestimulador apropiado en cualquiera o ambas células T CD4⁺ y CD8⁺ se usaría para proporcionar la población de células más efectiva para la inmunoterapia adoptiva, que consiste, por lo tanto, en uno o ambas células T citolíticas y auxiliares profesionales que exhiben un aumento y/o largo plazo viabilidad y actividad antitumoral.

Los siguientes ejemplos tienen únicamente el propósito de ilustrar una realización de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Transfección y expresión de receptores quiméricos específicos de IL13R α 2 en linfocitos T humanos primarios.

Para activar tanto el receptor de células T (TCR) como las cascadas de señalización de tipo coestimulador tras la interacción con el antígeno de tumor de glioma IL13R α 2, se integraron elementos de señalización derivados de CD28 y 4-1BB en un receptor de antígeno quimérico de IL13-zetaquina (IL13 ζ) (CAR). El IL13 ζ CAR preferido está compuesto por la muteína extracelular de IL13 (E13Y), bisagra-Fc de IgG₄ humana unida al CD3 ζ citoplásmico humano a través del dominio transmembrana del CD4 humano. Ver figura 1. La síntesis de novo de la secuencia codificante de IL13 (E13Y) se realizó utilizando los cebadores IL13P1, IL13P2, IL13P3, IL13P4 e IL13P5. Consulte la Tabla 1, a continuación, y la Figura 2. La secuencia final (417 pb) se digirió en los extremos con EcoRI-BamHI y se ligó en el plásmido pSK (Stratagene™) como ligación 312#3. La ligadura 312#3 se mutagenizó (kit Stratagene™, según las instrucciones del fabricante) para reparar un nucleótido eliminado usando los cebadores IL13 312#3 mut5-3 e IL13 312#3 mut3-5 y la ligadura 312#3 como plantilla, para formar la ligadura 348#1 (IL13 ζ /pSK).

La secuencia codificante del péptido señal de la cadena alfa de GM-CSFR humana (hsp) se fusionó con el extremo 5' de IL13 (E13Y) mediante extensión de solapamiento de empalme de PCR estándar. La secuencia de hsp se obtuvo a partir de la ligación de plantilla 301#10 (hsp/pSK) usando los cebadores 5': 19hsp5' y 3': hsp-IL13FR. Véase la Tabla 1. La secuencia de IL13 se obtuvo utilizando los cebadores 5': hsp-IL13FF y 3': IL13-IgG4FR, y la ligación 312#3 como plantilla. Ver Tabla 1.

Se fusionó una secuencia que codifica las regiones citoplasmáticas de IgG4 Fc, CD4 transmembrana y CD3 ζ (IgG4m: zeta; nucleótidos 421-1512 de la secuencia completa de IL13 ζ de la Figura 3 (SEQ ID NO: 12)) al extremo 3' de la secuencia de fusión de péptido señal humano-IL13 usando los mismos métodos. La secuencia IgG4m: zeta se obtuvo usando los cebadores 5': IL13-IgG4FF y 3': ZetaN3' (ver Tabla 1), usando la secuencia R9.10 (IgG4mZeta/pSK) como plantilla. La secuencia IgG4m: zeta de 1119 pb se fusionó con la secuencia de fusión hsp-IL13 utilizando las secuencias respectivas como plantillas, y los cebadores 5': 19hsp5' y 3': ZetaN3' (ver Tabla 1), para producir una secuencia de fusión bp hsp- IL13-IgG4m: zeta. Los extremos se digirieron con XbaI-NotI y se ligaron en pSK como ligación 351#7, para crear el plásmido IL13 ζ /pSK (4464 pb) (es decir, la secuencia de IL13 ζ de la Figura 3, dentro del vector de clonación pSK).

Se creó un vector de expresión que contiene la secuencia codificante de IL13 ζ digiriendo IL13 ζ /pSK con XbaI-NotI y creando extremos romos con Klenow, y ligando el fragmento resultante en el plásmido pMG^APac (Invitrogen_) (preparado primero abriéndolo con SgrAI, despuntar con Klenow y desfosforilación con SAP), para producir el plásmido IL13 ζ /pMG. La región de resistencia a higromicina de IL13 ζ /pMG se eliminó mediante digestión con NotI-NheI y se reemplazó por la fusión de selección/suicidio HyTK, obtenida del plásmido CE7R/HyTK-pMG por digestión con NotI-NheI, para crear el vector de expresión IL13 ζ /HyTK-pMG (6785 pb). Este plásmido comprende el promotor del factor de elongación humano-la (hEF1p) en las bases 6-549, la secuencia codificante de IL13 ζ en las bases 690-2183, la señal de poliadenilación tardía del virus Simian 40 (Late SV40pAN) en las bases 2230-2498, un origen de replicación de E. coli (Ori ColE1) en las bases 2499-3245, un poli A sintético y un sitio de pausa (SpAN) en las bases 3246-3432, el potenciador/promotor inmediato-temprano de CMV (h CMV-1Aprom) en las bases 3453-4075, la fusión de la región codificadora de timidina quinasa de resistencia a higromicina (HyTK) en las bases 4244-6319, y la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino y una pausa de transcripción (BGh pAN) en las bases 6320-6618. El plásmido tiene un sitio de linealización PacI en las bases 3233-3240. Los elementos hEF1p, SV40pAN tardío, ori ColE1, SpAn y hCMV-1Aprom se derivaron del plásmido parental pMG^APac. En resumen, IL13 ζ /HyTK-pMG es un esqueleto pMG modificado, que expresa el gen IE13 ζ del promotor hEF1 y la fusión HyTK del promotor hCMV-1A. Un mapa del plásmido IL13 ζ /HyTK-pMG aparece en la Figura 4. La secuencia de ácido nucleico completa del plásmido se muestra en las Figuras 5A-5L (SEQ ID NO: 13 y 14. La secuencia del inserto IL13 ζ también se proporciona en la Figura 3 (SEQ ID NO: 5 y 6).

La evaluación de la integridad de la construcción expresada se confirmó mediante transferencia Western usando el clon 8D3 de anticuerpo monoclonal anti-CD3 ζ humano (BD PharMingen™, San Diego, CA) para sondar lisados de células completas derivados de transfectantes estables de células T Jurkat cocultivados en la presencia o ausencia de tunicamicina, un inhibidor de la glicosilación. Se obtuvieron transfectantes estables de células T Jurkat (estirpe en volumen Jurkat-IL13-pMG) por electroporación de células T Jurkat con el vector de expresión IL13 ζ /HyTK-pMG, seguido de selección y expansión de transfectantes positivos. Se sembraron 2 x 10⁶ células de la estirpe en volumen Jurkat-IL13-pMG por pocillo en una placa de 24 pocillos con o sin 5 μ g/ml, 10 μ g/ml o 20 μ g/ml de tunicamicina. La

placa se incubó a 37 °C durante 22 horas. Se recolectaron células de cada pocillo, y cada muestra se lavó con PBS y se resuspendió en 50 µl de tampón RIPA (PBS, NP40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0.5 %, SDS al 0.1 %) que contenía inhibidor de proteasa (1 tableta/10 ml de cóctel completo de inhibidor de proteasa). Las muestras se incubaron en hielo durante una hora, antes de centrifugarlas a 4 °C durante 20 minutos a 14.000 rpm. Se recolectaron muestras de sobrenadante de lisado centrifugado y se hirvieron en un volumen 1: 3 de tampón de muestra en condiciones reductoras, luego se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12 %. Después de la transferencia a nitrocelulosa, la membrana se bloqueó en una solución Blotto™ que contenía leche desnatada en polvo al 4 % en T-TBS (Tween 20 al 0.1 % en solución salina tamponada con Tris pH 8.0) durante 1 hora. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal primario anti-CD3ζ humano de ratón a una concentración de 0.5 µg/ml durante una hora, se lavó y luego se incubó con una dilución 1: 3000 (en solución Blotto™) de anticuerpo secundario IgG alcalina anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa (kit Bio-Rad™ ImmunoStar™) durante 1 hora. Antes del revelado, la membrana se lavó 4 veces más en T-TBS y luego se incubó con 3 ml de solución de sustrato de fosfatasa (Kit Bio-Rad™ ImmunoStar™) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se cubrió con una carpeta de revelado de plástico (Tropix™) y se expuso a una película de rayos X. De acuerdo con el patrón de glicosilación conocido de la IL13 humana de tipo silvestre, la movilidad electroforética de la zetaquina IL13 (E13Y) expresada indica una proteína muy glicosilada que, cuando se expresa en presencia de tunicamicina, se reduce a una cadena principal de aminoácidos de aproximadamente 54 kDa.

La construcción del CAR coestimulador se inició con una construcción HyTK-2A-IL13ζ-pcDNA3.1 (+), que codifica el gen de fusión de selección/suicidio HyTK, el péptido 2A de la enfermedad de fiebre aftosa autoescindible sintetizada de novo (TCTAGAGGAGCATGCCAGCTGTTGAATTTTGACCTTCTTAAGCTTGCGGGAGACGTC GAGTCCAACCCTGGGCC; SEQ ID NO: 49), y la molécula IL13ζ (Figura 3), clonada en pcDNA3.1 (+) (Invitrogen™). Para conferir resistencia al metotrexato (MTX), el gen HyTK se reemplazó por PCR con un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (amplificado a partir de una genoteca de ADNc derivada de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que habían sido estimuladas durante tres días con el anticuerpo OKT3 que reconoce la cadena CD3 del receptor de células T que contenía mutaciones L22F y F33S generadas usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange™ (Stratagene™). La construcción DHFRdm-2A-IL13ζ resultante se cortó luego con NheI y NotI, se eluyó y se ligó en el vector de expresión de plásmido de mamífero digerido de manera similar pEK. El vector pEK se había modificado originalmente a partir de pcDNA3.1 (+) eliminando el promotor de CMV y el gen de ampicilina y reemplazándolos con el gen del promotor del factor de elongación 1α humano (EF1p) derivado de pMG (Invitrogen™) para crear el plásmido DHFRdm-2A-IL13ζ_pEK (pJ01275-9). El cDNA CD28 se compró de Invitrogen™ y la región codificante 4-1BB se amplificó mediante PCR a partir de una genoteca de cDNA derivada de p células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que habían sido estimuladas durante tres días con el anticuerpo OKT3 (usando los cebadores 41BB5' y 41BB3', ver Tabla 1).

Las regiones de señalización intracelular de CD28 y 4-1BB (aminoácidos 180-220 y 214-255, respectivamente, de las secuencias nativas de CD28 y 4-1BB) se fusionaron mediante PCR (utilizando los cebadores CD4-CD28F, CD28-4-1BBR, CD28-4-1bbF y 41bb93 proporcionados en la Tabla 1) en la unión entre las regiones transmembrana CD4 y CD3ζ citoplásmica (aminoácidos 52-164 de CD3ζ nativa). Véase la Figura 6, que proporciona representaciones esquemáticas de ejemplos de construcciones de plásmidos lineales IL13ζ (Figura 6A) e IL13-CD28-41BBζ (Figura 6B). En Figura 6 se indica la ubicación de la muteína IL13 humana (E13Y), la bisagra-Fc de IgG4 humana (IgG4), la transmembrana CD4 humana (tm), los segmentos citoplásmicos CD3ζ humanos (Zeta), citoplásmicos CD28 (28c) y citoplásmicos 4-1BB (BBc). Los sitios de enzimas de restricción que se usaron para insertar los diferentes fragmentos de PCR también se indican en la Figura 6 (Nhe I, Kpn I, Nsi I, Not I), con sus ubicaciones de pares de bases previstas entre paréntesis. Como se muestra en la Figura 6A, el CAR, IL13-CD28-41BBζ, comprende el dominio citoplásmico de CD28 y 4-1BB fusionado al de CD3ζ. Cada construcción mostrada en la Figura 6A tiene un dominio huIL13 que contiene la mutación E13Y que lo hace específico de IL13Rα2, un dominio bisagra-Fc de IgG4 humana (huy4 Fc), un dominio transmembrana de CD4 humano (huCD4tm) y un dominio citoplásmico de CD3ζ humano (cyt de huCD3ζ); el CAR de IL13-CD28-41BBζ tiene los dominios de señalización (sig) de CD28 y 4-1BB insertados entre los dominios transmembrana de CD4 y citoplásmicos de CD3ζ. Los cebadores de PCR utilizados en la construcción de los plásmidos y utilizados en el análisis de expresión se proporcionan en la Tabla 1.

Los cultivos en volumen de células T CD4+ obtenidos por separación MACS™ usando el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec™ Inc.) se mantuvieron en medio RPMI con FCS al 10 %, L-glutamina al 1 %, tampón HEPES al 2.5 %, 50 U/ml rIL2, 10 ng/ml de rIL15 y MTX 0.1 µM. El aislamiento, activación y electroporación de células T humanas se realizó como sigue. Se aislaron PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech™) de sangre periférica heparinizada obtenida de donantes sanos que dieron su consentimiento. Las células se resuspendieron en solución de nucleofección usando el kit Nucleofector de células T humanas Amaxa™ (Amaxa™ Inc.). Se añadió plásmido (1 µg/5 x 10⁶ células) y las células se electroporaron usando Amaxa™ Nucleofector I (Amaxa™ Inc.), programa U-14. Luego, las células se recolectaron en medio sin rojo fenol con FCS al 10 %, se dejaron reposar durante la noche y luego se estimularon con 30 ng/ml de OKT3 y 5 ng/ml de rIL15 en RPMI con 10 % de FCS durante tres días. Los transfectantes exitosos se seleccionaron usando medios que contenían MTX 0.1 µM y rIL15 5 ng/ml.

La expresión de CAR se evaluó mediante análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo específico para CD3ζ. Los lisados de células completas de células T CD4+ seleccionadas por MTX en volumen (transfectadas con IL13ζ e

IL13-CD28-41BBζ) se analizaron para determinar la expresión de CAR (CD3ζ quimérico) utilizando métodos conocidos y un anticuerpo monoclonal específico de anti-CD3ζ humano de ratón disponible comercialmente, 1D3. Como era de esperar con proteínas tan altamente glicosiladas, se observaron múltiples bandas dentro de los pesos moleculares esperados. Ver figura 7.

5 Los niveles de IL13ζ o IL13-CD28-41BBζ CAR expresados en la superficie de las células T CD4⁺ se examinaron mediante la detección de IL13 unida a la membrana usando citometría de flujo. Ver figura 8. Las PBMC transfectadas con ADNc que codifica IL13ζ o IL13-CD28-41BBζ CAR se propagaron durante un promedio de 10 semanas en concentraciones selectivas de MTX (0.1 μM), se clasificaron magnéticamente para detectar células CD4⁺ mediante separación MACS™ y se examinaron para determinar la expresión superficial de IL13 que contienen CAR (ejes Y) y CD4, CD8, TCRα/β o CD28 (ejes X) como se indica. Se utilizaron mAb fluorescentes emparejados por isotipo para establecer los cuadrantes. Estas poblaciones de células T genéticamente modificadas no solo eran predominantemente CD4⁺ y CD8⁻, como se esperaba después de la purificación MACS™ basada en perlas magnéticas de células CD4⁺, sino que también expresaban niveles altos y equivalentes de TCR endógeno y niveles bajos a indetectables de CD28 coestimulador. Ver figura 8.

20 La estirpe diana de células tumorales de glioblastoma humano IL13Ra2⁺ usada en estos estudios, U87, también fue fenotipada para confirmar que esas células expresan MHC clase I y clase II en su superficie y no expresan los ligandos coestimuladores CD80/86 o 4-1BBL. Consulte la Figura 9, que muestra la tinción de la superficie de las moléculas de MHC HLA-A2 y HLA-DR, IL13R y las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD137-L (4-1BBL) (histogramas llenos) como se indica, en comparación con los controles de isotipo (histogramas abiertos) en células diana de glioma U87, analizadas por citometría de flujo.

25 El análisis de citometría de flujo implicó evaluar la expresión de la superficie celular de las construcciones IL13-CAR mediante tinción con anticuerpos monoclonales anti-IL13 humana conjugados con PE o conjugados con FITC (BD PharMingen™). El fenotipo de la superficie celular de los transfectantes primarios de células T humanas se ensayó con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-TCR α/β conjugados con FITC o con anticuerpos anti-CD28 conjugados con PE (BD PharMingen™). El fenotipo de la superficie celular de las células de glioma U87 humano se analizó con anticuerpos anti-HLA-A2, anti-HLA-DR y anti-CD80 conjugados con FITC, o con anti-CD86 y anti-CD137-L conjugados con PE (4-1BBL), en comparación con los controles de isotipo conjugados con FITC y PE (BD PharMingen™). La expresión de IL13Ra2 se ensayó usando anti-IL13Ra2 humano de cabra (R&D Systems™) seguido de IgG anti-cabra de ratón conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch™).

Tabla 1. Cebadores PCR para construcción de CAR.

Nombre de cebador	Secuencia de cebador (5'-3')	SEQ ID NO:
IL3P1	TATGAATTCATGGCGCTTTTGTGACCACGGTCATTGCTCTCACTTGCC TTGGCGGCTTTGCCTCCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAG GTAC	17
IL3P2	GTTGATGCTCCATACCATGCTGCCATTGCAGAGCGGAGCCTTCTGGTT CTGGGTGATGTTGACCAGCTCCTCAATGAGGTACCTGAGGGCTGTAGA GGGAG	18
IL3P3	CTCTGGGTCTTCTCGATGGCACTGCAGCCTGACACGTTGATCAGGGAT TCCAGGGCTGCACAGTACATGCCAGCTGTCAGGTTGATGCTCCATACC ATGC	19
IL3P4	CCTCGATTTTGGTGTCTCGGACATGCAAGCTGGAAAAGTCCAGCTG AGACCTTGTGCGGGCAGAATCCGCTCAGCATCCTCTGGGTCTTCTCGA TGGC	20
IL3P5	TCGGATCCTCAGTTGAACCGTCCCTCGCGAAAAAGTTTCTTTAAATGT AAGAGCAGGTCTTTACAAACTGGGCCACCTCGATTTTGGTGTCTCGG	21
IL13 312#3 mut5-3	CAACCTGACAGCTGGCATGTAAGTGTGCAGCCCTGGAATC	22
IL13 312#3 mut3-5	GTTGGACTGTGACCGTACATGACACGTCGGGACCTTAG	23
5': 19hsp5'	ATCTCTAGAGCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTC	24
3': hsp-IL13FR	GAGGGAGGCACAGGGCCTGGGATCAGGAGGAATG	25
5': hsp-IL13FF	CATTCCTCCTGATCCCAGGCCCTGTGCCTCCCTC	26

3': IL13-IgG4FR	GGGACCATATTTGGACTCGTTGAACCGTCCCTCGC	27
5': IL13-IgG4FF	GCGAGGGACGGTTCAACGAGTCCAAATATGGTCCC	28
3': ZetaN3'	ATGCGGCCGCTCAGCGAGGGGGCAGG	29
41BB5'	A TCGAA TTCGCCGCCACCA TGGGAAACAGCTGTT ACAAC	30
41BB3'	GATAAGCTTATCGATTCACCACATCCTCCTTCAGTT	31
CD4-CD28F	CATTGGGCTAGGCATCTTCTTCAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC	32
CD28-4-1BBR	GTTTCTTTCTGCCCCGTTTGCCACCTCCGGAGCGATAGGCTGCGAAG	33
CD28-4-1BBF	CTTCGCAGCCTATCGCTCCGGAGGTGGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC	34
4-1BB93'	GTTGCGGCCGCTCACAGTTCACATCCTCCTTCTTCTTC	35

Ejemplo 2. Potenciación de la señalización de JNK y p38 MAPK con señalización sostenida de AKT por IL13-CD28-41BBζ.

- 5 Se sabe que las células T estimuladas por el acoplamiento del complejo TCR-CD3 junto con los receptores auxiliares CD28 o 4-1BB controlan señales a través de AKT así como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Para investigar la capacidad de los CAR coestimuladores para influir en estas vías efectoras descendentes, se utilizaron ensayos de quinasas in vitro para evaluar y comparar la actividad de los miembros de la familia AKT y MAPK ERK, JNK y p38 en IL13ζ- e IL13-CD28-41BBζ que expresan células T CD4⁺ después de la participación de las células diana U87. La línea de glioma humano, U87, se obtuvo de ATCC (Rockville, MD). Todas las líneas tumorales son adherentes y se cultivaron en DMEM (Irvine Scientific™) complementado con FCS inactivado por calor al 10 %, HEPES 25 mM y L-glutamina 2 mM. Se incubaron células T CD4⁺ que expresan IL13ζ o IL13-CD28-41BBζ CAR con células de glioma U87 durante los tiempos indicados en la Figura 10 antes del ensayo.
- 10
- 15 Después de estimular las células T CD4⁺ que expresan IL13ζ o IL13-CD28-41BBζ con células diana tumorales durante hasta 48 horas (Figura 10A) o 72 horas (Figura 10B), los niveles de la proteína total JNK, p38 y AKT Los sustratos (es decir, cJun, ATF2 y GSK3, respectivamente) y los sustratos fosforilados (P-cJun, P-ATF2 y P-GSK3, respectivamente) se midieron mediante inmunotransferencia Western. El aumento de veces en la fosforilación de cada sustrato, como medida de la actividad quinasa, se indica en la parte inferior de cada grupo en la Figura 10.
- 20
- Se realizó un ensayo de quinasa en estado sólido no radiactivo usando un método modificado de Hibi et al., "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain". Genes Dev. 7: 2135-2148, 1993. Usando lisados de células T que se habían separado de las células diana mediante centrifugación suave (1000 rpm, < 3 minutos), la quinasa seleccionada se inmunoprecipitó durante la noche a 4 °C usando anticuerpos específicos para ERK1/2, JNK, p38 y AKT (Cell Signalling Technology Inc.™). Los complejos inmunoprecipitados se lavaron en tampón de lisis (PBS con NP40 al 1 %, SDS al 0.1 % y desoxicolato de sodio al 0.5 %) y tampón de quinasa (Tris 25 mM, pH 7.,5, que contenía MgCl₂ 10 mM y EGTA 2 mM), y se realizó el ensayo a 30 °C durante 30 minutos, usando 1 μg de sustrato en presencia de ATP 10 μM.
- 25
- 30 Proteínas de fusión de glutatión S transferasa (GST): GST-ELK, GST-ATF2 y GST-GSK3β (Cell Signaling Technology™ Inc.) y GST-cJun (1-79) (como se describe en Chang et al., Cell 124: 601-613, 2006) como sustratos para los ensayos de quinasa ERK, p38, AKT y JNK, respectivamente. Los productos resultantes se resolvieron en NuPAGE™ al 12 % (Invitrogen™) de acuerdo con métodos estándar y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el Xcell II Blot Module™ (Invitrogen™). Las transferencias se sondaron con anticuerpos para fosfo-ELK, ATF2, cJun y GSK3β (Cell Signaling Technology™ Inc.) para detectar proteínas de fusión GST fosforiladas y anticuerpos para GST (BD PharMingen™) para detectar la cantidad total de sustrato. A continuación, las inmunotransferencias se incubaron con anticuerpos específicos de inmunoglobulina de conejo conjugados con IRDye 680 o de ratón conjugados con IRDye800 (LI-COR™). Se usó tampón de bloqueo (adquirido de LI-COR™) para pretratar las transferencias y para la dilución de anticuerpos. Las transferencias se visualizaron y registraron utilizando un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey™ (LI-COR™) y las intensidades de banda se cuantificaron utilizando el software Odyssey™ v2.0 (LI-COR™). La fosforilación del sustrato, una medida de la actividad quinasa, se cuantificó y normalizó a las cantidades detectadas correspondientes de quinasa inmunoprecipitada y sustrato quinasa total. La actividad quinasa relativa de las células T IL13ζ⁺ CD4⁺ en t = 0 recibió un valor arbitrario de 1.0; los guiones (-) indican diferencias de multiplicidad < 1.0 (ver Figura 10).
- 35
- 40
- 45
- El ensayo de quinasa fue capaz de detectar actividad mejorada de JNK y p38 MAPK y actividad prolongada de quinasa de AKT en células T IL13-CD28-41BBζ⁺ CD4⁺ después de cocultivo con células de glioma U87. Como se muestra en la Figura 10, la activación de JNK y p38 fue más fuerte en las células T CD4⁺ que expresan IL13-CD28-41BBζ que en las que expresan IL13ζ. Ver figura 10. Por el contrario, la activación de otra MAPK, ERK, fue comparable entre los dos tipos de células. La activación de AKT se observó en ambas poblaciones de células T, pero se elevó solo hasta 24
- 50

horas en las células IL13 ζ ⁺ mientras que las células IL13-CD28-41BB ζ ⁺ mostraron una actividad de AKT elevada durante hasta 72 horas o más. Vea la Figura 10B. Por tanto, ambos CAR fueron eficaces, pero los dominios coestimuladores dentro del CAR de IL13-CD28-41BB ζ produjeron una actividad de AKT más sostenida en comparación con la observada con el CAR de IL13 ζ .

5 Ejemplo 3. Las señales de coestimulación refuerzan la polarización Th₁ de los efectores CD4⁺ redirigidos por el tumor.

Debido a que se ha detectado actividad de p38 en células Th₁ pero no en células Th₂, y se sabe que la activación de JNK/p38 induce la producción de Th₁ de citocinas de TNF- α e IFN- γ asociadas, el efecto de la función coestimuladora de CD28 y 4-1BB en CAR Se investigó la inducción mediada por las citocinas asociadas a Th₁. Se cocultivaron células T CD4⁺ genéticamente modificadas (10⁶ células) que expresan IL13 ζ o IL13-CD28-41BB ζ en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos con diferentes células estimulantes (5 x 10⁵ células) en 2 ml de medio de cultivo. Las células estimuladoras fueron células de glioma U87 (U87), células de mieloma de ratón NS0 parentales (NS0), células NS0 que expresan de manera estable IL13R α 2 de superficie (NS0-IL13R α 2) o células NS0 que expresan de manera estable OKT3 unido a membrana (NS0-OKT3) como se indica en la Figura 11A.

Se usó RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para medir los niveles relativos de ARNm después del cultivo. Para el análisis de la expresión génica, se aisló el ARN celular total de los transfectantes de células T CD4⁺ usando un kit RNeasy[™] (Qiagen[™]). Se utilizó transcripción inversa de 5 μ g de ARN total en un volumen de 30 μ l (que contiene 1x de tampón de transcriptasa inversa, oligo dT 2.5 mM, dNTP 0.25 mM, ditiotreitól 0.01 M, 20 U de Rnasina y 200 U de SuperScript[™] II RNasa H⁻ transcriptasa inversa (Invitrogen[™])) para sintetizar ADNc. Las muestras se incubaron a 42 °C durante 1 hora y luego se inactivó la transcriptasa inversa calentando 5 minutos a 70 °C. El ADNc resultante, equivalente a 0.2 μ g de ARN total, se sometió a análisis de qPCR utilizando la mezcla maestra de PCR SYBR Green[™] (Applied Biosystems[™]) y cebadores diseñados por el sistema de detección de PCR en tiempo real DNA Engine Opticon 2[™] (MJ Research Inc.[™]). Las secuencias de cebadores de los genes analizados IL2 e IFN- γ son las siguientes: IL2 directo: CAAGAATCCCAAACCTACCAG, SEQ ID NO: 50; IL2 inversa: CGTTGATATTGCTGATTAAGTCC, SEQ ID NO: 51; IFN- γ directo: ATCCCAGTAATGGTTGTCTGCCT, SEQ ID NO: 52; IFN- γ inverso: TCTTGCTTAGGTTGGCTGCCTAGT, SEQ ID NO: 53. El valor de umbral de ciclo medio (CT) del ARNm de ciclofilina (como se describe en Chang et al., "The E3 ubiquitin ligase itch couples JAK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover". Cell 124: 601-613, 2006) se utilizó para normalizar los genes probados. Los valores medios de CT se determinaron mediante mediciones de qPCR por triplicado para cada gen en cada condición experimental.

El ARNm total de células T se recogió a las 0 horas (Figura 11A, barras blancas), 7 horas (Figura 11A, barras negras) y 24 horas (Figura 11A, barras sombreadas) para el análisis de qPCR de los ARNm humanos indicados. *indica una p < 0.05 en comparación con los valores de 7 horas de células T CD4⁺ que expresan IL13 ζ utilizando una prueba t de Student no apareada. La línea de mieloma de ratón NS0 se sometió a electroporación con IL13R α 2-IMPDH2_pMG (pJ00659), que confiere expresión del antígeno diana IL13R α 2 y resistencia al ácido micofenólico (MPA) o OKT3-IMPDH2_pcDNA3.1 (+) (pJ01056), que confiere expresión de la molécula de OKT3 reticulante con CD3 (y por tanto estimulante de células T) junto con resistencia a MPA, y luego clonada en presencia de ácido micofenólico (MPA) 6 μ M y seleccionada para expresión del transgén de IL13R α 2 humano. Para los experimentos que utilizan células tumorales U87 y NS0-IL13R α 2, n = 3; para el experimento que usa células tumorales NS0-OKT3 y NS0, n = 1.

Los niveles de ARNm de IL2 e INF- γ fueron mayores en las células T IE13-CD28-41BB ζ - que en las células T IL13 ζ - después del cultivo con células de glioblastoma U87. Vea la Figura 11A. No se observó inducción de ARNm de IL2 o INF- γ con ninguna población de células T cuando se cultivaron conjuntamente con células NS0. La estimulación por células NS0 que expresan el transgén IL13R α 2 restauró la inducción de ARNm de IL2 e INF- γ en IL13-CD28-41BB ζ - pero no en células T que expresan IL13 ζ , lo que indica que los genes de inducción de citocinas eran dependientes de IL13R α 2. Las cantidades relativas de ARNm de IL2 e INF- γ inducidos se correlacionan directamente con los niveles de expresión de superficie de IL13R α 2 en células U87 y células NS0 que expresan transgenes; el nivel de U87 es más alto que el de las células NS0-IL13R α 2. Por el contrario, la inducción de los genes IL2 e INF- γ en las células T IL13 ζ - fue similar a la observada en las células T IL13-CD28-41BB ζ - cuando cada población se cocultivó con células NS0 que expresaban de manera estable OKT3 unido a la membrana, un agonista Molécula de inmunoglobulina que activa las células T mediante la participación de CD3 ϵ . Estos resultados indican que la menor inducción de ARNm de IL2 e INF- γ mediada por el acoplamiento de IL13 ζ con IL13R α 2 no se debe a un defecto intrínseco en estas células T, sino a la falta de dominios coestimuladores de CD28 y 4-1BB dentro del CAR.

Para cuantificar las cantidades de proteínas de citocina Th₁ frente a Th₂ liberadas de estas células T que expresan CAR, se ensayó el contenido de citocinas de los sobrenadantes de estos cocultivos. Después de una incubación de 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de IL13 ζ ⁺ (barras blancas) o IL13-CD28-41BB ζ ⁺ (barras negras) y se analizaron las citocinas Th₁ y Th₂ mediante una matriz de microesferas citométricas múltiples utilizando el kit 17-Plex Panel[™] humano según las instrucciones del fabricante (Laboratorios Bio-Rad[™]). Ver Figura 11B.

El glioma U87 o las células IL13R α 2⁺ NS0 estimularon más liberación de citocinas Th₁ (IL2, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF) y menos liberación de citocinas Th₂ (IL5, IL10 e IL13) de las células T IL13-CD28-41BB ζ - que de las células T IL13 ζ -. Se produjeron niveles equivalentes de citocinas Th₁ y Th₂ mediante células T CD4⁺ que expresan IL13 ζ e IL13-CD28-

41BB ζ cultivadas con células NS0 que expresan OKT3, lo que indica que estas células permanecen sin polarizar tras la activación policlonal mediante CD3 endógena. Los niveles de citocinas eran todos de bajos a indetectables cuando las células T se cultivaron con células NS0 parentales. Los niveles de la citoquina Th₂ IL4 también fueron de bajos a indetectables cuando las células T se cultivaron con cualquiera de las estirpes de células tumorales. En general, estos datos muestran que la presencia de dominios coestimuladores CD28 y 4-1BB dentro del CAR ayudan a impulsar la transcripción de células T CD4⁺ y la secreción de citocinas similares a Th₁.

Ejemplo 4. Aumento de la actividad lítica antitumoral de reciclaje en células T IL13-CD28-41BB ζ - CD4⁺.

Para determinar si el CAR coestimulador afectaba a la actividad citotóxica específica del tumor de las células T CD4⁺, se realizaron ensayos citolíticos luminiscentes (LCA) para detectar la actividad de luminiscencia del transgén de luciferasa de luciérnaga (ffLuc) de células tumorales in vitro. Este ensayo se realizó como lo describen Brown et al., "Biophotonic cytotoxicity assay for high-throughput screening of cytolytic killing". J. Immunol. Meth. 297: 39-52, 2005, con 0.14 mg/ml de D-luciferina y usando un luminómetro Victor2TM. Brevemente, la actividad de luminiscencia del transgén ffLuc de las células tumorales in vitro se analizó mediante LCA con 0.14 mg/ml de D-luciferina (XenogenTM) usando un luminómetro Victor2TM. Consulte la Figura 12A, que muestra una actividad citotóxica mejorada de las células T IL13-CD28-41BB ζ ⁺ CD4⁺ (■) contra los objetivos U87 en comparación con las células T IL13 ζ ⁺ CD4⁺ (○) a la relación E: T indicada después de 4 horas. Se indica la media + EE de valores triplicados; * indica una p < 0.05 utilizando una prueba t de Student para datos no apareados.

Después de 4 horas de cocultivo con células diana U87 transfectadas con ffLuc, las células IL13-CD28-41BB ζ - mostraron una mejora estadísticamente significativa en la actividad lítica en comparación con las células IL13 ζ . Si el cocultivo se extendió a 48 horas, no se observó diferencia en la actividad citotóxica entre las células que expresan IL13 ζ e IL13-CD28-41BB ζ (se alcanzó una lisis específica del 100 % con ambas células). Los datos en la Figura 12B indican lisis específica por ensayo de LCA después de 48 horas de co-cultivo en una relación E: T de 2: 1, y luego nuevamente después de la adición de nuevos objetivos para otras 48 horas de co-cultivo en una relación E: T de 2: 1. Se indica la media + EE de valores triplicados; * indica una p < 0.05 (prueba t de Student pareada) comparando células T IL13-CD28-41BB ζ ⁺ CD4⁺ (barras negras) con células T IL13 ζ ⁺ CD4⁺ (barras blancas) en el cocultivo indicado.

Los niveles de ARNm de perforina y granzima B se regularon positivamente por igual en las células IL13 ζ e IL13-CD28-41BB ζ , lo que sugiere que estas células T que expresan CAR pueden usar mecanismos similares de destrucción. Sin embargo, si se añadieron dianas ffLuc- frescas para una segunda ronda de cocultivo de 48 horas con las mismas células T CD4⁺-T que expresan CAR, las células IL13-CD28-41BB ζ - exhibieron una actividad lítica significativamente mayor que las células IL13 ζ - (Figura 12B). Esto sugiere que el CAR coestimulador afecta de manera beneficiosa la duración y/o el reciclaje de la actividad letal de las células T CD4⁺.

Para examinar más a fondo este fenómeno, se analizó la viabilidad de las células tumorales U87 durante el cocultivo con células T IL13 ζ - o IL13-CD28-41BB ζ - utilizando microscopía de lapso de tiempo de video (VTLM) de cocultivos de 6 x 10⁵ células de glioma U87 adherente con 1.2 x 10⁶ células T CD4⁺ que expresan IL13 ζ o IL13-CD28-41BB ζ . Los cultivos se lavaron 45 horas más tarde y luego se volvieron a cultivar con células de glioma U87 frescas (6 x 10⁵). Se representaron gráficamente los números de células tumorales viables durante 42 horas (la primera destrucción) y de 45 horas a 139 horas (la segunda destrucción). Vea la Figura 12C.

Se tomaron imágenes simultáneamente en una habitación cálida a 37 °C en cuatro microscopios Eclipse TS100TM (NikonTM Inc.), cada uno equipado con una lámpara de tungsteno-halógeno, filtro GIF (verde), condensador ELWD 0.3 NA, Lente objetivo con corrección infinita PhL DL 4x/0.13 Plan FluorTM, adaptador de montura C sin lente D10NLC 1x (Diagnostic InstrumentsTM) y cámara de video CCD de 1/2" RS-170 B/N VCB-3524 (SanyoTM North America Corp.). Para recolectar datos, se añadieron 1.2 x 10⁶ células T (en 200 μ l de solución salina equilibrada de Hank suplementada con albúmina de suero humano al 0.1 %) a matraces T-25 que contenían 6 x 10⁵ células U87 adherentes (sembradas 1 día antes a 3 x 10⁵ células/matraz). Se permitió que los matraces se equilibraran en la platina del microscopio durante 30 minutos antes de la obtención de imágenes. La velocidad de adquisición por lapso de tiempo fue a intervalos de 2 minutos. Se adquirieron varios fotogramas de células tumorales solas en cada video, seguido de la adición de células T. Las células combinadas luego se registraron continuamente durante 80 horas. Después de agregar las células T, cada matraz se gaseó con 5 % CO₂ durante 10 segundos y sellado con parafilm para asegurar un buen control del pH (bicarbonato en HBSS) y un enfoque estable, respectivamente. Las imágenes se adquirieron utilizando el organizador de cámara COH VTLF y se digitalizaron a 640 x 480 píxeles utilizando una placa de captura de fotogramas de 4 canales MatroxTM. Se realizaron recuentos de células tumorales viables a intervalos de \leq 10 horas usando el comando "Recuento manual de objetos" en MetaMorphTM 6.33 (Universal Imaging/Molecular DevicesTM Corp.). Todos los conjuntos de datos se importaron a MetaMorphTM y se guardaron como pilas de MetaMorphTM y películas AVI.

La capacidad de cualquiera de las células T CD4⁺ modificadas genéticamente para destruir células tumorales durante las primeras 42 horas de cocultivo fue sustancialmente la misma (casi el 100 % de las células U87 murieron a las 30 horas). Sin embargo, en el segundo encuentro con las células tumorales U87, las células T IL13-CD28-41BB ζ - recuperadas retuvieron una mayor actividad citolítica que las células T IL13 ζ -. Es importante destacar que la enumeración de las células T antes de la adición de las células U87 por segunda vez reveló que no había diferencias significativas en el número de células. Además, los ensayos basados en CFSE realizados durante 72 horas de

cocultivo con células U87 no revelaron diferencias en la proliferación de células T IL13 ζ o IL13-CD28-41BB ζ - in vitro. Esto demuestra que la mayor actividad citolítica tras la adición de nuevos objetivos no se debió a la presencia de más citolíticos, sino a una mayor capacidad de funcionamiento de los citolíticos individuales. Juntos, estos datos muestran que el CAR coestimulador apoya el reciclaje y la retención de la función de las células T CD4.

5

Ejemplo 5. Aclaramiento de tumores in vivo mejorado por células T IL13-CD28-41BB ζ - CD4⁺.

Se evaluó la capacidad de los CAR con dominios de señalización CD28 y 4-1BB para mejorar la eficacia antitumoral de las células T CD4⁺ usando tumores U87 establecidos en un modelo de xenoinjerto murino ortotópico. Para los estudios in vivo, las células U87 se transfectaron con ffluc-zeocin_pcDNA3.1 (+) (pJ00778, un plásmido que expresa una fusión de proteínas de la enzima luciferasa de luciérnaga y el gen de resistencia al fármaco zeocina) e IL2 (2) _HyTk-pMG (pJ00976, un plásmido que expresa la citoquina IL2 y el gen de fusión de selección/suicidio HyTK) usando oligofectimina (Invitrogen™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y luego clonado en presencia de 0.2 mg/ml de zeocina y 0.1 mg/ml de higromicina.

15

Para producir el modelo de xenoinjerto de glioma ortotópico, los ratones se trataron como sigue. Un día después de la irradiación con 250 rads, se anestesiaron ratones NOD-scid machos de 6 a 8 semanas de edad, se afeitaron e inmovilizaron en un dispositivo de sujeción estereotáctico Cunningham™ Mouse/Neonatal Rat Adapter (Stoelting™). Luego, los ratones recibieron una inyección estereotácticamente guiada de tumor (glioma U87) 2 mM lateral y 0.5 mM anterior a Bregma sobre 3-5 mM. Se inyectaron células tumorales U87-ffLucZeo/IL2 + (2 x 10⁵ células/ratón), suspendidas en 2 μ l de RPMI sin fenol (Irvine Scientific, Irvine, CA) a una profundidad de 2.5 mM desde la dura. Siete días después de la inoculación del tumor, se administraron 10⁶ células T que expresaban IE13 ζ o IE13-CD28-41BB ζ (transferidas adoptivamente) en 2 μ l a las coordenadas del tumor en el cerebro. Los animales de control recibieron solo PBS ("control simulado"). Los orificios de las rebabas se sellaron con cera para huesos y la incisión se cerró con pegamento Nexaband™. Los animales recibieron una inyección subcutánea de 0.1 mg/kg de Buprenex™ para la recuperación posquirúrgica. En este modelo, los tumores comienzan a retroceder espontáneamente a los 13-14 días después de la inyección debido a la recuperación del sistema inmunológico endógeno, por lo que los experimentos se completaron el día 12.

El crecimiento de tumores ortotópicos se puede cuantificar de forma no invasiva controlando las señales de flujo de ffluc derivadas de tumores en células de glioblastoma U87 establecidas que expresan de manera estable luciferasa de luciérnaga (ffLuc) e IL2 humana. La actividad luciferasa in vivo se detectó usando imágenes tumorales biofotónicas in vivo en ratones con el sistema Xenogen™ In Vivo Imaging System (IVIS) como se describió previamente por Kahlon et al. "Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells". Cancer Res. 64: 9160-9166, 2004. Brevemente, para monitorizar el flujo de ffluc, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 4.29 mg de D-luciferina, anestesiados (1.5 L/min de oxígeno + 4 % de isoflurano) y se midió la emisión de luz durante un tiempo de integración de 1 minuto a los 14 minutos después de la inyección de luciferina. El flujo (fotones/segundo) se cuantificó como recuentos totales medidos a lo largo del tiempo en la región de interés. Vea los resultados en la Figura 13. Los valores en el eje Y representan la media \pm DE que pertenece a los niveles de flujo total de tumores ffluc⁺ de los grupos simulados y tratados (n = 6 para cada grupo) en los días indicados después del injerto del tumor. "Tx" indica tratamiento con células T transferidas adoptivamente.

Antes de la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ que expresan CAR, todos los ratones exhibieron niveles crecientes de señales de flujo de ffluc derivadas de tumores como se esperaba (ver Figura 13; comparar los días 2 y 6 después del injerto del tumor). Dos días después de la transferencia adoptiva (Tx), los niveles de flujo de ffluc tumoral se redujeron en los ratones tratados con células T que expresan IL13 ζ o IL13-CD28-41BB ζ , en comparación con los ratones tratados de forma simulada. Sin embargo, 5 días después del tratamiento con células T (día 12 después del injerto), las señales de flujo tumoral en los ratones tratados con células T IL13-CD28-41BB ζ - permanecieron bajas, mientras que las señales de flujo de los ratones tratados con células T IL13 ζ - habían aumentado a un nivel similar a la del grupo tratado de forma simulada (control). Los dominios de señalización coestimuladores de CD28 y 4-1BB mejoraron y/o prolongaron así el control del crecimiento tumoral por las células T genéticamente redirigidas.

Ejemplo 6. Preparación de células T adecuadas para terapia

Se obtuvieron linfocitos T de un paciente mediante leucoféresis, y las células T autólogas se alteraron genéticamente para expresar el CAR, luego se volvieron a administrar al paciente para lograr la terapia anticancerosa.

Para preparar células T IL13 ζ ⁺ adecuadas para uso terapéutico, las células mononucleares se separaron de la sangre sometida a leucoféresis mediante centrifugación sobre Ficoll™ de grado clínico. Las PBMC se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato estéril que contenía EDTA 0.526 mM y luego una vez en PBS estéril, y se suspendieron en medio de cultivo que consistía en RPMI 1640 HEPES, FCS inactivado por calor al 10 % y L-glutamina 4 mM. Las células T presentes en las PBMC del paciente se activaron policlonalmente mediante la adición de Orthoclone™ OKT3 (30 ng/ml) al cultivo. A continuación, los cultivos celulares se incubaron en matraces de cultivo de tejidos T-75 ventilados en la incubadora designada por el sujeto del estudio. Veinticuatro horas después del inicio del cultivo, se añadió rhIL2 a 25 U/ml. Tres días después del inicio del cultivo, se recolectaron PBMC, se centrifugaron y se resuspendieron en tampón de electroporación hipotónica a 20 x 10⁶ células/ml. Se añadieron veinticinco

65

microgramos del plásmido IL13 ζ /HyTK-pMG, junto con 400 μ l de suspensión celular, a una cubeta de electroporación estéril de 0.2 cm. Cada cubeta se sometió a un único pulso eléctrico de 250 V/40 μ s y se incubó de nuevo durante diez minutos a temperatura ambiente. Las células supervivientes se recogieron de cubetas, se agruparon y se resuspendieron en medio de cultivo que contenía 25 U/ml de rIL2. Los matraces se colocaron en la incubadora de cultivo de tejidos designada por el paciente. Tres días después de la electroporación, se añadió higromicina a las células a una concentración final de 0.2 mg/ml. Se cultivaron PBMC electroporadas durante un total de 14 días con medio y suplementación con IL2 cada 48 horas.

La clonación de CTL CD8⁺ resistentes a higromicina de PBMC de pacientes activadas con OKT3 electroporadas se inició el día 14 de cultivo. Brevemente, se agregaron PBMC de pacientes viables a una mezcla de 100 x 10⁶ PBMC alimentadores irradiados criopreservados y 20 x 10⁶ TM-LCL (células linfoblastoides transformadas con EBV que actúan como células alimentadoras) irradiadas en un volumen de 200 ml de medio de cultivo que contiene 30 ng/ml de OKT3 y 50 U/ml de rIL2. Esta mezcla se sembró en placas de 0.2 ml en cada pocillo de diez placas de clonación de 96 pocillos. Las placas se envolvieron en papel de aluminio para disminuir la pérdida por evaporación y se colocaron en la incubadora de cultivo de tejidos designada por el paciente. El día 19 de cultivo, cada pozo recibió higromicina hasta una concentración final de 0.2 mg/ml. Los pocillos se inspeccionaron visualmente en busca de excrecencia celular en un microscopio invertido el día 30 y los pocillos positivos se marcaron para reestimulación.

Los contenidos de cada pocillo de clonación con crecimiento celular se transfirieron individualmente a matraces T-25 que contenían 50 x 10⁶ PBMC irradiadas, 10 x 10⁶ LCL irradiadas y 30 ng/ml de OKT3 en 25 ml de medio de cultivo de tejidos. En los días 1, 3, 5, 7, 9, 11 y/o 13 después de la reestimulación, los matraces recibieron 50 U/mL de rIL2 y 15 ml de medio fresco cuando fue necesario. El día 5 del ciclo de estimulación, los matraces también se suplementaron con higromicina 0.2 mg/ml. Catorce días después de la siembra, las células se recolectaron, contaron y reestimularon en matraces T-75 que contenían 100 x 10⁶ PBMC irradiados, 20 x 10⁶ TM-LCL irradiados y 30 ng/ml de OKT3 en 50 ml de medio de cultivo tisular. Los matraces recibieron adiciones al cultivo de rIL2 e higromicina como se describió anteriormente.

Los CTL seleccionados para la expansión para su posible uso en terapia se analizaron por inmunofluorescencia en un clasificador de células activado por fluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con FITC WT/31 ($\alpha\beta$ TCR), Leu 2a (CD8) y OKT4 (CD4) para confirmar el fenotipo del clon ($\alpha\beta$ TCR^{d+}, CD4⁻, CD8⁺ e IL13⁺). Los criterios para la selección de clones para uso clínico incluyeron TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD4⁻, CD8⁺ e IL13⁺ uniformes en comparación con el anticuerpo conjugado con FITC/PE de control de isotipo. Se confirmó un único sitio de integración cromosómica del vector plásmido mediante análisis de transferencia Southern. El ADN de los clones de células T modificadas genéticamente se cribó con una sonda de ADN específica para el vector plasmídico.

La expresión de IL13-CD28-41BB ζ se determinó mediante transferencia Western para detectar la proteína receptora quimérica utilizando el anticuerpo anti-CD3 ζ de cadena zeta descrito anteriormente de acuerdo con métodos estándar. En resumen, se generaron lisados de células completas de clones de células T transfectadas mediante la lisis de 2 x 10⁷ células lavadas en 1 ml de tampón RIPA (PBS, NP40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0.5 %, SDS al 0.1 %) que contenía 1 comprimido/10 ml de Cóctel inhibidor de proteasa completo. Después de una incubación de 80 minutos en hielo, se recogieron alícuotas de sobrenadante de lisado celular completo centrifugado y se hirvieron en un volumen igual de tampón de carga en condiciones reductoras y luego se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12 % prefabricado. Después de la transferencia a nitrocelulosa, la membrana se bloqueó en solución Blotto[™] que contenía leche desnatada en polvo al 4 % en T-TBS (Tween 20[™] al 0.1 % en solución salina tamponada con Tris, pH 8.0) durante una hora. Las membranas se lavaron en T-TBS, luego se incubaron con anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-CD3 ζ humano 8D3 (PharMingen[™]) a una concentración de 0.5 μ g/ml durante una hora. Después de cuatro lavados adicionales en T-TBS, las membranas se incubaron con una dilución 1: 3000 (en solución Blotto[™]) de anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina IgG anti-ratón de cabra durante 1 hora. Antes de agregar el sustrato, las membranas se enjuagaron en T-TBS, luego se incubaron con 3 ml de solución de sustrato de fosfatasa (kit Bio-Rad[™] ImmunoStar[™]) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las dosis adecuadas para un efecto terapéutico están entre aproximadamente 10⁶ y aproximadamente 10⁹ células por dosis, preferiblemente en una serie de ciclos de dosificación. Un régimen de dosificación preferido consiste en cuatro ciclos de dosificación de una semana de dosis crecientes, comenzando con aproximadamente 10⁷ células el día 0, aumentando gradualmente hasta una dosis objetivo de aproximadamente 10⁸ células el día 5. Los modos de administración adecuados incluyen administración intravenosa, subcutánea, intracavitaria (por ejemplo, mediante un dispositivo de acceso al reservorio), inyección intraperitoneal y directa en una masa tumoral.

Ejemplo 7. Tratamiento de glioma recidivante intracraneal en pacientes humanos.

El tratamiento de glioma o cualquier otro cáncer como se describe en el presente documento usando células T que expresan IL13-CD28-41BB ζ de acuerdo con esta invención se realizó como sigue. Los clones de células T, preferiblemente como se describe en el Ejemplo 6, se seleccionaron por:

a. Fenotipo de la superficie celular TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD4⁻, CD8⁺, IL13⁺;

- b. la presencia de una única copia del ADN del vector plasmídico integrado cromosómicamente;
- c. expresión de la proteína IL13-CD28-41BBζ;
- 5 d. lisis específica de dianas IL13Rα2⁺ humanas;
- e. dependencia de IL2 exógena para el crecimiento in vitro;
- 10 f. micoplasma, esterilidad fúngica y bacteriana y niveles de endotoxinas inferiores a 5 UE/ml; y
- g. sensibilidad in vitro de clones al ganciclovir.

Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron del paciente mediante leucoféresis, preferiblemente después de la recuperación de la cirugía de resección inicial y en un momento de al menos tres semanas después de disminuir gradualmente los esteroides y/o su quimioterapia sistémica más reciente. El rendimiento de células mononucleares de leucoféresis diana fue generalmente de 5×10^9 y el número diana de clones de células T citolíticas resistentes a higromicina fue 25. En general, se identificaron al menos cinco clones que cumplían todos los parámetros de control de calidad para la expansión in vitro. Los clones se criopreservaron y los pacientes se controlaron mediante exámenes clínicos y radiográficos seriados. Cuando se documentó la recurrencia de la progresión de la enfermedad, los pacientes se sometieron a una nueva resección y/o la colocación de un dispositivo de acceso al reservorio para administrar células T a la cavidad de resección del tumor.

Después de la recuperación de la cirugía y la disminución gradual de los esteroides, si corresponde, el paciente comenzó la terapia con células T de la siguiente manera. El paciente recibió una diana de al menos cuatro ciclos de terapia de una semana. Durante el primer ciclo, el aumento de la dosis celular procedió desde una dosis inicial el día 0 de aproximadamente 10^7 células, seguida de aproximadamente 5×10^7 células el día 3 hasta una dosis objetivo de aproximadamente 10^8 células el día 5. El ciclo 2 comenzó tan pronto como una semana después comienzo del ciclo 1. En los días de la administración de células T, los clones expandidos se procesaron asépticamente lavándolos dos veces en 50 cc de PBS y luego se resuspendieron en solución salina normal sin conservantes farmacéuticos en un volumen que dio como resultado la dosis de células para el suministro del paciente en 2 ml. Preferiblemente, las células T se instilaron durante 5 a 10 minutos, seguido de 2 ml de PFNS administrado durante 5 minutos. La respuesta a la terapia se evaluó mediante resonancia magnética +/- gadolinio, con espectroscopia.

En general, las dosis de células fueron al menos un logaritmo menor que las dosis administradas en estudios que emplean células LAK intracavitarias (dosis de células individuales de hasta 10^9 y números de células acumulativas de hasta 2.75×10^{10}), TIL expandidos ex vivo (hasta 10^9 células/dosis) y linfocitos alorreactivos (dosis celular inicial 10^8 con dosis celulares acumulativas hasta 51.5×10^8). Se favorece la dosificación repetitiva de dosis baja para evitar respuestas inflamatorias potencialmente peligrosas que podrían ocurrir con instilaciones de un solo gran número de células. Cada infusión consistió preferiblemente en un solo clon de células T, y el mismo clon se administró preferiblemente a lo largo del curso de tratamiento de un paciente.

Aquellos pacientes que demuestren regresión tumoral con enfermedad residual en la resonancia magnética pueden tener cursos adicionales de terapia que comiencen no antes de la semana 7, que consisten en la repetición de los ciclos 3 y 4 seguidos de una semana de descanso/reestadificación, siempre que estos tratamientos sean bien tolerados hasta que tiempo en que se documenta la progresión de la enfermedad o se logra una respuesta completa (RC) basada en la evaluación radiográfica. Las toxicidades máximas generalmente aceptadas son inferiores al grado 3, sin embargo, esto queda a criterio del médico tratante.

El tratamiento con ganciclovir conduce a la ablación de los clones CAR⁺ HyTK⁺ CD8⁺ CTL. Por lo tanto, cualquier efecto secundario asociado con la terapia (dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, náuseas, etc.) que pueda ocurrir se puede controlar mediante tratamientos establecidos apropiados para la afección. Por ejemplo, el paciente puede recibir ganciclovir si se observa cualquier nueva toxicidad de grado 3 que progresa a grado 4, o cualquier toxicidad de grado 4 relacionada con el tratamiento que, en opinión del médico tratante, pone al paciente en un peligro médico significativo. El ganciclovir administrado por los padres se dosifica a 10 mg/kg/día divididos cada 12 horas. Los pacientes deben ser hospitalizados durante las primeras 72 horas de tratamiento con ganciclovir con fines de seguimiento. Si los síntomas no responden al ganciclovir dentro de las 48 horas, se pueden agregar agentes inmunosupresores adicionales, incluidos, entre otros, corticosteroides y ciclosporina, a discreción del médico tratante. Si las toxicidades son graves, el decadrón y/u otros fármacos inmunosupresores junto con ganciclovir también pueden usarse a discreción del médico tratante.

Los estudios preliminares de seguridad que utilizaron el protocolo descrito anteriormente, donde se administraron clones de CTL que expresaban IL13-CAR a pacientes humanos con glioma intracraneal recurrente, indicaron que de los eventos adversos que tenían una posible correlación con la administración intracavitaria de células T, los únicos eventos de grado 3 han sido dolores de cabeza que se produjeron con la administración de 10^8 células en cada uno de los dos pacientes tratados hasta la fecha. En ningún momento se encontró que los eventos adversos de Grado 4

o 5 estuvieran asociados con la administración de células T genéticamente alteradas. Por lo tanto, el perfil de seguridad general de esta terapia de transferencia adoptiva aquí fue aceptable.

Ejemplos 8-12. Moléculas de CAR ejemplares. (Comparación)

Las Figuras 14 y 16-18 proporcionan las secuencias de los CAR de comparación.

La Figura 14 proporciona la secuencia de un CAR de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-Zeta (CO) (SEQ ID NO: 36). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie del tumor IL13Rα2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular de inmunoglobulina isotipo G₄ (IgG₄), (3) la porción transmembrana de la molécula coestimuladora CD28 (cd28tm), (4) el dominio de señalización de CD28 con dos leucinas cambiadas a glicinas con el propósito de aumentar la expresión (CD28gg), y (5) el dominio de señalización de la cadena CD3ζ del receptor de células T (Zeta). Todos los segmentos estaban optimizados por codones (CO) para aumentar la expresión en mamíferos. La parte subrayada de la secuencia es la secuencia codificante de CD28gg.

La Figura 15, de acuerdo con la presente invención, proporciona la secuencia de un IL13-IgG₄-cd4tm-CD28-4-1BB-Zeta CAR (también denominado en el presente documento IL13-CD28-4-1BBζ; SEQ ID NO: 37). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie del tumor IL13Rα2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular de inmunoglobulina isotipo G₄ (IgG₄), (3) la porción transmembrana de CD4 (cd4tm); el dominio de señalización de la molécula coestimuladora CD28 (CD28) (4) el dominio de señalización de la molécula coestimuladora 4-1BB (4-1BB), y (5) el dominio de señalización de la cadena CD3ζ del receptor de células T (Zeta). La parte subrayada de la secuencia codifica CD28 y la parte **Negrita** de la secuencia codifica 4-1BB.

La Figura 16 proporciona la secuencia de un CAR IL13-IgG₄-cd28tm-CD28-Ox40-Zeta (SEQ ID NO: 38). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie del tumor IL13Rα2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular de inmunoglobulina isotipo G₄ (IgG₄), (3) la porción transmembrana de la molécula coestimuladora CD28 (cd28tm), (4) el dominio de señalización de CD28 (CD28), (5) el dominio de señalización de la molécula coestimuladora OX-40 (Ox40) y (6) el dominio de señalización de la CD3_{chain} del receptor de células T (Zeta). La secuencia que codifica cd28tm está subrayada (aminoácidos 364-390); la secuencia que codifica CD28 está en cursiva (aminoácidos 391-431); la secuencia que codifica Ox40 está en **negrita** (aminoácidos 432-467); y la secuencia que codifica Zeta está subrayada y en cursiva (aminoácidos 468-580).

La Figura 17 proporciona la secuencia de un CAR de IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg-4-1BB-Zeta (SEQ ID NO: 39). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie del tumor IL13Rα2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular de inmunoglobulina isotipo G₄ (IgG₄), (3) la porción transmembrana de la molécula coestimuladora CD28 (cd28tm), (4) el dominio de señalización de CD28 con dos leucinas cambiadas a glicinas con el propósito de aumentar la expresión (CD28gg), (5) el dominio de señalización de la molécula coestimuladora 4-1BB (4-1BB) y (6) el dominio de señalización de la cadena CD3ζ del receptor de células T (Zeta). La parte subrayada de la secuencia codifica CD28gg y la parte en **negrita** de la secuencia codifica 4-1BB.

La Figura 18 proporciona la secuencia de un IL13-IgG₄-cd28tm-CD28gg¹⁹⁹-4-1BB-Zeta CAR (SEQ ID NO: 40). Esta secuencia codifica (1) la molécula de IL13 con la mutación E13Y (que es el ligando para el receptor de la superficie del tumor IL13Rα2 en la superficie del tumor (IL13)), (2) la porción Fc del dominio extracelular de inmunoglobulina isotipo G₄ (IgG₄), (3) la porción transmembrana de la molécula coestimuladora CD28 (cd28tm), (4) el dominio de señalización de CD28 con dos leucinas cambiadas a glicinas con el propósito de aumentar la expresión, y su dominio quinasa eliminado con el propósito de eliminar su actividad de señalización (es decir, como control negativo para SEQ ID NO: 39) (CD28gg¹⁹⁹), (5) el dominio de señalización de la molécula coestimuladora 4-1BB (4-1BB), y (6) el dominio de señalización de la cadena CD3ζ del receptor de células T (Zeta). La parte subrayada de la secuencia codifica CD28gg¹⁹⁹ y la parte en **negrita** de la secuencia codifica 4-1BB.

Listado de secuencias

<110> Jensen, Michael

<120> Método y composición para el funcionamiento mejorado del efector antitumoral de las células T

<130> 1954-504

<150> 61/091,915

<151> 2008-08-26

<160> 53

ES 2 899 174 T3

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 1

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

Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Tyr Leu
 20 25 30

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

Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys
 50 55 60

Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu
 65 70 75 80

Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
 85 90 95

Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110

Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115 120 125

Gly Arg Phe Asn
 130

15 <210> 2
 <211> 416
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 2

tatgaattca tggcgctttt gttgaccacg gtcattgctc tcaactgcct tggcggcttt 60
 gcctccccag gccctgtgcc tccctctaca gccctcaggt acctcattga ggagctggtc 120
 aacatcaccc agaaccagaa ggctccgctc tgcaatggca gcatggtatg gagcatcaac 180
 ctgacagctg gcatgtactg tgcagccctg gaatccctga tcaacgtgctc aggctgcagt 240
 gccatcgaga agaccagag gatgctgagc ggattctgcc cgcacaaggt ctcagctggg 300
 cagttttcca gcttgcatgt ccgagacacc aaaatcgagg tggcccagtt tgtaaaggac 360
 20 ctgctcttac atttaaagaa actttttcgc gagggacggt tcaactgagg atccga 416

25 <210> 3
 <211> 416
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 899 174 T3

```

atacttaagt accgcgaaaa caactggtgc cagtaacgag agtgaacgga accgccgaaa      60
cggaggggtc cgggacacgg agggagatgt cgggagtcca tggagtaact cctcgaccag      120
ttgtagtggg tcttgggtctt ccgaggcggag acgttaccgt cgtaccatac ctcgtagtgtg      180
gactgtcgac cgtacatgac acgtcgggac cttagggact agttgcacag tccgacgtca      240
cggtagctct tctgggtctc ctacgactcg cctaagacgg gcgtgttcca gagtcgaccc      300
gtcaaaaggt cgaacgtaca ggctctgtgg ttttagctcc accgggtcaa acatttcctg      360
gacgagaatg taaatttctt tgaaaaagcg ctccctgcca agttgactcc taggct          416

```

<210> 4

<211> 497

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

```

```

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

```

```

Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met
           50           55           60

```

```

10 Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala
           65           70           75           80

```

ES 2 899 174 T3

Ile Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val
85 90 95

Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu
100 105 110

Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe
115 120 125

Arg Glu Gly Arg Phe Asn Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
130 135 140

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
145 150 155 160

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
165 170 175

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
180 185 190

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
195 200 205

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
210 215 220

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
225 230 235 240

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
245 250 255

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
260 265 270

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
275 280 285

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
290 295 300

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
305 310 315 320

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly

ES 2 899 174 T3

325 330 335

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
340 345 350

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Ala Leu Ile Val
355 360 365

Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe
370 375 380

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

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
405 410 415

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

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

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
450 455 460

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

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

<210> 5
 <211> 1522
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

atctctagag ccgccacat gcttctcctg gtgacaagcc ttctgctctg tgagttacca 60
 caccagcat tctctctgat ccaggccct gtgcctccct ctacagccct caggtacctc 120
 attgaggagc tggtaacat caccagaac cagaaggctc cgctctgcaa tggcagcatg 180
 gtatggagca tcaacctgac agctggcatg tactgtgcag cctggaatc cctgatcaac 240
 gtgtcaggct gcagtgccat cgagaagacc cagaggatgc tgagcggatt ctgccgcac 300

5

10

ES 2 899 174 T3

aaggtctcag ctgggcagtt ttccagcttg catgtccgag acacccaaat cgaggtggcc 360
 cagtttghaa aggacctgct cttacattta aagaaacttt ttccgagagg acggttcaac 420
 gagtccaaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 480
 tcagtcttcc tgttccccc aaaacccaag gacactctca tgatctccc gaccctgag 540
 gtcacgtgcg tgggtggtga cgtgagccag gaagacccc aggtccagtt caactggtac 600
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 660
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccag actggctgaa cggcaaggag 720
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 780
 gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatcca ggaggagatg 840
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 900
 gtggagtggg agagcaatg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 960
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 1020
 gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1080
 aagagcctct cctgtctctt gggtaaaatg gccctgattg tgctgggggg cgctgccggc 1140
 ctctctgctt tcattgggct aggcattctt ttccagatga agttcagcag gagcgcagac 1200
 gcccccgct accagcaggc ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggcggaaga 1260
 gaggagtacg atgttttga caagagacgt ggcggggacc ctgagatggg gggaaagccg 1320
 agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 1380
 gcctacagtg agattgggat gaaagccgag cgcgggagg gcaaggggca cgatggcctt 1440
 taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg 1500
 cccctcgtct aagcggccgc at 1522

<210> 6
 <211> 1522
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

tagagatctc ggcggtggta cgaagaggac cactgttcgg aagacgagac actcaatggt 60
 gtgggtcgtg aggaggacta gggccggga cacggaggga gatgtcggga gtccatggag 120
 taactcctcg accagttgta gtgggtcttg gtcttcagc gcgagacgtt accgtcgtac 180
 catacctcgt agttggactg tcgaccgtac atgacacgct gggaccttag ggactagttg 240
 cacagtccga cgtcacggtg gctcttcttg gtctcctacg actcgcctaa gacgggcgtg 300
 ttccagagtc gaccctcaa aaggtcgaac gtacaggtc tgtggtttta gctccaccgg 360
 gtcaaacatt tctcggacga gaatgtaaat ttctttgaaa aagcgtctcc tgccaagtg 420

10

ES 2 899 174 T3

ctcaggttta taccaggggg tacgggtggt acgggtcgtg gactcaagga cccccctggt 480
 agtcagaag acaagggggg ttttgggttc ctgtgagagt actagagggc ctggggactc 540
 cagtgcacgc accaccacct gcactcgttc cttctggggc tccaggtcaa gttgaccatg 600
 cacctaaccg acctccactg attacgggtc tgtttcggcg ccctcctcgt caagttgtcg 660
 tgcattggcac accagtcgca ggagtggcag gacgtggtcc tgaccgactt gccgttcctc 720
 atgttcacgt tccagaggtt gtttccggag ggcaggaggt agctctttt gtagaggttt 780
 cggtttcccg tcggggctct cgggtgtccac atgtgggacg ggggtagggt cctcctctac 840
 tggttcttgg tccagtcgga ctggacggac cagtttccga agatggggtc gctgtagcgg 900
 cacctcacc cctcgttacc cgtcggcctc ttgttgatgt tctggtgcgg agggcacgac 960
 ctgaggctgc cgaggaagaa ggagatgtcg tccgattggc acctgttctc gtccaccgtc 1020
 ctccccttac agaagagtac gaggcactac gtactccgag acgtgttggg gatgtgtgtc 1080
 ttctcggaga gggacagaga cccattttac cgggactaac acgaccccc gcagcggcgg 1140
 gaggacgaaa agtaaccgga tccgtagaag aagtctcact tcaagtcgtc ctcgcgtctg 1200
 cgggggcgca tggctgtccc ggtcttggtc gagatattgc tcgagttaga tcctgcttct 1260
 ctctcatgc taaaaacct gttctctgca ccggccctgg gactctacc cctttcggc 1320
 tcttcttct tgggagctct tccggacatg ttacttgacg tctttctatt ctaccgcctc 1380
 cggatgtcac tctaacccta ctttccgctc gcggcctccc cgttccccgt gctaccggaa 1440
 atgggtcccag agtcatgtcg gtggttcctg tggatgctgc ggaagtgtc cgtccgggac 1500
 gggggagcga ttgcggcgg ta 1522

<210> 7
 <211> 84
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7

atctctagag ccgccaccat gcttctcctg gtgacaagcc ttctgctctg tgagttacca 60
 10 caccagcat tctcctgat ccca 84

<210> 8
 <211> 336
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

<400> 8

ggccctgtgc ctccccttac agccctcagg tacctcattg aggagctggt caacatcacc 60
 cagaaccaga aggctccgct ctgcaatggc agcatggtat ggagcatcaa cctgacagct 120
 ggcattgtact gtgcagccct ggaatccctg atcaactgtt caggctgcag tgccatcgag 180
 aagaccaga ggatgctgag cggattctgc ccgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc 240
 20 agcttgcatg tccgagacac caaaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctctta 300
 catttaaaga aactttttcg cgagggacgg ttcaac 336

<210> 9
 <211> 686
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 899 174 T3

```

<400> 9
gagtccaaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca      60
tcagtcttcc tgttccccc aaaaccaag gacactctca tgatctccc gaccctgag      120
gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag gaagacccc aggtccagtt caactggtac      180
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc      240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccag actggctgaa cggcaaggag      300
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa      360
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatcca ggaggagatg      420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccctcag cgacatcgcc      480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg      540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag      600
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag      660
aagagcctct cctgtctct gggtaa      686

<210> 10
<211> 67
5 <212> ADN
   <213> Homo sapiens

<400> 10
aatggccctg attgtgctgg ggggcgtcgc cggcctcctg cttttcattg ggctaggcat      60
10 cttcttc      67

<210> 11
<211> 339
15 <212> ADN
   <213> Homo sapiens

<400> 11
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc      60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttgacaa gagacgtggc      120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat      180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc      240
cggaggggca agggcacga tggcctttac cagggctca gtacagccac caaggacacc      300
20 tacgacgcc ttcacatgca ggcctgccc cctcgctaa      339

<210> 12
<211> 1092
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> vector de plásmido

<400> 12
30

```


ES 2 899 174 T3

```

gagtccaaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca      60
tcagtcttcc tgttccccc aaaacccaag gacactctca tgatctccc gaccctgag      120
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagacccc aggtccagtt caactggtac      180
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc      240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag      300
tacaagtgca aggtctcaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa      360
gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatcca ggaggagatg      420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc      480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg      540
gactccgacg gctcettett cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag      600
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgacaacca ctacacacag      660
aagagcctct cctgtctct gggtaaatg gccctgattg tgctggggg cgtcgccggc      720
ctctgcttt tcattgggct aggcactctt ttcagagtga agttcagcag gagcgcagac      780
gcccccgct accagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga      840
gaggagtacg atgttttgg caagagacgt ggcggggacc ctgagatggg gggaaagccg      900
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag      960
gcctacagtg agattgggat gaaagggcag cgcgggagg gcaaggggca cgatggcctt     1020
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg     1080
ccccctgct aa                                                                1092

```

```

<210> 13
<211> 6770
5 <212> ADN
  <213> Secuencia Artificial

```

```

<220>
10 <223> vector de plásmido

```

```

<400> 13

```

```

tcgaaggatc tgcgatcgct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgcacat cgcccacagt      60

```

ES 2 899 174 T3

ccccgagaag ttggggggag gggctggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcgg	120
ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagag gtgggggaga	180
accgtatata agtcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaaccggg ttgccgccag	240
aacacagctg aagcttcgag gggctcgcat ctctccttca cgcgcccgcc gccctacctg	300
aggccgccat ccacgccggt tgagtcgctg tctgccgcct ccgcctgtg gtgcctcctg	360
aactgcgtcc gccgtctagg taagtttaaa gctcaggtcg agaccgggcc tttgtccggc	420
gtccccttgg agcctaccta gactcagccg gctctccacg ctttgctga cctgcttgc	480
tcaactctac gtctttgttt cgttttctgt tctgcccgtg tacagatcca agctgtgacc	540
ggcgcctacg taagtgatat ctactagatt tatcaaaaag agtgttgact tgtgagcgt	600
cacaattgat accgattcat cgagagggac acgtcgacta ctaaccttct tctctttcct	660
acagctgaga tcacctaga gccgccacca tgcttctcct ggtgacaagc cttctgctct	720
gtgagttacc acaccagca ttcctcctga tcccaggccc tgtgcctccc tctacagccc	780
tcaggtacct cattgaggag ctggtcaaca tcaccagaa ccagaaggct ccgctctgca	840
atggcagcat ggtatggagc atcaacctga cagctggcat gtactgtgca gccctggaat	900
ccctgatcaa cgtgtcaggc tgcagtgcca tcgagaagac ccagaggatg ctgagcggat	960
tctgcccgca caaggtctca gctgggcagt tttccagctt gcatgtccga gacacaaaa	1020
tcgagtggtc ccagtttcta aaggacctgc tcttacattt aaagaaactt tttcgcgagg	1080
gacggttaa cgagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgccagca cctgagttcc	1140
tggggggacc atcagtcttc ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc	1200
ggaccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt	1260
tcaactggtc cgtggatggc gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc	1320
agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga	1380
acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct ccgctcctcc atcgagaaaa	1440
ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc	1500
aggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca	1560
gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc	1620
ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga	1680
gcaggtggca ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc	1740
actacacaca gaagagcctc tcctgtccc taggtaaaat ggccctgatt gtgctggggg	1800
gcgtcgcccg cctcctgctt ttcattgggc taggcatctt cttcagagtg aagttcagca	1860
ggagcgcaga cgcccccg caccagcagg gccagaacca gctctataac gagctcaatc	1920
taggacgaag agaggagtac gatgttttgg acaagagacg tggccgggac cctgagatgg	1980

ES 2 899 174 T3

gggaaagcc gagaaggaag aacctcagg aaggcctgta caatgaactg cagaaagata	2040
agatggcga gccctacagt gagattgga tgaaggcga gcgccggagg ggcaagggc	2100
acgatggcct ttaccagggt ctcagtagac ccaccaagga cacctacgac gcccttcaca	2160
tcagggcct gccccctcgc tgagcggccg gcgaaggagg cctagatcta tcgattgtac	2220
agctagctcg acatgataag atacattgat gagtttgac aaaccacaac tagaatgcag	2280
tgaaaaaat gctttatttg tgaaatttg gatgctattg ctttatttg gaaatttg	2340
atgctattgc tttatttgta accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt	2400
gcattcattt tatgtttcag gttcagggg aggtgtgga ggtttttta agcaagtaa	2460
acctctaca atgtgtaga tccatttaa tgttagcga gaacatgtga gaaaaggcc	2520
agcaaaaggc caggaacctg aaaaaggccg cgttgctggc gttttccat aggctccgc	2580
cccctgacga gcatcacia aatcgacgt caagtcagag gtggcgaac ccgacaggac	2640
tataaagata ccagcggtt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacc	2700
tgccgcttac cggatacctg tccgccttc tccctcggg aagcgtggcg ctttctcaat	2760
gctcacgctg taggtatctc agttcgggt aggtcgttc ctccaagctg ggctgtgtgc	2820
acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgc ccttatccg taactatcgt cttgagtcca	2880
acccgtaag acacgacta tcgccactg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	2940
cgaggtatgt aggcgggtct acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta	3000
gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	3060
gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc	3120
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt tctacgggt	3180
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatggct agttaattaa	3240
gctgcaataa acaatcatta ttttcattgg atctgtgtgt tggttttttg tgtgggcttg	3300
ggggaggggg aggccagaat gactccaaga gctacaggaa ggcaggtcag agacccact	3360
ggacaaacag tggctggact ctgcaccata acacacaatc aacaggggag tgagctggat	3420
cgagctagag tccgttacat aacttacggt aaatggccc cctggctgac cgccaacga	3480
ccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta tgttccata gtaacgcaa tagggacttt	3540
ccattgacgt caatgggtgg agtatttac gtaaaactgcc cacttgagc tacatcaagt	3600
gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca	3660
ttatgccag tacatgacct tatgggactt tcctacttg cagtacatct acgtattagt	3720
catcgtatt accatgggtg tgcggttttg gcagtagatc aatgggcgtg gatagcggtt	3780
tgactcacgg ggatttcaa gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttgca	3840

ES 2 899 174 T3

ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc gccccattga cgcaaatggg	3900
cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat	3960
cgctgggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccggg accgatccag	4020
cctccgcggc cgggaacggt gcattggaac gcggattccc cgtgccaaaga gtgacgtaag	4080
taccgcctat agagtctata ggcccaccta gttgtgaccg gcgcctagtg ttgacaatta	4140
atcatcggca tagtataata cgactcacta taggagggcc accatgtcga ctactaacct	4200
tcttctcttt cctacagctg agatcacccg taggagggcc atcatgaaaa agcctgaact	4260
caccgcgacg tctgtcgcga agtttctgat cgaaaagtcc gacagcgtct ccgacctgat	4320
gcagctctcg gagggcgaag aatctcgtgc tttcagcttc gatgtaggag ggcgtggata	4380
gtcctcgcgg gtaaatagct gcgccgatgg tttctacaaa gatcgttatg tttatcggca	4440
ctttgcatcg gcccgctccc cgattccgga agtgcttgac attggggaat tcagcggagag	4500
cctgacctat tgcactctcc gccctgcaca ggggtgcacg ttgcaagacc tgcctgaaac	4560
cgaaactgcc gctgttctgc aaccctcgc ggagctcatg gatgcgatcg ctgcggccga	4620
tcttagccag acgagcgggt tcggcccatt cggaccgcaa ggaatcggtc aatacactac	4680
atggcgtgat ttcatatcgc cgattgtcga tccccatgtg tatcactggc aaactgtgat	4740
ggacgacacc gtcagtgcgt ccgtcgcgca ggctctcgat gagctgatgc tttgggccga	4800
ggactgcccc gaagtccggc acctcgtgca cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac	4860
ggacaatggc cgcataaacg cggtcattga ctggagcggg gcgatgttcg gggattccca	4920
atacagagtc gccaacatct tcttctggag gccgtggtg ccttgtatgg agcagcagac	4980
gcgctacttc gagcggaggc atccggagct tgcaggatcg ccgcggtccc gggcgtatat	5040
gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca gagcttggtt gacggcaatt tcgatgatgc	5100
agcttgggcg cagggctgat gcgacgcaat cgtccgatcc ggagccggga ctgtcgggcg	5160
tacacaaatc gcccgagaaa gcgcggccgt ctggaccgat ggctgtgtag aagtgcgctc	5220
tgcgttgcac caggctgcgc gttctcgcgg ccatagcaac cgacgtacgg cgttgcgccc	5280
tcgcccggcag caagaagcca cggaaagtcc cccggagcag aaaatgccca cgctactgcg	5340
ggtttatata gacggtcccc acgggatggg gaaaaccacc accacgcaac tgctgggtggc	5400
cctgggttcg cgcgacgata tcgtctacgt acccgagccg atgacttact ggcgggtgct	5460
gggggcttcc gagacaatcg cgaacatcta caccacacaa caccgcctcg accagggatga	5520
gatatcggcc ggggacgcgg cggtggtaat gacaagcggc cagataacaa tgggcatgcc	5580
ttatgccgtg accgacggcg ttctggctcc tcatatcggg ggggaggctg ggagctcaca	5640
tgccccgccc ccggccctca ccctcatctt cgaccgcat cccatcggcg ccctcctgtg	5700
ctaccggccc gcgcggtacc ttatgggcag catgaccccc caggccgtgc tggcgttcgt	5760

ES 2 899 174 T3

ggccctcacc cggccgacct tgcccgccac caacatcgtg cttggggccc ttccggagga 5820
 cagacacatc gaccgcctgg ccaaacgccca gcgccccggc gagcgctgg acctggctat 5880
 gctggctgcg attcgcgcg tttacgggct acttgccaat acggtgcggt atctgcagtg 5940
 cggcggtcgc tggcgggagg actggggaca gctttcgggg acggccgtgc cggcccaggg 6000
 tgccgagccc cagagcaacg cgggcccacg accccatata ggggacacgt tatttacctt 6060
 gtttcgggcc cccgagttgc tggcccccaa cggcgacctg tataacgtgt ttgcctgggc 6120
 cttggacgtc ttggccaaac gcctccgttc catgcacgtc tttatcctgg attacgacca 6180
 atcgcccgcc ggtgcgcggg acgcccgtct gcaacttacc tccgggatgg tccagacca 6240
 cgtcaccacc cccgctcca taccgacgat atgcgacctg gcgcgacgtc ttgcccggga 6300
 gatgggggag gctaactgag tcgagaattc gctagagggc cctattctat agtgtcacct 6360
 aaatgctaga gctcgtgat cagcctcgcg tgtgccttct agttgccagc catctgttgt 6420
 ttgccctcc cccgtgcctt ccttgacctt ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta 6480
 ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtagtgtt cattctattc tggggggtgg 6540
 ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg cgcagggccc 6600
 aattgctcga cggcgccgaa taaaatatct ttatcttcat tacatctgtg tgttggtttt 6660
 ttgtgtgaat cgtaaactaac atacgctctc catcaaaaca aaacgaaaca aaacaaacta 6720
 gcaaaatagc ctgtcccagc tgcaagtgca ggtgccagaa catttctcta 6770

<210> 14
 <211> 6770
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 14

agcttcctag acgctagcga ggccacgggc agtcaccctg ctccgctgta gcgggtgtca 60
 ggggctcttc aacccccctc cccagccggt aacttgcca cggatctctt ccaccgcgcc 120
 ccatttgacc ctttcactac agcaccatgac cagggcgga aaagggtcc caccctct 180
 tggcatatat tcacgtcacc agcggcactt gcaagaaaa gcgttgcca aacggcggtc 240
 ttgtgtcgcg ttcgaagctc cccgagcgtg gagaggaagt gcgcgggcgg cgggatggac 300
 tccggcggta ggtgcggcca actcagcgcg agacggcgga gggcgacac cacggaggac 360
 ttgacgcagg cggcagatcc attcaaatc cgagtccagc tctggcccgg aaacaggccg 420
 cgagggaacc tcggatggat ctgagtcggc cgagaggtgc gaaacggact gggacgaacg 480
 agttgagatg cagaaacaaa gcaaaagaca agacggcgca atgtctaggt tcgacactgg 540
 ccgcggtatc attcaactata gatgatctaa atagttttc tcacaactga acaactcgcga 600
 gtgttaacta tgcctaagta gctctccctg tgcagctgat gattggaaga agagaaagga 660

10

ES 2 899 174 T3

tgtcgactct agtgggatct cggcgggtgt acgaagagga cactgttcg gaagacgaga	720
cactcaatgg tgtgggtcgt aaggaggact agggtcctgg acacggagg agatgtcggg	780
agtccatgga gtaactcctc gaccagttgt agtgggtcct ggtcttcga ggcgagacgt	840
taccgtcgtc ccatacctcg tagttgact gtcgaccgta catgacacgt cgggaccta	900
gggactagtt gcacagtccg acgtcacggt agctctctcg ggtctcctac gactcgccta	960
agacgggctg gttccagagt cgaccctgca aaaggtcgaa cgtacaggct ctgtggtttt	1020
agctccaccg ggtcaaacat ttctcggacg agaatgtaa tttctttgaa aaagcgtcc	1080
ctgccaaagt gtcacagttt ataccagggg gtacgggtgg tacgggtcgt ggactcaagg	1140
acccccctgg tagtcagaag gacaaggggg gttttgggtt cctgtgagag tactagaggg	1200
cctggggact ccagtgcacg caccaccacc tgcactcggg cctctcgggg ctccaggtca	1260
agttgacct gacacctccg cacctccacg tattacggtt ctgtttcggc gccctcctcg	1320
tcaagttgtc gtgcgatgca caccagtgcg aggagtggca ggacgtggtc ctgaccgact	1380
tgccgttcct catgttcacg ttccagaggt tgtttccgga gggcaggagg tagctctttt	1440
ggtagaggtt tcggtttccc gtcggggctc tcggtgtcca catgtgggac gggggtaggg	1500
tcctcctcta ctggttctgt gtccagtcgg actggacgga ccagtttcgg aagatggggg	1560
cgtctgtagc gcaacctacc ctctcgttac ccgtcggcct cttgtgtgat ttctgggtcg	1620
gagggcacga cctgaggctg ccgaggaaga aggagatgtc gtccgattgg cacctgttct	1680
cgtccaccgt cctcccctta cagaagagta cgaggcacta cgtactccga gacgtgttgg	1740
tgatgtgtgt cttctcggag agggacaggg atccatttta ccgggactaa cacgaccccc	1800
cgacagggcc ggaggacgaa aagtaacccg atccgtagaa gaagtctcac ttcaagtcgt	1860
cctcgcgtct cggggggcgc atggtcgtcc cggctctggt cgagatattg ctcgagttag	1920
atcctgcttc tctcctcatg ctacaaaacc tgttctctgc accggcctcg ggactctacc	1980
cccctttcgg ctcttctctc ttggggagtcc ttccggacat gttacttgac gtctttctat	2040
tctaccgcct ccggatgtca ctctaaccct actttccgct cgcggcctcc ccgttcccog	2100
tgctaccgga aatggtccca gagtcatgtc ggtgggtcct gtggatgctg cgggaagtgt	2160
acgtccggga cgggggagcg actcgcggc cgcttcctcc ggatctagat agctaacatg	2220
tcgatcgagc tgtactattc tatgtaacta ctcaaacctg tttggtgtg atcttacgtc	2280
acttttttta cgaaataaac actttaaaca ctacgataac gaaataaaca cttaaacac	2340
tacgataacg aaataaacat tggtaaatatt cgacgttatt tgttcaattg ttgttggtaa	2400
cgtaagtaaa atacaaagtc caagtcccc tccacaccct ccaaaaaatt tcggtcattt	2460
tggagatggt tacaccatct aggtaaattt acaatcgctt cttgtacact cgttttccgg	2520

ES 2 899 174 T3

tcgttttccg gtccttgcca tttttccggc gcaacgaccg caaaaaggta tccgaggcgg	2580
ggggactgct cgtagtggtt ttagctgcga gttcagtcct caccgctttg ggctgtcctg	2640
atatttctat ggtccgcaaa gggggacctt cgagggagca cgcgagagga caaggctggg	2700
acggcgaatg gcctatggac aggcggaaag agggaagccc ttcgcaccgc gaaagagtta	2760
cgagtgcgac atccatagag tcaagccaca tccagcaagc gaggttcgac cgcacacacg	2820
tgcttggggg gcaagtccgg ctggcgacgc ggaataggcc attgatagca gaactcaggt	2880
tgggccattc tgtgtgtaat agcggtgacc gtcgtcgggt accattgtcc taatcgtctc	2940
gctccataca tccgccacga tgtctcaaga acttcaccac cggattgatg ccgatgtgat	3000
cttcttgtca taaaccatag acgcgagacg acttcggtca atggaagcct ttttctcaac	3060
catcgagaac taggcggtt gtttgggtgc gaccatcgcc accaaaaaa caaacgttcg	3120
tcgtctaata cgcgtctttt tttcctagag ttcttctag aaactagaaa agatgcccc	3180
gactgcgagt caccttgctt ttgagtgcaa ttccctaaaa ccagtaccga tcaattaatt	3240
cgacgttatt tgtagtaat aaaagtaacc tagacacaca accaaaaac acaccggaac	3300
ccctccccc tccggtctta ctgaggttct cgatgtcctt ccgtccagtc tctggggtga	3360
cctgtttgtc accgaactga gacgtggtat tgtgtgttag ttgtcccctc actcgaccta	3420
gctcgatctc aggcaatgta ttgaatgcca tttaccgggc ggaccgactg gcgggttgct	3480
gggggcgggt aactgcagtt attactgcat acaagggtat cattgcggtt atccctgaaa	3540
ggtaactgca gttaccacc tcataaatgc catttgacgg gtgaaccgtc atgtagttca	3600
catagtatac ggttcatgog ggggataact gcagttactg ccatttaccg ggcggaccgt	3660
aatacgggtc atgtactgga ataccctgaa aggatgaacc gtcattgtaga tgcataatca	3720
gtagcgataa tggtaaccact acgcaaaaac cgtcatgtag ttaccgcac ctatcgccaa	3780
actgagtgcc cctaaagggt cagaggtggg gtaactgcag ttaccctcaa acaaaaccgt	3840
ggttttagtt gccctgaaa gttttacagc attgttgagg cggggttaact gcgtttacc	3900
gccatccgca catgccacc tccagatata ttcgtctcga gcaaatcact tggcagtcta	3960
gcggacctct cgggtagggt gcgaaaaact ggaggtatct tctgtggccc tggctaggtc	4020
ggaggcggcg gcccttgcca cgtaaccttg cgcctaaggg gcacggttct cactgcattc	4080
atggcggata tctcagatat ccgggtggat caacactggc cgcggtacac aactgtaat	4140
tagtagccgt atcatattat gctgagtgat atcctcccgg tggtagacgt gatgattgga	4200
agaagagaaa ggatgctgac tctagtggcc atcctcccgg tagtactttt tccgacttga	4260
gtggcgctgc agacagcgt tcaaaagact gcttttcaag ctgtcgcaga ggctggacta	4320
cgtcgagagc ctcccgcttc ttagagcacg aaagtcgaag ctacatcctc ccgcacctat	4380
acaggacgcc catttatcga cgcggctacc aaagatgttt ctagcaatac aaatagccgt	4440

ES 2 899 174 T3

gaaacgtagc cggcgcgagc gctaaggcct tcacgaactg taaccocctta agtcgctctc 4500
 ggactggata acgtagaggg cggcacgtgt cccacagtgc aacgttctgg acggactttg 4560
 gcttgacggg cgacaagacg ttgggcagcg cctcagtagc ctacgctagc gacgccggct 4620
 agaatcggtc tgctcgccca agccgggtaa gcctggcggt ccttagccag ttatgtgatg 4680
 taccgcacta aagtatacgc gctaacgact aggggtacac atagtgaccg tttgacacta 4740
 cctgctgtgg cagtcacgca ggcagcgcgt ccgagagcta ctcgactacg aaaccocggct 4800
 cctgacgggg cttcaggcgc tggagcacgt gcgcctaagc ccgaggttgt tacaggactg 4860
 cctgttaccg gcgtattgtc gccagtaact gacctcgtc cgctacaagc ccctaagggt 4920
 tatgctccag cggttgtaga agaagacctc cggcaccaac cgaacatacc tcgtcgtctg 4980
 cgcgatgaag ctcgcctccg taggcctcga acgtcctagc ggcgcgagc cccgcatata 5040
 cgaggcgtaa ccagaactgg ttgagatagt ctogaaccaa ctgccggtta agctactacg 5100
 tcgaaccocg gtcaccgcta cgctgcgtta gcaggctagc cctcggccct gacagccocg 5160
 atgtgtttag cgggcgtctt cgcgccggca gacctggcta ccgacacatc ttcagcgcag 5220
 acgcaagctg gtcocagcgc caagagcgc ggtatcgtt gctgcatgcc gcaacgcggg 5280
 agcggcgcgt gttcttcggt gccttcagc gggcctcgtc ttttacgggt gcgatgacgc 5340
 ccaaataat ctcgccgggg tgccctacc cttttggtg tgggtcgtg acgaccaccg 5400
 ggaccaagc gcgctgctat agcagatgca tgggctcggc tactgaatga ccgccaccga 5460
 cccccgaag ctctgttagc gcttgtatag gtggtgtgtt gtggcggagc tggteccact 5520
 ctatagcccg cccctgcgcc gccaccatta ctgttcggg gtctattgtt acccgtacgg 5580
 aatacggcac tggctgcggc aagaccgag agtatagccc ccctccgac cctcagtggt 5640
 acggggcggg ggcggggagt gggagttaga gctggcggt gggtagcggc gggaggacac 5700
 gatgggoccg cgcgccatgg aataccocgt gtaactgggg gtccggcacg accgcaagca 5760
 ccgggagtag ggcggctgga acgggccgtg gttgtagcac gaaccocggg aaggcctcct 5820
 gtctgtgtag ctggcggacc ggtttgcggt cgcggggccg ctccgcgacc tggaccgata 5880
 cgaccgacgc taagcggcgc aaatgccoga tgaacggtta tgccacgcca tagacgtcac 5940
 gccgccocag accgcocctc tgaccocctg cgaagcccc tgccggcacg gcggggctcc 6000
 acggctcggg gtctcgttgc gcccggtgc tggggtatag ccctgtgca ataaatggga 6060
 caaagcccg gggctcaacg accgggggtt gccgctggac atattgcaca aacggaccoc 6120
 gaacctgcag aaccggtttg cggaggcaag gtacgtgcag aaataggacc taatgctggt 6180
 tagcgggocg ccgacggccc tgcgggacga cgttgaatgg aggcctacc aggtctgggt 6240
 gcagtggtg gggccgaggt atggctgcta tacgctggac cgcgcgtgca aacgggccct 6300
 ctaccocctc cgattgactc agctcttaag cgatctccc ggataagata tcacagtgga 6360
 tttacgatct cgagcgacta gtcggagctg acacggaaga tcaacggtcg gtagacaaca 6420
 aacggggag gggcacgaa ggaactggga cctccacg tgagggtgac aggaagat 6480
 tattttactc ctttaacgta gcgtaacaga ctcatccaca gtaagataag accccocacc 6540
 ccaccocgtc ctgtcgttcc ccctcctaac ccttctgtta tcgtccgtac gcgtccocgg 6600
 ttaacgagct cgcggcggtt atttataga aataaaagta atgtagacac acaacccaaa 6660
 aacacactta gcattgattg tatgcgagag gtagttttgt tttgctttgt tttgtttgat 6720
 cgttttatcc gacaggggtc acgttcacgt ccacggtcct gtaaagagat 6770

5 <210> 15
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 15

ES 2 899 174 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	Gly	Pro	Val	Pro	Pro	Ser	Thr	Ala	Leu	Arg
		20						25					30		
Tyr	Leu	Ile	Glu	Glu	Leu	Val	Asn	Ile	Thr	Gln	Asn	Gln	Lys	Ala	Pro
		35					40					45			
Leu	Cys	Asn	Gly	Ser	Met	Val	Trp	Ser	Ile	Asn	Leu	Thr	Ala	Gly	Met
	50					55					60				
Tyr	Cys	Ala	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Ile	Asn	Val	Ser	Gly	Cys	Ser	Ala
65					70					75					80
Ile	Glu	Lys	Thr	Gln	Arg	Met	Leu	Ser	Gly	Phe	Cys	Pro	His	Lys	Val
				85					90					95	
Ser	Ala	Gly	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	His	Val	Arg	Asp	Thr	Lys	Ile	Glu
			100					105					110		
Val	Ala	Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe
		115					120					125			
Arg	Glu	Gly	Arg	Phe	Asn	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro
	130					135					140				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
145					150					155					160

ES 2 899 174 T3

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 165 170 175

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 180 185 190

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 195 200 205

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 210 215 220

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 225 230 235 240

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 245 250 255

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 260 265 270

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 275 280 285

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 290 295 300

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 305 310 315 320

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 325 330 335

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 340 345 350

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Ala Leu Ile Val
 355 360 365

Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe
 370 375 380

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

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 405 410 415

ES 2 899 174 T3

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

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

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 450 455 460

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

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

Arg

- 5 <210> 16
- <211> 691
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- 10 <400> 16

Met Lys Lys Pro Glu Leu Thr Ala Thr Ser Val Ala Lys Phe Leu Ile
 1 5 10 15

Glu Lys Phe Asp Ser Val Ser Asp Leu Met Gln Leu Ser Glu Gly Glu
 20 25 30

Glu Ser Arg Ala Phe Ser Phe Asp Val Gly Gly Arg Gly Tyr Val Leu
 35 40 45

Arg Val Asn Ser Cys Ala Asp Gly Phe Tyr Lys Asp Arg Tyr Val Tyr
 50 55 60

Arg His Phe Ala Ser Ala Ala Leu Pro Ile Pro Glu Val Leu Asp Ile
 65 70 75 80

Gly Glu Phe Ser Glu Ser Leu Thr Tyr Cys Ile Ser Arg Arg Ala Gln
 85 90 95

Gly Val Thr Leu Gln Asp Leu Pro Glu Thr Glu Leu Pro Ala Val Leu
 100 105 110

Gln Pro Val Ala Glu Leu Met Asp Ala Ile Ala Ala Ala Asp Leu Ser
 115 120 125

ES 2 899 174 T3

Gln Thr Ser Gly Phe Gly Pro Phe Gly Pro Gln Gly Ile Gly Gln Tyr
 130 135 140

Thr Thr Trp Arg Asp Phe Ile Cys Ala Ile Ala Asp Pro His Val Tyr
 145 150 155 160

His Trp Gln Thr Val Met Asp Asp Thr Val Ser Ala Ser Val Ala Gln
 165 170 175

Ala Leu Asp Glu Leu Met Leu Trp Ala Glu Asp Cys Pro Glu Val Arg
 180 185 190

His Leu Val His Ala Asp Phe Gly Ser Asn Asn Val Leu Thr Asp Asn
 195 200 205

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

Ser Gln Tyr Glu Val Ala Asn Ile Phe Phe Trp Arg Pro Trp Leu Ala
 225 230 235 240

Cys Met Glu Gln Gln Thr Arg Tyr Phe Glu Arg Arg His Pro Glu Leu
 245 250 255

Ala Gly Ser Pro Arg Leu Arg Ala Tyr Met Leu Arg Ile Gly Leu Asp
 260 265 270

Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Val Asp Gly Asn Phe Asp Asp Ala Ala Trp
 275 280 285

Ala Gln Gly Arg Cys Asp Ala Ile Val Arg Ser Gly Ala Gly Thr Val
 290 295 300

Gly Arg Thr Gln Ile Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Trp Thr Asp Gly
 305 310 315 320

Cys Val Glu Val Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala Ala Arg Ser Arg Gly
 325 330 335

His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg Arg Gln Gln Glu Ala
 340 345 350

Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr Leu Leu Arg Val Tyr
 355 360 365

Ile Asp Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr Thr Thr Thr Gln Leu Leu

ES 2 899 174 T3

370		375		380
Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr Val Pro Glu Pro Met				
385		390		400
Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr Ile Ala Asn Ile Tyr				
	405		410	415
Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile Ser Ala Gly Asp Ala				
	420		425	430
Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met Gly Met Pro Tyr Ala				
	435		440	445
Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly Gly Glu Ala Gly Ser				
	450		455	460
Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile Phe Asp Arg His Pro				
465		470		480
Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg Tyr Leu Met Gly Ser				
	485		490	495
Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala Leu Ile Pro Pro Thr				
	500		505	510
Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu Pro Glu Asp Arg His				
	515		520	525
Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly Glu Arg Leu Asp Leu				
	530		535	540
Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly Leu Leu Ala Asn Thr				
545		550		555
Val Arg Tyr Leu Gln Cys Gly Gly Ser Trp Arg Glu Asp Trp Gly Gln				
	565		570	575
Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala Glu Pro Gln Ser Asn				
	580		585	590
Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu Phe Thr Leu Phe Arg				
	595		600	605
Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu Tyr Asn Val Phe Ala				
610		615		620

ES 2 899 174 T3

Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg Ser Met His Val Phe
625 630 635 640

Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys Arg Asp Ala Leu Leu
645 650 655

Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val Thr Thr Pro Gly Ser
660 665 670

Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe Ala Arg Glu Met Gly
675 680 685

Glu Ala Asn
690

5 <210> 17
<211> 102
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17

10 tatgaattca tggcgctttt gttgaccacg gtcattgctc tcacttgctc tggcggtttt 60
gcctccccag gccctgtgcc tccctctaca gccctcaggt ac 102

15 <210> 18
<211> 101
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 18

20 gttgatgctc cataccatgc tgccattgca gagcggagcc ttctggttct gggatgatgtt 60
gaccagctcc tcaatgaggt acctgagggc tgtagagggg g 101

25 <210> 19
<211> 100
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 19

30 ctctgggtct tctcgatggc actgcagcct gacacgttga tcagggatc cagggtgca 60
cagtacatgc cagctgtcag gttgatgctc cataccatgc 100

35 <210> 20
<211> 100
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 20

cctcgatttt ggtgtctcgg acatgcaagc tggaaaactg cccagctgag accttgtgag 60
ggcagaatcc gctcagcatc ctctgggtct tctcgatggc 100

40 <210> 21
<211> 96
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21

45

ES 2 899 174 T3

tcggatcctc agttgaaccg tccctcgcga aaaagtttct ttaaagttaa gagcaggctc 60
 ttacaaaact gggccacctc gattttggtg tctcgg 96

5 <210> 22
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 22
 caacctgaca gctggcatgt actgtgcagc cctggaatc 39

15 <210> 23
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 23
 gttggactgt cgaccgtaca tgacacgtcg ggacctag 39

25 <210> 24
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 24
 atctctagag cgcaccat gcttctctg gtgacaagcc ttc 43

35 <210> 25
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 25
 gagggaggca cagggcctgg gatcaggagg aatg 34

45 <210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 26
 cattctctct gatcccaggc cctgtgcctc cctc 34

55 <210> 27
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 27
 gggaccatat ttggactcgt tgaaccgtcc ctgc 35

65 <210> 28
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

70 <400> 28
 gcgagggacg gttcaacgag tccaaatag gtccc 35

75 <210> 29
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

80 <400> 29
 atcgggccgc tcagcgaggg ggcagg 26

ES 2 899 174 T3

<210> 30
 <211> 39
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 30
 atcgaattcg ccgccacat gggaaacagc tgttacaac 39

 10 <210> 31
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 31
 gataagctta tcgattcacc acatcctcct tcagtt 36

 <210> 32
 <211> 43
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 32
 cattgggcta ggcattctct tcaggagtaa gaggagcagg ctc 43
 25
 <210> 33
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 33
 gtttctttct gccccgttg ccacctccgg agcgataggc tgcaag 47

 <210> 34
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 34
 40 ctcgcagcc tatcgtccg gaggtggcaa acggggcaga aagaaac 47

 <210> 35
 <211> 38
 <212> ADN
 45 <213> Homo sapiens

 <400> 35
 gttgcgccg ctacagttc acatcctcct tcttctc 38

 50 <210> 36
 <211> 1644
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 36

ES 2 899 174 T3

```

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg      60
atccctggcc ccgtgcccc tagcaccgcc ctgcgctacc tgatcgagga actggtgaac      120
atcaccaga accagaaagc cccctgtgc aacggcagca tgggtggag catcaacctg      180
accgccgca tgtactgtgc cgccctgaa agcctgatca acgtgagcgg ctgcagcgcc      240
atcgagaaaa cccagcggat gctgtccggc ttctgcccc acaaggtgtc cgccggacag      300
ttcagcagcc tgcacgtgcg ggacaccaag atcgaggtgg cccagttcgt gaaggacctg      360
ctgctgcacc tgaagaagct gttccgggag ggccggttca acgagagcaa gtacggccct      420
ccctgcccc cttgcctgac cccagagttc ctgggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc      480
cccaagccca aggacacct gatgatcagc cggaccctg aggtgacctg cgtggtggtg      540
gacgtgagcc aggaagatcc tgaggtccag ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg      600
cacaacgcca agaccaagcc cagagagaa cagttcaaca gcacctaccg ggtggtgtct      660
gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaaa aatacaagt caaggtgtcc      720
aacaagggcc tgcccagcag catcgaaaa accatcagca aggccaaggg ccagcctcgc      780
gagccccagg tgtacacct gcctccctcc caggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtcc      840
ctgacctgcc tggtaagggt ttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac      900
ggccagcctg agaacaact caagaccacc cctcccgtgc tggacagcga cggcagcttc      960
ttcctgtaca gccggtgac cgtggacaag agccggtggc aggaaggcaa cgtctttagc     1020
tgacagctga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacct agaagagcct gagcctgtcc     1080
ctgggcaaga tgttctgggt gctggtggtg gtgggcgggg tgctggcctg ctacagcctg     1140
ctggtgacag tggccttcat catcttttgg gtgcgagca agcggagcag aggcggccac     1200
agcgactaca tgaacatgac cccagacggc cctggcccc cccggaagca ctaccagccc     1260
tacgccccac ccagggaact tggcgcctac cggcggcggc gagggcgggt gaagttcagc     1320
agaagcggcg acgcccctgc ctaccagcag ggccagaatc agctgtataa cgagctgaac     1380
ctgggcagaa gggaaagta cgacgtcctg gataagcggg gaggcgggga ccctgagatg     1440
ggcggcaagc ctcggcggaa gaacccccag gaaggcctgt ataacgaact gcagaaagac     1500
aagatggccg aggcctacag cgagatcggc atgaaggcgg agcggaggcg gggcaagggc     1560
cacgacggcc tgtatcaggg cctgtccacc gccaccaagg atacctacga cgccctgcac     1620
atgcaggccc tgcccccaag gtga                                             1644

```

5 <210> 37
 <211> 1761
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 37

ES 2 899 174 T3

```

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg      60
atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcagggagc tcattgagga gctggtcaac      120
atcaccagca accagaagcc tccgctctgc aatggcagca tggatggag catcaacctg      180
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc      240
atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag      300
ttttccagct tgcatgtccg agacaccaa atcgagggtg cccagtttgt aaaggacctg      360
ctcttacatt taaagaaact ttttcgagc ggacggttca acgagtccaa atatggtccc      420
ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc      480
ccaaaacca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg      540
gacgtgagcc aggaagacc cggaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggtg      600
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc      660
gtcctcaccg tctctcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc      720
aaciaaagcc tcccgtcctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga      780
gagccacagc tgtacacctt gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc      840
ctgacctgcc tggtaaaagg tttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat      900
ggcgagcccg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc      960
ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca     1020
tgcctcctga tgcatgagcc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctcccgtctt     1080
ctgggtaaaa tggccctgat tgtgctgggg ggcgtcgccg gcctcctgct tttcattggg     1140
ctaggcatct tcttcaggag taagaggagc aggtcctgct acagtgacta catgaacatg     1200
actccccgcc gccctggggc caccgcaag cattaccagc cctatgcccc accacgagac     1260
ttcgagcctt atcgctccgg aggtggcaaa cggggcagaa agaaactcct gtatatattc     1320
aaacaacat  ttatgagacc agtacaact  actcaagagg aagatggctg tagctgccga     1380
tttcagaag  aagaagaagg aggatgtgaa ctgggaggtg gcagagtgaa gttcagcagg     1440
agcgagagc  cccccgcta  ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta     1500
ggacgaagag aggagtacga tgttttgac  aagagacgtg gccgggacct tgagatgggg     1560
ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag     1620
atggcggagg cctacagta  gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac     1680
gatggccttt accaggtct  cagtacagcc accaaggaca cctacgagc  ccttcacatg     1740
caggccctgc cccctcgctg a                                     1761

```

5 <210> 38
 <211> 1740
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 38

ES 2 899 174 T3

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctacaggtacc tcattgagga gctggtaaac 120
atcacccaga accagaagcc tccgctctgc aatggcagca tggataggag catcaacctg 180
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 240
atcgagaaga cccagaggat gctgagcggg ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 300
ttttccagct tgcattgccc agacaccaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 360
ctcttacatt taaagaaact ttttcgcgag ggacggttca acgagtccaa atatgggtccc 420
ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc 480
cmetaaccac aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 540
gacgtgagcc aggaagacc cagaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggtg 600
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 660
gtcctcaccg tctctgacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720
a metaaggcc tcccgtcctc catcgagaaa accatctcca aagc metaagg gcagccccga 780
gagccacagc tgtacacctt gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840
ctgacctgcc tggtaaaagg tttctacccc agcagatcgc cgtggagtgt ggagagcaat 900
ggcagcccgc agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960
ttcctctaca gcaggtaac cgtggacaag agcaggtggc aggggggaa tgtcttctca 1020
tgcctcgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctcccgtcc 1080
ctaggtaaat tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 1140
gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 1200
gactacatga acatgactcc ccgcccacc gggcccacc gcaagcatta ccagccctat 1260
gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccagggacc agaggctgcc ccccgatgcc 1320
c metaagcccc ctgggggagg cagtttccgc acccccctcc aagaggagca ggcccagccc 1380
cactccacc cggccaagat cagagtgaag ttcagcagga gcgcagagcc ccccgcgtac 1440
cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 1500
gttttggaca agagacgtgg ccgggacctt gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 1560
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 1620
attgggatga aaggcagcgc ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1680
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc cctcgcgtga 1740

5 <210> 39
<211> 1779
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 39

ES 2 899 174 T3

```

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg      60
atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggtacc tcattgagga gctggtcaac      120
atcaccagca accagaagcc tccgctctgc aatggcagca tggatggag catcaacctg      180
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc      240
atcgagaaga cccagaggat gctgagcgga ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag      300
ttttccagct tgcatgtccg agacaccaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg      360
ctcttacatt taaagaaact ttttcgctgc ggacggttca acgagtccaa atatggtccc      420
ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ttggggggac catcagtctt cctgttcccc      480
ccaaaacca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg      540
gacgtgagcc aggaagacc cggaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg      600
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc      660
gtcctcaccg tctctcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc      720
aaciaaagcc tcccgtcctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga      780
gagccacagg tgtacacctt gcccccctcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc      840
ctgacctgcc tgggtcaaag cttctacccc agcagacatcg ccgtggagtg ggagagcaat      900
gggcagcccg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc      960
ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca     1020
tgctccgtga tgcgatggcc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctcccgttcc     1080
ctaggtaaaa tgttttgggt gctggtgggt gttggtggag tcctggcttg ctatagcttg     1140
ctagtaacag tggcctttat tattttctggt gtgaggagta agaggagcag gggcggacac     1200
agtactaca tgaacatgac tcccgcgcgc cctgggccc aacgcaagca ttaccagccc     1260
tatgcccac cagcgcactt cgcagcctat cgctccggag gtggcaaacg gggcagaaag     1320
aaactcctgt atatattcaa acaaccattt atgagaccag tacaactac tcaagaggaa     1380
gatggtctga gctgccgatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gggaggtggc     1440
agagtgaagt tcagcaggag cgcagagcgc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc     1500
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc     1560
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat     1620
gaactgcaga aagataagat ggccggagcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc     1680
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc     1740
tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgtctga                               1779

```

5 <210> 40
 <211> 1779
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 40

ES 2 899 174 T3

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg 60
atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctccaggtacc tcattgagga gctgggtcaac 120
atcaccocaga accagaaggc tccgctctgc aatggcagca tggatggag catcaacctg 180
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tcctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc 240
atcgagaaga cccagaggat gctgagcggg ttctgcccgc acaaggtctc agctgggcag 300
ttttccagct tgcattgtcc agacaccaa atcgaggtgg cccagtttgt aaaggacctg 360
ctcttacatt taaagaaact ttttcgagc ggacgggtca acgagtcctc atatgggtccc 420
ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc 480
ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggg 540
gacgtgagcc aggaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg 600
cataatgcca agacaaagcc gcgggagagc cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 660
gtcctcaccg tctctcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc 720
aaciaaaggcc tcccgtctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 780
gagccacagc tgtacacct gcccccctc caggagagga tgaccaagaa ccaggtcagc 840
ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 900
gggcagcccg agaacaact caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960
ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggggggaa tgtcttctca 1020
tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctcccgtcc 1080
ctaggtaaaa tgttttgggt gctgggtggg gttgggtggg tcttggtctg ctatagcttg 1140
ctagtaacag tggcctttat tattttctgg gtgaggagta agaggagcag gggcggacac 1200
agtactaca tgaacatgac tcccgcgccc cctgggccc cccgcaagca ttaccagccc 1260
tatgccccac cagcgcactt cgcagccgga ggtggcggag gtggcaaac gggcagaaag 1320
aaactcctgt atatatcaa acaaccattt atgagaccag tacaactac tcaagaggaa 1380
gatggctgta gctgcccatt tccagaagaa gaagaaggag gatgtgaact gggaggtggc 1440
agagtgaagt tcagcaggag cgcagaccgc cccgctacc agcagggcca gaaccagctc 1500
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgat ttttgacaa gagacgtggc 1560
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 1620
gaactgcaga aagataagat ggcggagggc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 1680
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 1740
tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgtctga 1779

5 <210> 41
<211> 544
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 41

ggatctgca tcgctccggt gcccgctcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg 60
agaagtggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa 120
actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgaggtggg ggagaacctg 180
atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac 240
agctgaagct tcgaggggct cgcattctct cttcacgcgc ccgccgccct acctgaggcc 300
gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtgggtgc tcttgaactg 360
cgtccgccgt ctaggttaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc 420
cttgagacct acctagactc agccggctct ccaagctttg cctgacctg cttgctcaac 480
tctactctct tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc 540
ctac 544

ES 2 899 174 T3

<210> 42
 <211> 1494
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 42

10

```

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg      60
atcccaggcc ctgtgcctcc ctctacagcc ctcaggtacc tcattgagga gctggtaaac      120
atcaccagca accagaagcc tccgctctgc aatggcagca tggatggag catcaacctg      180
acagctggca tgtactgtgc agccctggaa tccctgatca acgtgtcagg ctgcagtgcc      240
atcgagaaga cccagagatg gctgagcggg ttctgccccg acaaggtctc agctgggcag      300
ttttccagct tgcattgtcc agacacccaa atcgaggtgg cccagtttgt aaagacctg      360
ctcttacatt taaagaaact ttttcgagag ggacgggtca acgagtcctc atatggtccc      420
ccatgcccac catgcccagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctgttcccc      480
ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggaccctcg aggtcacgtg cgtggtggtg      540
gacgtgagcc aggaagaccc cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg      600
cataatgcca agacaaagcc gcgggagagg cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc      660
gtcctcaccg tctctcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc      720
aacaaaggcc tcccgtcctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga      780
gagccacagg tgtacacctc gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc      840
ctgacctgcc tgggtcaaag cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat      900
gggcagcccg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc      960
ttcctctaca gcaggttaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca     1020
tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctcccctgtc     1080
ctaggtaaaa tggccctgat tgtgctgggg ggcgtgcccg gcctcctgct tttcattggg     1140
ctaggcatct tcttcagagt gaagttcagc aggagcagc acgccccgcg gtaccagcag     1200
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg     1260
gacaagagac gtggcggcgg ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag     1320
gaagccctgt acaatgaaat gcagaaaagt aagatggcgg aggcctacag tgagattggg     1380
atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca     1440
gccaccaagc acacctacga cgcctctcac atgcaggccc tgccccctcg ctga         1494
    
```

<210> 43
 <211> 268
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 43

```

gacatgataa gatacattga tgagtttggg caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa      60
tgctttatct gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg     120
ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt     180
ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca     240
aatgtggtag atccatttaa atgttagc                                     268
    
```

20

<210> 44
 <211> 748
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

<400> 44

ES 2 899 174 T3

gaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg cgcgcttgct 60
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 120
 gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 180
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccgatac ctgtccgcct ttctcccttc 240
 ggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggat ctcagttcgg tgtaggctgt 300
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttacc 360
 cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 420
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 480
 gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 540
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 600
 cggtagtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgaga aaaaaggat ctcaagaaga 660
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 720
 tttggtcatg gctagttaat taagctgc 748

5 <210> 45
 <211> 187
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 45
 aataaacaat cattatthttc attggatctg tgtgttggtt ttttgtgtgg gcttggggga 60
 gggggaggcc agaatgactc caagagctac aggaaggcag gtcagagacc ccaactggaca 120
 aacagtggct ggactctgca ccataacaca caatcaacag gggagtgagc tggatcgagc 180
 tagagtc 187

15 <210> 46
 <211> 811
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 46
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 60
 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 120
 atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180
 aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 240
 catgacotta tgggaacttc ctacttgca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 300
 catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggttg actcacgggg 360
 atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 420
 ggactttcca aaatgctgta acaactccgc ccattgacg caaatggcg gtagcgtgt 480
 acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg 540
 ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgcggccg 600
 ggaacgggtc attggaacgc ggattccccg tgccaagagt gacgtaagta ccgcctatag 660
 agtctatagg cccacctagt tgtgaccggc gcctagtgtt gacaattaat catcggcata 720
 gtataatacg actcaactata ggagggccac catgtcgact actaaccttc ttctctttcc 780
 tacagctgag atcacogta ggagggccat c 811

25 <210> 47
 <211> 2076
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 47

atgaaaaagc ctgaaactcac cgcgacgtct gtcgcaagt ttctgatcga aaagtctgac 60
 agcgtctccg acctgatgca gctctcggag ggcgaagaat ctcgtgcttt cagcttcgat 120
 gtaggagggc gtggatatgt cctgcgggta aatagctgcg ccgatggttt ctacaaagat 180
 cgttatgttt atcggcactt tgcacatgcc gcgctcccga ttccggaagt gcttgacatt 240
 ggggaattca gcgagagcct gacctattgc atctcccgcc gtgcacaggg tgtcacgttg 300
 caagacctgc ctgaaaccga actgcccgtt gttctgcaac ccgtcgggga gctcatggat 360
 gcgatcgtcg cggccgatct tagccagacg agcgggttcg gccatttcg accgcaagga 420
 atcggccaat acactacatg gcgtgatctt atatgcgcga ttgctgatcc ccatgtgat 480
 cactggcaaa ctgtgatgga cgacaccgtc agtgcgtccg tcgcgcaggc tctcgatgag 540
 ctgatgcttt gggccgagga ctgccccgaa gtccggcacc tcgtgcacgc ggatttcggc 600
 tccaacaatg tcttgacgga caatggccgc ataacagcgg tcattgactg gagcgaggcg 660
 atgttcgggg attcccaata cgaggtcgcc aacatcttct tctggaggcc gtggttggt 720
 tgtatggagc agcagacgcg ctacttcgag cggaggcatc cggagcttgc aggatcgcg 780
 cggctccggg cgtatatgct ccgcattggt cttgaccaac tctatcagag cttggttgac 840
 ggcaatttcg atgatgcagc ttggggcagc ggtcgatgcg acgcaatcgt ccgatccgga 900
 gccgggactg tcggggctac acaaatcgcc cgcagaagcg cggccgtctg gaccgatggc 960
 tgtgtagaag tcgcgtctcg gttcgaccag gctgcgcggt ctgcgggcca tagcaaccga 1020
 cgtacggcgt tgccccctcg ccggcagcaa gaagccacgg aagtccgccc ggagcagaaa 1080
 atgcccacgc tactcggggt ttatatagac ggtccccacg ggatggggaa aaccaccacc 1140
 acgcaactgc tgggtggcct gggttcgcgc gacgatatcg tctacgtacc cgagccgatg 1200
 acttactggc ggggtcgtgg ggcttccgag acaatcgcga acatctacac cacacaacac 1260
 cgctcagacc agggtgagat atcggccggg gacgcggcgg tggtaatgac aagcggccag 1320
 ataacaatgg gcatgoccta tgccgtgacc gacgcggttc tggtcctca tatcgggggg 1380
 gaggctggga gctcacatgc cccgccccgc gccctcacc tcatcttca cggccatccc 1440
 atcgcgccc tctctgtgta cccggccgcg cggtagctta tgggcagcat gacccccag 1500
 gccgtgctgg cgttcgtggc cctcatccc ccgacctgc ccggcacaa catcgtgctt 1560
 ggggcccttc cggaggacag acacatcgac cgcctggcca aacgccagcg ccccggcgag 1620
 cggctggacc tggctatgct ggctgcgatt cgcgcgctt acgggctact tgccaatacg 1680
 gtgcggtatc tgcagtgcgc cgggtcgtgg cgggaggact ggggacagct ttcggggagc 1740
 gccgtgccgc cccagggtgc cgagccccag agcaacgcgg gccacagacc ccatatcggg 1800
 gacacgttat ttacctgtt tcgggcccc gagttgctgg cccccaacgg cgacctgat 1860
 aacgtgtttg cctgggcctt ggacgtctt gccaaacgcc tccgttccat gcacgtcttt 1920
 atcctggatt acgaccaatc gcccgccggc tgccgggagc cctgctgca acttacctcc 1980
 gggatggtcc agaccacgt caccaccccc ggctccatac cgacgatatg cgacctggcg 2040
 cgcacgtttg cccgggagat gggggaggct aactga 2076

5

<210> 48
 <211> 299
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 48

ES 2 899 174 T3

	gtcgagaatt cgctagaggg ccctattcta tagtgcacc taaatgctag agctcgctga	60
	tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttgcccctc ccccgtcct	120
	tccttgacc tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca	180
	tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg gggggggca ggacagcaag	240
	ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat gcgcagggcc caattgctcg agcggccgc	299
	<210> 49 <211> 75 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
5		
	<220> <223> oligonucleótido con homología con el gen de la fiebre aftosa	
10		
	<400> 49	
	tctagaggag catgccagct gttgaatddd gaccttctta agcttgccgg agacgtcgag	60
15	tccaaccctg ggccc	75
	<210> 50 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20		
	<400> 50 caagaatccc aaactcacca g 21	
25		
	<210> 51 <211> 23 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30		
	<400> 51 cgttgatatt gctgattaag tcc 23	
	<210> 52 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35		
	<400> 52 atcccagtaa tgggtgcct gcct 24	
40		
	<210> 53 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45		
	<400> 53 tcttgcttag gttggctgcc tagt 24	

REIVINDICACIONES

1. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que está codificado por el ADN de SEQ ID NO: 39.
- 5 2. Un linfocito T aislado que expresa el CAR de la reivindicación 1.
3. Un linfocito T que expresa el CAR de la reivindicación 1 para uso en inmunoterapia contra el cáncer.
- 10 4. Un linfocito T de la reivindicación 3, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, meduloblastoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi, leucemia mielógena aguda y neoplasias malignas de linaje B.

FIG. 1

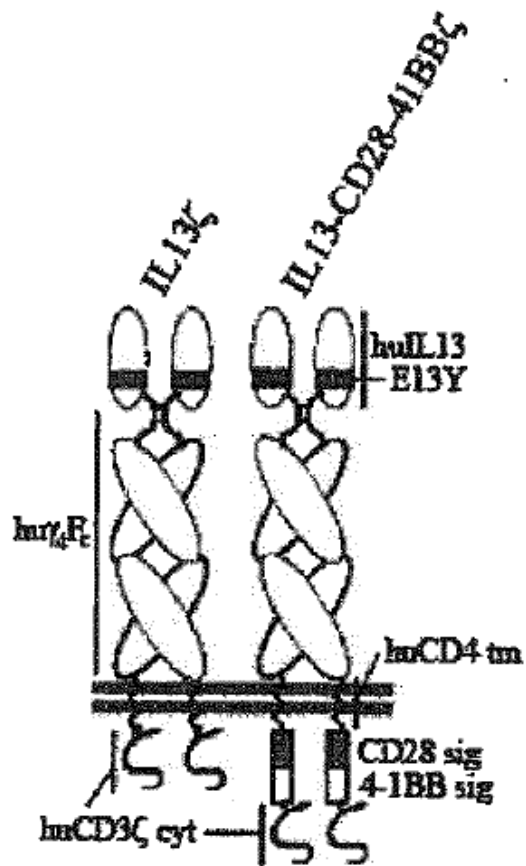


FIG. 2

```

IL13P1
-----
      M A L L L T T V I A L T C L G G F
1  TATGAATTCA TGGCGCTTTT GTTGACCACG GTCATTGCTC TCACTTGCCT TGGCGGCTTT
   A T A C T T A A G T A C C G C G A A A A C A A C T G G T G C C A G T A A C G A G A G T G A A C G G A A C C G C C G A A A
      IL13P1
----->
<-----
      IL13P2
      A S P G P V P P S T A L R Y L I E E L V
61  GCCTCCCCAG GCCCTGTGCC TCCCTCTACA GCCCTCAGGT ACCTCATTGA GGAGCTGGTC
   C G G A G G G G T C C G G G A C A C G G A G G G A G A T G T C G G G A G T C C A T G G A G T A A C T C C T C G A C C A G

      N I T Q N Q K A P L C N G S M V W S I N
121 AACATCACCC AGAACCAGAA GGCTCCGCTC TGCAATGGCA GCATGGTATG GAGCATCAAC
   T T G T A G T G G G T C T T G G T C T T C C G A G G C G A G A C G T T A C C G T C G T A C C A T A C C T C G T A G T T G
-----
      IL13P2
-----<-----
      IL13P3
      L T A G M Y C A A L E S L I N V S G C S
181 CTGACAGCTG GCATGTACTG TGCAGCCCTG GAATCCCTGA TCAACGTGTC AGGCTGCAGT
   G A C T G T C G A C C G T A C A T G A C A C G T C G G G A C C T T A G G G A C T A G T T G C A C A G T C C G A C G T C A
-----
      IL13P3
      A I E K T Q R M L S G F C P H K V S A G
241 GCCATCGAGA AGACCCAGAG GATGCTGAGC GGATTCTGCC CGCACAAGGT CTCAGCTGGG
   C G G T A G C T C T C T G G G T C T C T A C G A C T C G C C T A A G A C G G G C G T G T T C C A G A G T C G A C C C
-----
      IL13P3
<-----
      IL13P4
      Q F S S L H V R D T K I E V A Q F V K D
301 CAGTTTTCCA GCTTGCATGT CCGAGACACC AAAATCGAGG TGGCCCAGTT TGTAAGGAC
   G T C A A A A G G T C G A A C G T A C A G G C T C T G T G G T T T T A G C T C C A C C G G G T C A A A C A T T T C C T G
-----
      IL13P4
<-----
      IL13P5
      L L L H L K K L F R E G R F N * (SEQ ID NO:1)
361 CTGCTCTTAC ATTTAAAGAA ACTTTTTCCG GAGGGACGGT TCAACTGAGG ATCCGA (SEQ ID NO:2)
   G A C G A G A A T G T A A A T T T C T T G A A A A G C G C T C C C T G C C A A G T T G A C T C C T A G G C T (SEQ ID NO:3)

```

FIG. 3A

				M	L	L	L	V	T	S	L	L	L	C	E	L	P				
1	ATCTCTAGAG	CCGCCACCAT	GCTTCTCCTG	GTGACAAGCC	TTCTGCTCTG	TGAGTTACCA															
	TAGAGATCTC	GGCGGTGGTA	CGAAGAGGAC	CACTGTTCGG	AAGACGAGAC	ACTCAATGGT															
		H	P	A	F	L	L	I	P	G	P	V	P	P	S	T	A	L	R	Y	L
61	CACCCAGCAT	TCCTCCTGAT	CCCAGGCCCT	GTGCCTCCCT	CTACAGCCCT	CAGGTACCTC															
	GTGGGTTCGTA	AGGAGGACTA	GGGTCCGGGA	CACGGAGGGA	GATGTCCGGGA	GTCCATGGAG															
		I	E	E	L	V	N	I	T	Q	N	Q	K	A	P	L	C	N	G	S	M
121	ATTGAGGAGC	TGGTCAACAT	CACCCAGAAC	CAGAAGGCTC	CGCTCTGCAA	TGGCAGCATG															
	TAACTCCTCG	ACCAGTTGTA	GTGGGTCTTG	GTCTTCCGAG	GCGAGACGTT	ACCGTCGTAC															
		V	W	S	I	N	L	T	A	G	M	Y	C	A	A	L	E	S	L	I	N
181	GTATGGAGCA	TCAACCTGAC	AGCTGGCATG	TACTGTGCAG	CCCTGGAATC	CCTGATCAAC															
	CATACCTCGT	AGTTGGACTG	TCGACCGTAC	ATGACACGTC	GGGACCTTAG	GGACTAGTTG															
		V	S	G	C	S	A	I	E	K	T	Q	R	M	L	S	G	F	C	P	H
241	GTGTCAGGCT	GCAGTGCCAT	CGAGAAGACC	CAGAGGATGC	TGAGCGGATT	CTGCCCGCAC															
	CACAGTCCGA	CGTCACGGTA	GCTCTTCTGG	GTCTCCTACG	ACTCGCCTAA	GACGGGCGTG															
		K	V	S	A	G	Q	F	S	S	L	H	V	R	D	T	K	I	E	V	A
301	AAGGTCTCAG	CTGGGCAGTT	TTCCAGCTTG	CATGTCCGAG	ACACCAAAT	CGAGGTGGCC															
	TTCCAGAGTC	GACCCGTCAA	AAGGTCGAAC	GTACAGGCTC	TGTGGTTTTA	GCTCCACCGG															
		Q	F	V	K	D	L	L	L	H	L	K	K	L	F	R	E	G	R	F	N
361	CAGTTTGTA	AGGACCTGCT	CTTACATTTA	AAGAACTTT	TTCGCGAGGG	ACGGTTCAAC															
	GTCAAACATT	TCCTGGACGA	GAATGTAAAT	TTCTTTGAAA	AAGCGCTCCC	TGCCAAGTTG															
		E	S	K	Y	G	P	P	C	P	P	C	P	A	P	E	F	L	G	G	P
421	GAGTCCAAAT	ATGGTCCCC	ATGCCACCA	TGCCCAGCAC	CTGAGTTCCT	GGGGGGACCA															
	CTCAGGTTTA	TACCAGGGGG	TACGGGTGGT	ACGGGTCGTG	GACTCAAGGA	CCCCCTGGT															
		S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E
481	TCAGTCTTCC	TGTTCCCCC	AAAACCCAAG	GACACTCTCA	TGATCTCCCG	GACCCCTGAG															
	AGTCAGAAGG	ACAAGGGGGG	TTTGGGTTTC	CTGTGAGAGT	ACTAGAGGGC	CTGGGGACTC															
		V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	F	N	W	Y
541	GTCACGTGCG	TGGTGGTGGA	CGTGAGCCAG	GAAGACCCCG	AGGTCCAGTT	CAACTGGTAC															
	CAGTGCACGC	ACCACCACCT	GCACTCGGTC	CTTCTGGGGC	TCCAGGTCAA	GTTGACCATG															
		V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S
601	GTGGATGGCG	TGGAGGTGCA	TAATGCCAAG	ACAAAGCCGC	GGGAGGAGCA	GTTCAACAGC															
	CACCTACCGC	ACCTCCACGT	ATTACGGTTC	TGTTTCGGCG	CCCTCCTCGT	CAAGTTGTCTG															

FIG. 3B

T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
 661 ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG
 TGCATGGCAC ACCAGTCGCA GGAGTGGCAG GACGTGGTCC TGACCGACTT GCCGTTCCCTC

Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K
 721 TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC CCGTCCTCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA
 ATGTTACAGT TCCAGAGGTT GTTCCGGAG GGCAGGAGGT AGCTCTTTTG GTAGAGGTTT

A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M
 781 GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA GCCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCA GGAGGAGATG
 CGGTTTCCCG TCGGGGCTCT CGGTGTCCAC ATGTGGGACG GGGGTAGGGT CCTCCTCTAC

T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A
 841 ACCAAGAACC AGGTCAACCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCCAG CGACATCGCC
 TGGTTCTTGG TCCAGTCGGA CTGGACGGAC CAGTTTCCGA AGATGGGGTC GCTGTAGCGG

V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
 901 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC TCCCCTGCTG
 CACCTCACCC TCTCGTTACC CGTCGGCCTC TTGTTGATGT TCTGGTGCGG AGGGCACGAC

D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q
 961 GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AGGCTAACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG
 CTGAGGCTGC CGAGGAAGAA GGAGATGTCG TCCGATTGGC ACCTGTTCTC GTCCACCGTC

E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
 1021 GAGGGGAATG TCTTCTCATG CTCCGTGATG CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACACAG
 CTCCCCTTAC AGAAGAGTAC GAGGCACTAC GTACTCCGAG ACGTGTGGT GATGTGTGTC

K S L S L S L G K M A L I V L G G V A G
 1081 AAGAGCCTCT CCCTGTCTCT GGGTAAAATG GCCCTGATTG TGCTGGGGGG CGTCGCCGGC
 TTCTCGGAGA GGGACAGAGA CCCATTTTAC CGGGACTAAC ACGACCCCCC GCAGCGGGCCG

L L L F I G L G I F F R V K F S R S A D
 1141 CTCCTGCTTT TCATTGGGCT AGGCATCTTC TTCAGAGTGA AGTTCAGCAG GAGCGCAGAC
 GAGGACGAAA AGTAACCCGA TCCGTAGAAG AAGTCTCACT TCAAGTCGTC CTCGCGTCTG

A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R
 1201 GCCCCCGCGT ACCAGCAGGG CCAGAACCAG CTCTATAACG AGCTCAATCT AGGACGAAGA
 CGGGGGCGCA TGGTCGTCCC GGTCTTGCTC GAGATATTGC TCGAGTTAGA TCCTGCTTCT

E E Y D V L D K R R G R D P E M G G K P
 1261 GAGGAGTACG ATGTTTTGGA CAAGAGACGT GGCCGGGACC CTGAGATGGG GGGAAAGCCG
 CTCCTCATGC TACAAAACCT GTTCTCTGCA CCGGCCCTGG GACTCTACCC CCCTTTCCGGC

FIG. 3C

```

      R R K   N P Q E   G L Y   N E L   Q K D K   M A E
1321 AGAAGGAAGA ACCCTCAGGA AGGCCTGTAC AATGAACTGC AGAAAGATAA GATGGCGGAG
      TCTTCCTTCT TGGGAGTCCT TCCGGACATG TTACTTGACG TCTTTCTATT CTACCGCCTC

      A Y S   E I G M   K G E   R R R   G K G H   D G L
1381 GCCTACAGTG AGATTGGGAT GAAAGGCGAG CGCCGGAGGG GCAAGGGGCA CGATGGCCTT
      CGGATGTCAC TCTAACCCTA CTTTCCGCTC GCGGCCTCCC CGTTCCCCGT GCTACCGGAA

      Y Q G   L S T A   T K D   T Y D   A L H M   Q A L
1441 TACCAGGGTC TCAGTACAGC CACCAAGGAC ACCTACGACG CCCTTCACAT GCAGGCCCTG
      ATGGTCCCAG AGTCATGTCG GTGGTTCCTG TGGATGCTGC GGAAGTGTA CGTCCGGGAC

      P P R   *   (SEQ ID NO:4)
1501 CCCCCTCGCT AAGCGGCCGC AT   (SEQ ID NO:5)
      GGGGAGCGA TTCGCCGCG TA   (SEQ ID NO:6)

```

Péptido señal alfa GM-CSFR (nucleótidos 18-84; SEQ ID NO: 7)
 IL13 (EmY) (nucleótidos 85-420; SEQ ID NO: 8)
 IgG4 (SmP) (nucleótidos 421-1107; SEQ ID NO: 9)
 CD4tm (nucleótidos 1108-1173; SEQ ID NO: 10)
 CD3 zeta (nucleótidos 1174-1512; SEQ ID NO: 11)

FIG. 4

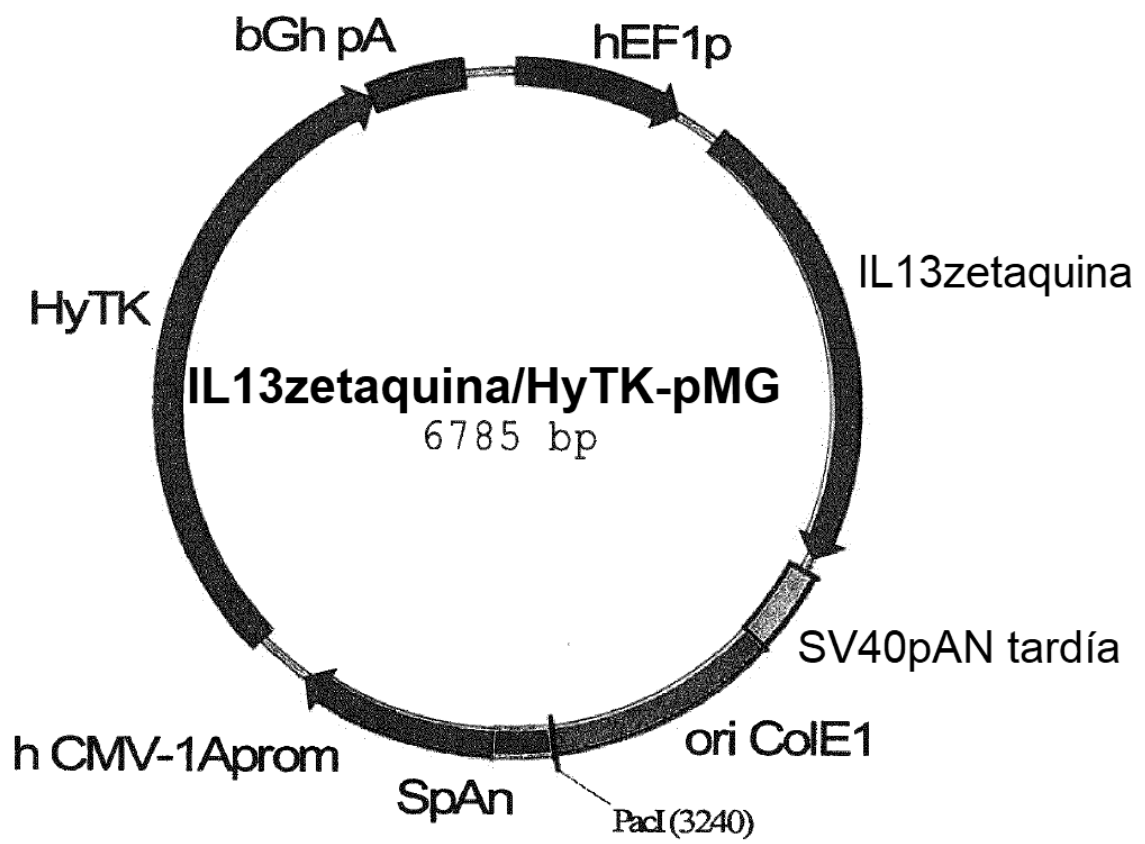


FIG. 5A

(hEF1p-)

```

1   TCGAAGGATC TCGGATCGCT CCGGTGCCCG TCAGTGGGCA GAGCGCACAT CGCCCACAGT
   AGCTTCCTAG ACGCTAGCGA GGCCACGGGC AGTCACCCGT CTCGCGTGTA GCGGGTGTCA

61  CCCCAGAGAAG TTGGGGGGAG GGGTCGGCAA TTGAACCGGT GCCTAGAGAA GGTGGCGCGG
   GGGGCTCTTC AACCCCCCTC CCCAGCCGTT AACTTGGCCA CGGATCTCTT CCACCGCGCC

121 GGTAAACTGG GAAAGTGATG TCGTGACTG GCTCCGCCTT TTTCCCGAGG GTGGGGGAGA
   CCATTTGACC CTTTCACTAC AGCACATGAC CGAGGCGGAA AAAGGGCTCC CACCCCCTCT

181 ACCGTATATA AGTGCAGTAG TCGCCGTGAA CGTTCTTTTT CGCAACGGGT TTGCCGCCAG
   TGGCATATAT TCACGTCATC AGCGGCACTT GCAAGAAAAA GCGTTGCCCA AACGGCGGTC

241 AACACAGCTG AAGCTTCGAG GGGCTCGCAT CTCTCCTTCA CGCGCCCGCC GCCCTACCTG
   TTGTGTGAC TTCGAAGCTC CCCGAGCGTA GAGAGGAAGT GCGCGGGCGG CGGGATGGAC

301 AGGCCGCCAT CCACGCCGGT TGAGTCGCGT TCTGCCGCCT CCCGCCTGTG GTGCCTCCTG
   TCCGGCGGTA GGTGCGGCCA ACTCAGCGCA AGACGGCGGA GGGCGGACAC CACGGAGGAC

361 AACTGCGTCC GCCGTCTAGG TAAGTTTAAA GCTCAGGTCG AGACCGGGCC TTTGTCCGGC
   TTGACGCAGG CGGCAGATCC ATTCAAATTT CGAGTCCAGC TCTGGCCCCG AAACAGGCCG

421 GCTCCCTTGG AGCCTACCTA GACTCAGCCG GCTCTCCACG CTTTGCCTGA CCCTGCTTGC
   CGAGGGAACC TCGGATGGAT CTGAGTCGGC CGAGAGGTGC GAAACGGACT GGGACGAACG

481 TCAACTCTAC GTCTTTGTTT CGTTTTCTGT TCTGCGCCGT TACAGATCCA AGCTGTGACC
   AGTTGAGATG CAGAAACAAA GCAAAGACA AGACGCGGCA ATGTCTAGGT TCGACACTGG

541 GGCGCCTACG TAAGTGATAT CTA TAGATT TATCAAAAAG AGTGTTGACT TGTGAGCGCT
   CCGCGGATGC ATTCACTATA GATGATCTAA ATAGTTTTTC TCACA ACTGA AACTCGCGA

601 CACAATTGAT ACGGATTCAT CGAGAGGGAC ACGTCGACTA CTAACCTTCT TCTCTTTCCT
   GTGTAACTA TGCCTAAGTA GCTCTCCCTG TGCAGCTGAT GATTGGAAGA AGAGAAAGGA

```

FIG. 5B

(IL13zetaquina→)

M L L L V T S L L L

661 ACAGCTGAGA TCACCCTAGA GCCGCCACCA TGCTTCTCCT GGTGACAAGC CTTCTGCTCT
TGTCGACTCT AGTGGGATCT CGGCGGTGGT ACGAAGAGGA CCACTGTTCG GAAGACGAGA

C E L P H P A F L L I P G P V P P S T A

721 GTGAGTTACC ACACCCAGCA TTCCTCCTGA TCCCAGGCC TGTGCCTCCC TCTACAGCCC
CACTCAATGG TGTGGGTCGT AAGGAGGACT AGGGTCCGGG ACACGGAGGG AGATGTCCGG

L R Y L I E E L V N I T Q N Q K A P L C

781 TCAGGTACCT CATTGAGGAG CTGGTCAACA TCACCCAGAA CCAGAAGGCT CCGCTCTGCA
AGTCCATGGA GTAACCTCCTC GACCAGTTGT AGTGGGTCTT GGTCTTCCGA GGCGAGACGT

N G S M V W S I N L T A G M Y C A A L E

841 ATGGCAGCAT GGTATGGAGC ATCAACCTGA CAGCTGGCAT GTACTGTGCA GCCCTGGAAT
TACCGTCGTA CCATACCTCG TAGTTGGACT GTCGACCGTA CATGACACGT CGGGACCTTA

S L I N V S G C S A I E K T Q R M L S G

901 CCCTGATCAA CGTGTCCAGGC TGCAGTGCCA TCGAGAAGAC CCAGAGGATG CTGAGCGGAT
GGGACTAGTT GCACAGTCCG ACGTCACGGT AGCTCTTCTG GGTCTCCTAC GACTCGCCTA

F C P H K V S A G Q F S S L H V R D T K

961 TCTGCCCCGA CAAGGTCTCA GCTGGGCAGT TTTCCAGCTT GCATGTCCGA GACACCAAAA
AGACGGGCGT GTTCCAGAGT CGACCCGTCA AAAGGTGCGA CGTACAGGCT CTGTGGTTTT

I E V A Q F V K D L L L H L K K L F R E

1021 TCGAGGTGGC CCAGTTTGTA AAGGACCTGC TCTTACATTT AAAGAACTT TTTCGCGAGG
AGCTCCACCG GGTCAAACAT TTCCTGGACG AGAATGTAAA TTTCTTTGAA AAAGCGCTCC

G R F N E S K Y G P P C P P C P A P E F

1081 GACGGTTCAA CGAGTCCAAA TATGGTCCCC CATGCCACC ATGCCAGCA CCTGAGTTCC
CTGCCAAGTT GCTCAGGTTT ATACCAGGGG GTACGGGTGG TACGGGTCGT GGACTIONAAG

L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S

1141 TGGGGGGACC ATCAGTCTTC CTGTTCCCC CAAAACCCAA GGACACTCTC ATGATCTCCC
ACCCCCCTGG TAGTCAGAAG GACAAGGGGG GTTTTGGGTT CCTGTGAGAG TACTAGAGGG

FIG. 5C

R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q
 1201 GGACCCCTGA GGTACAGTGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGACCCC GAGGTCCAGT
 CCTGGGGACT CCAGTGCACG CACCACCACC TGCACCTCGGT CCTTCTGGGG CTCCAGGTCA

F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
 1261 TCAACTGGTA CGTGGATGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC
 AGTTGACCAT GCACCTACCG CACCTCCACG TATTACGGTT CTGTTTCGGC GCCCTCCTCG

Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
 1321 AGTTCAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA
 TCAAGTTGTC GTGCATGGCA CACCAGTCGC AGGAGTGGCA GGACGTGGTC CTGACCGACT

N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K
 1381 ACGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCGTCTCTC ATCGAGAAAA
 TGCCGTTCTT CATGTTACAG TTCCAGAGGT TGTTTCCGGA GGGCAGGAGG TAGCTCTTTT

T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
 1441 CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AGCCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC
 GGTAGAGGTT TCGGTTTCCC GTCGGGGCTC TCGGTGTCCA CATGTGGGAC GGGGGTAGGG

Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P
 1501 AGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTACCCCA
 TCCTCCTCTA CTGGTTCTTG GTCCAGTCGG ACTGGACGGA CCAGTTTCCG AAGATGGGGT

S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
 1561 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACACTAC AAGACCACGC
 CGCTGTAGCG GCACCTCACC CTCTCGTTAC CCGTCGGCCT CTTGTTGATG TTCTGGTGCG

P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K
 1621 CTCCCCTGCT GGAATCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAGGCTAACC GTGGACAAGA
 GAGGGCACGA CCTGAGGCTG CCGAGGAAGA AGGAGATGTC GTCCGATTGG CACCTGTTCT

S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N
 1681 GCAGGTGGCA GGAGGGGAAT GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
 CGTCCACCGT CCTCCCCTTA CAGAAGAGTA CGAGGCACTA CGTACTCCGA GACGTGTTGG

FIG. 5D

H Y T Q K S L S L S L G K M A L I V L G
 1741 ACTACACACA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC TAGGTAAAAT GGCCCTGATT GTGCTGGGGG
 TGATGTGTGT CTTCTCGGAG AGGGACAGGG ATCCATTTTA CCGGGACTAA CACGACCCCC

 G V A G L L L F I G L G I F F R V K F S
 1801 GCGTCGCCGG CCTCCTGCTT TTCATTGGGC TAGGCATCTT CTTCAGAGTG AAGTTCAGCA
 CGCAGCGGCC GGAGGACGAA AAGTAACCCG ATCCGTAGAA GAAGTCTCAC TTCAAGTCGT

 R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N
 1861 GGAGCGCAGA CGCCCCGCG TACCAGCAGG GCCAGAACCA GCTCTATAAC GAGCTCAATC
 CCTCGCTCT GCGGGGGCGC ATGGTCGTCC CGGTCTTGGT CGAGATATTG CTCGAGTTAG

 L G R R E E Y D V L D K R R G R D P E M
 1921 TAGGACGAAG AGAGGAGTAC GATGTTTTGG ACAAGAGACG TGGCCGGGAC CCTGAGATGG
 ATCCTGCTTC TCTCCTCATG CTACAAAACC TGTTCTCTGC ACCGGCCCTG GGACTCTACC

 G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D
 1981 GGGAAAGCC GAGAAGGAAG AACCCCTCAGG AAGGCCTGTA CAATGAACTG CAGAAAGATA
 CCCCTTTCGG CTCTTCCTTC TTGGGAGTCC TTCCGGACAT GTTACTTGAC GTCTTTCTAT

 K M A E A Y S E I G M K G E R R R G K G
 2041 AGATGGCGGA GGCCTACAGT GAGATTGGGA TGAAAGGCGA GCGCCGGAGG GGCAAGGGGG
 TCTACCGCCT CCGGATGTCA CTCTAACCT ACTTTCCGCT CGCGGCCTCC CCGTTCCCCG

 H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H
 2101 ACGATGGCCT TTACCAGGGT CTCAGTACAG CCACCAAGGA CACCTACGAC GCCCTTCACA
 TGCTACCGGA AATGGTCCCA GAGTCATGTC GGTGGTTCCT GTGGATGCTG CGGGAAGTGT

 M Q A L P P R *
 2161 TGCAGGCCCT GCCCCCTCGC TGAGCGGCCG GCGAAGGAGG CCTAGATCTA TCGATTGTAC
 ACGTCCGGGA CGGGGGAGCG ACTCGCCGGC CGCTTCCTCC GGATCTAGAT AGCTAACATG

 (Tardía SV40pAn-)
 2221 AGCTAGCTCG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC AAACCACAAC TAGAATGCAG
 TCGATCGAGC TGTACTATTC TATGTAATA CTCAAACCTG TTTGGTGTG ATCTTACGTC

FIG. 5E

2281 TGAAAAAAT GCTTTATTTG TGAAATTTGT GATGCTATTG CTTTATTTGT GAAATTTGTG
 ACTTTTTTTA CGAAATAAAC ACTTTAAACA CTACGATAAC GAAATAAACA CTTTAAACAC

2341 ATGCTATTGC TTTATTTGTA ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT
 TACGATAACG AAATAAACAT TGGTAATATT CGACGTTATT TGTTCAATTG TTGTTGTTAA

2401 GCATTCATTT TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
 CGTAAGTAAA ATACAAAGTC CAAGTCCCCC TCCACACCCT CCAAAAAATT TCGTTCATTT

(Ori ColE1→)

2461 ACCTCTACAA ATGTGGTAGA TCCATTTAAA TGTTAGCGAA GAACATGTGA GCAAAGGCC
 TGGAGATGTT TACACCATCT AGGTAAATTT ACAATCGCTT CTTGTACACT CGTTTTCCGG

2521 AGCAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC
 TCGTTTTCCG GTCCTTGGCA TTTTTCCGGC GCAACGACCG CAAAAGGTA TCCGAGGCGG

2581 CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC
 GGGGACTGCT CGTAGTGTTT TTAGCTGCGA GTTCAGTCTC CACCGCTTTG GGCTGTCTG

2641 TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC
 ATATTTCTAT GGTCCGCAAA GGGGGACCTT CGAGGGAGCA CGCGAGAGGA CAAGGCTGGG

2701 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT
 ACGGCGAATG GCCTATGGAC AGGCGGAAAG AGGGAAGCCC TTCGCACCGC GAAAGAGTTA

2761 GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTTCGTTG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
 CGAGTGCAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC GAGGTTGAC CCGACACAG

2821 ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CTTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA
 TGCTTGGGGG GCAAGTCGGG CTGGCGACGC GGAATAGGCC ATTGATAGCA GAACTCAGGT

2881 ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG
 TGGGCCATTC TGTGCTGAAT AGCGGTGACC GTCGTCGGTG ACCATTGTCC TAATCGTCTC

2941 CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA
 GCTCCATACA TCCGCCACGA TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CGGATTGATG CCGATGTGAT

FIG. 5F

3001 GAAGAACAGT ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG
 CTTCTTGTCA TAAACCATAG ACGCGAGACG ACTTCGGTCA ATGGAAGCCT TTTTCTCAAC

3061 GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC
 CATCGAGAAC TAGGCCGTTT GTTTGGTGGC GACCATCGCC ACCAAAAAAA CAAACGTTCC

3121 AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT
 TCGTCTAATG CCGTCTTTT TTTCCTAGAG TTCTTCTAGG AAACCTAGAAA AGATGCCCCA

PacI
 ~~~~~

3181 CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGGCT AGTTAATTTAA  
 GACTGCGAGT CACCTTGCTT TTGAGTGCAA TTCCCTAAAA CCAGTACCGA TCAATTAATT

(SpAn-)

3241 GCTGCAATAA ACAATCATTA TTTTCATTGG ATCTGTGTGT TGGTTTTTTT TGTGGGCTTG  
 CGACGTTATT TGTTAGTAAT AAAAGTAACC TAGACACACA ACCAAAAAAC ACACCCGAAC

3301 GGGGAGGGGG AGGCCAGAAT GACTCCAAGA GCTACAGGAA GGCAGGTCAG AGACCCCACT  
 CCCCTCCCCC TCCGGTCTTA CTGAGGTTCT CGATGTCCTT CCGTCCAGTC TCTGGGGTGA

3361 GGACAAACAG TGGCTGGACT CTGCACCATA ACACACAATC AACAGGGGAG TGAGCTGGAT  
 CCTGTTTGTC ACCGACCTGA GACGTGGTAT TGTGTGTTAG TTGTCCCCTC ACTCGACCTA

(hCMV-1Aprom-)

3421 CGAGCTAGAG TCCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA  
 GCTCGATCTC AGGCAATGTA TTGAATGCCA TTTACCGGGC GGACCGACTG GCGGGTTGCT

3481 CCCCCGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCATA GTAACGCCAA TAGGGACTTT  
 GGGGGCGGGT AACTGCAGTT ATTACTGCAT ACAAGGGTAT CATTGCGGTT ATCCCTGAAA

3541 CCATTGACGT CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT  
 GGTAACCTGCA GTTACCCACC TCATAAATGC CATTTGACGG GTGAACCGTC ATGTAGTTCA

3601 GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAATGGC CCGCCTGGCA  
 CATAGTATAC GGTTCATGCG GGGGATAACT GCAGTTACTG CCATTTACCG GCGGACCGT

FIG. 5G

3661 TTATGCCAG TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT  
AATACGGGTC ATGTACTGGA ATACCCTGAA AGGATGAACC GTCATGTAGA TGCATAATCA

3721 CATCGCTATT ACCATGGTGA TGCGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT  
GTAGCGATAA TGGTACCACT ACGCCAAAAC CGTCATGTAG TTACCCGCAC CTATCGCCAA

3781 TGA CTCACGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA  
ACTGAGTGCC CCTAAAGGTT CAGAGGTGGG GTA ACTGCAG TTACCCTCAA ACAA AACCGT

3841 CCAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG TAACA ACTCC GCCCATTGA CGCAAATGGG  
GGTTTTAGTT GCCCTGAAAG GTTTTACAGC ATTGTTGAGG CGGGGTA ACT GCGTTTACCC

3901 CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT AAGCAGAGCT CGTTTAGTGA ACCGTCAGAT  
GCCATCCGCA CATGCCACCC TCCAGATATA TTCGTCTCGA GCAAATCACT TGGCAGTCTA

3961 CGCCTGGAGA CGCCATCCAC GCTGTTTTGA CCTCCATAGA AGACACCGGG ACCGATCCAG  
GCGGACCTCT GCGGTAGGTG CGACAAA ACT GGAGGTATCT TCTGTGGCCC TGGCTAGGTC

4021 CCTCCGCGGC CGGGAACGGT GCATTGGAAC GCGGATTCCC CGTGCCAAGA GTGACGTAAG  
GGAGGCGCCG GCCCTTGCCA CGTAACCTTG CGCCTAAGGG GCACGGTTCT CACTGCATTC

4081 TACCGCCTAT AGAGTCTATA GGCCACCTA GTTGTGACCG GCGCCTAGTG TTGACAATTA  
ATGGCGGATA TCTCAGATAT CCGGGTGGAT CAACACTGGC CGCGGATCAC AACTGTTAAT

4141 ATCATCGGCA TAGTATAATA CGACTCACTA TAGGAGGGCC ACCATGTCGA CTACTAACCT  
TAGTAGCCGT ATCATATTAT GCTGAGTGAT ATCCTCCCGG TGGTACAGCT GATGATTGGA

(HyTK-)

M K K P E L

4201 TCTTCTCTTT CCTACAGCTG AGATCACCGG TAGGAGGGCC ATCATGAAAA AGCCTGAACT  
AGAAGAGAAA GGATGTCGAC TCTAGTGGCC ATCCTCCCGG TAGTACTTTT TCGGACTTGA

T A T S V A K F L I E K F D S V S D L M

4261 CACCGCGACG TCTGTCGCGA AGTTTCTGAT CGAAAAGTTC GACAGCGTCT CCGACCTGAT  
GTGGCGCTGC AGACAGCGCT TCAAAGACTA GCTTTTCAAG CTGTGCGAGA GGCTGGACTA

FIG. 5H

Q L S E G E E S R A F S F D V G G R G Y  
 4321 GCAGCTCTCG GAGGGCGAAG AATCTCGTGC TTTCAGCTTC GATGTAGGAG GCGTGGATA  
 CGTCGAGAGC CTCCCGCTTC TTAGAGCACG AAAGTCGAAG CTACATCCTC CCGCACCTAT

V L R V N S C A D G F Y K D R Y V Y R H  
 4381 TGTCCTGCGG GTAAATAGCT GCGCCGATGG TTTCTACAAA GATCGTTATG TTTATCGGCA  
 ACAGGACGCC CATTATATCGA CGCGGCTACC AAAGATGTTT CTAGCAATAC AAATAGCCGT

F A S A A L P I P E V L D I G E F S E S  
 4441 CTTTGCATCG GCCGCGCTCC CGATTCCGGA AGTGCTTGAC ATTGGGGAAT TCAGCGAGAG  
 GAAACGTAGC CGGCGCGAGG GCTAAGGCCT TCACGAACTG TAACCCCTTA AGTCGCTCTC

L T Y C I S R R A Q G V T L Q D L P E T  
 4501 CCTGACCTAT TGCATCTCCC GCCGTGCACA GGGTGTACAG TTGCAAGACC TGCCTGAAAC  
 GGACTGGATA ACGTAGAGGG CGGCACGTGT CCCACAGTGC AACGTTCTGG ACGGACTTTG

E L P A V L Q P V A E L M D A I A A A D  
 4561 CGAACTGCCC GCTGTTCTGC AACCCGTGCG GGAGCTCATG GATGCGATCG CTGCGGCCGA  
 GCTTGACGGG CGACAAGACG TTGGGCAGCG CCTCGAGTAC CTACGCTAGC GACGCCGGCT

L S Q T S G F G P F G P Q G I G Q Y T T  
 4621 TCTTAGCCAG ACGAGCGGGT TCGGCCATT CGGACCGCAA GGAATCGGTC AATACACTAC  
 AGAATCGGTC TGCTCGCCCA AGCCGGGTAA GCCTGGCGTT CCTTAGCCAG TTATGTGATG

W R D F I C A I A D P H V Y H W Q T V M  
 4681 ATGGCGTGAT TTCATATGCG CGATTGCTGA TCCCATGTG TATCACTGGC AAAGTGTGAT  
 TACCGCACTA AAGTATACGC GCTAACGACT AGGGGTACAC ATAGTGACCG TTTGACACTA

D D T V S A S V A Q A L D E L M L W A E  
 4741 GGACGACACC GTCAGTGCGT CCGTCGCGCA GGCTCTCGAT GAGCTGATGC TTTGGGCCGA  
 CCTGCTGTGG CAGTCACGCA GGCAGCGCGT CCGAGAGCTA CTCGACTACG AAACCCGGCT

D C P E V R H L V H A D F G S N N V L T  
 4801 GGACTGCCCC GAAGTCCGGC ACCTCGTGCA CGCGGATTTT GGCTCCAACA ATGTCCTGAC  
 CCTGACGGGG CTTCAGGCCG TGGAGCACGT GCGCCTAAAG CCGAGGTTGT TACAGGACTG



FIG. 5I

D N G R I T A V I D W S E A M F G D S Q  
 4861 GGACAATGGC CGCATAACAG CGGTCATTGA CTGGAGCGAG GCGATGTTCCG GGGATTCCCA  
 CCTGTTACCG GCGTATTGTC GCCAGTAACT GACCTCGCTC CGCTACAAGC CCCTAAGGGT

Y E V A N I F F W R P W L A C M E Q Q T  
 4921 ATACGAGGTC GCCAACATCT TCTTCTGGAG GCCGTGGTTG GCTTGTATGG AGCAGCAGAC  
 TATGCTCCAG CGGTTGTAGA AGAAGACCTC CGGCACCAAC CGAACATACC TCGTCGTCTG

R Y F E R R H P E L A G S P R L R A Y M  
 4981 GCGCTACTTC GAGCGGAGGC ATCCGGAGCT TGCAGGATCG CCGCGGCTCC GGGCGTATAT  
 CGCGATGAAG CTCGCCTCCG TAGGCCTCGA ACGTCCTAGC GGCGCCGAGG CCCGCATATA

L R I G L D Q L Y Q S L V D G N F D D A  
 5041 GCTCCGCATT GGTCTTGACC AACTCTATCA GAGCTTGTTT GACGGCAATT TCGATGATGC  
 CGAGGCGTAA CCAGAACTGG TTGAGATAGT CTCGAACCAA CTGCCGTTAA AGCTACTACG

A W A Q G R C D A I V R S G A G T V G R  
 5101 AGCTTGGGCG CAGGGTCGAT GCGACGCAAT CGTCCGATCC GGAGCCGGGA CTGTGGGGCG  
 TCGAACCCGC GTCCAGCTA CGCTGCGTTA GCAGGCTAGG CCTCGGCCCT GACAGCCCGC

T Q I A R R S A A V W T D G C V E V A S  
 5161 TACACAAATC GCCCGCAGAA GCGCGGCCGT CTGGACCGAT GGCTGTGTAG AAGTCGCGTC  
 ATGTGTTTAT CGGGCGTCTT CGCGCCGGCA GACCTGGCTA CCGACACATC TTCAGCGCAG

A F D Q A A R S R G H S N R R T A L R P  
 5221 TGCCTTCGAC CAGGCTGCGC GTTCTCGCGG CCATAGCAAC CGACGTACGG CGTTGCGCCC  
 ACGCAAGCTG GTCCGACGCG CAAGAGCGCC GGTATCGTTG GCTGCATGCC GCAACGCGGG

R R Q Q E A T E V R P E Q K M P T L L R  
 5281 TCGCCGGCAG CAAGAAGCCA CGGAAGTCCG CCCGGAGCAG AAAATGCCCA CGCTACTGCG  
 AGCGGCCGTC GTTCTTCGGT GCCTTCAGGC GGCCTCGTC TTTTACGGGT GCGATGACGC

V Y I D G P H G M G K T T T T Q L L V A  
 5341 GGTTTATATA GACGGTCCCC ACGGGATGGG GAAAACCACC ACCACGCAAC TGCTGGTGGC  
 CCAAATATAT CTGCCAGGGG TGCCCTACCC CTTTTGGTGG TGGTGCCTTG ACGACCACCG

FIG. 5J

L G S R D D I V Y V P E P M T Y W R V L  
 5401 CCTGGGTTCG CGCGACGATA TCGTCTACGT ACCCGAGCCG ATGACTTACT GCGGGGTGCT  
 GGACCCAAGC GCGCTGCTAT AGCAGATGCA TGGGCTCGGC TACTGAATGA CCGCCCACGA

G A S E T I A N I Y T T Q H R L D Q G E  
 5461 GGGGGCTTCC GAGACAATCG CGAACATCTA CACCACACAA CACCGCCTCG ACCAGGGTGA  
 CCCCCAAGG CTCTGTTAGC GCTTGTAGAT GTGGTGTGTT GTGGCGGAGC TGGTCCCCT

I S A G D A A V V M T S A Q I T M G M P  
 5521 GATATCGGCC GGGGACGCGG CGGTGGTAAT GACAAGCGCC CAGATAACAA TGGGCATGCC  
 CTATAGCCGG CCCCTGCGCC GCCACCATTA CTGTTCGCGG GTCTATTGTT ACCCGTACGG

Y A V T D A V L A P H I G G E A G S S H  
 5581 TTATGCCGTG ACCGACGCCG TTCTGGCTCC TCATATCGGG GGGGAGGCTG GGAGCTCACA  
 AATACGGCAC TGGCTGCGGC AAGACCGAGG AGTATAGCCC CCCCTCCGAC CCTCGAGTGT

A P P P A L T L I F D R H P I A A L L C  
 5641 TGCCCCGCC CCGGCCCTCA CCCTCATCTT CGACCGCCAT CCCATCGCCG CCCTCCTGTG  
 ACGGGCGGG GGCCGGGAGT GGGAGTAGAA GCTGGCGGTA GGGTAGCGGC GGGAGGACAC

Y P A A R Y L M G S M T P Q A V L A F V  
 5701 CTACCGGCC GCGCGGTACC TTATGGGCAG CATGACCCCC CAGGCCGTGC TGGCGTTCGT  
 GATGGGCCGG CGCGCCATGG AATACCCGTC GTACTGGGGG GTCCGGCACG ACCGCAAGCA

A L I P P T L P G T N I V L G A L P E D  
 5761 GGCCCTCATC CCGCCGACCT TGCCCGGCAC CAACATCGTG CTTGGGGCCC TTCCGGAGGA  
 CCGGGAGTAG GGCGGCTGGA ACGGGCCGTG GTTGTAGCAC GAACCCCGGG AAGGCCTCCT

R H I D R L A K R Q R P G E R L D L A M  
 5821 CAGACACATC GACCGCCTGG CCAAACGCCA GCGCCCCGGC GAGCGGCTGG ACCTGGCTAT  
 GTCTGTGTAG CTGGCGGACC GGTTTGCGGT CGCGGGGCCG CTCGCCGACC TGGACCGATA

L A A I R R V Y G L L A N T V R Y L Q C  
 5881 GCTGGCTGCG ATTCGCCGCG TTTACGGGCT ACTTGCCAAT ACGGTGCGGT ATCTGCAGTG  
 CGACCGACGC TAAGCGGCGC AAATGCCCGA TGAACGGTTA TGCCACGCCA TAGACGTCAC

FIG. 5K

G G S W R E D W G Q L S G T A V P P Q G  
 5941 CGGCGGGTCG TGGCGGGAGG ACTGGGGACA GCTTTCGGGG ACGGCCGTGC CGCCCCAGGG  
 GCCGCCCAGC ACCGCCCTCC TGACCCCTGT CGAAAGCCCC TGCCGGCAGC GCGGGGTCCC

A E P Q S N A G P R P H I G D T L F T L  
 6001 TGCCGAGCCC CAGAGCAACG CGGGCCCACG ACCCCATATC GGGGACACGT TATTTACCCT  
 ACGGCTCGGG GTCTCGTTGC GCCCGGGTGC TGGGGTATAG CCCCTGTGCA ATAAATGGGA

F R A P E L L A P N G D L Y N V F A W A  
 6061 GTTTCGGGCC CCCGAGTTGC TGGCCCCAA CGGCGACCTG TATAACGTGT TTGCCTGGGC  
 CAAAGCCCAG GGGCTCAACG ACCGGGGGTT GCCGCTGGAC ATATTGCACA AACGGACCCG

L D V L A K R L R S M H V F I L D Y D Q  
 6121 CTTGGACGTC TTGGCCAAAC GCCTCCGTTT CATGCACGTC TTTATCCTGG ATTACGACCA  
 GAACCTGCAG AACCGGTTTG CGGAGGCAAG GTACGTGCAG AAATAGGACC TAATGCTGGT

S P A G C R D A L L Q L T S G M V Q T H  
 6181 ATCGCCCGCC GGCTGCCGGG ACGCCCTGCT GCAACTTACC TCCGGGATGG TCCAGACCCA  
 TAGCGGGCGG CCGACGGCCC TCGGGGACGA CGTTGAATGG AGGCCCTACC AGGTCTGGGT

V T T P G S I P T I C D L A R T F A R E  
 6241 CGTCACCACC CCCGGCTCCA TACCGACGAT ATGCGACCTG GCGCGCACGT TTGCCCGGGA  
 GCAGTGGTGG GGGCCGAGGT ATGGCTGCTA TACGCTGGAC CGCGCGTGCA AACGGGCCCT

M G E A N \* (BGh pAn-)

6301 GATGGGGGAG GCTAACTGAG TCGAGAATTC GCTAGAGGGC CCTATTCTAT AGTGTCACCT  
 CTACCCCTC CGATTGACTC AGCTCTTAAG CGATCTCCCG GGATAAGATA TCACAGTGGA

6361 AAATGCTAGA GCTCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT  
 TTTACGATCT CGAGCGACTA GTCGGAGCTG ACACGGAAGA TCAACGGTCG GTAGACAACA

6421 TTGCCCTCC CCCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCCTG TCCTTTCCTA  
 AACGGGGAGG GGGCACGGAA GGAAGTGGGA CCTTCCACGG TGAGGGTGAC AGGAAAGGAT

6481 ATAAATGAG GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG  
 TATTTACTC CTTTAACGTA GCGTAACAGA CTCATCCACA GTAAGATAAG ACCCCCCACC

FIG. 5L

6541 GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG CGCAGGGCCC  
CCACCCCGTC CTGTCGTTCC CCCTCCTAAC CCTTCTGTTA TCGTCCGTAC GCGTCCCGGG

6601 AATTGCTCGA GCGGCCGCAA TAAAATATCT TTATTTTCAT TACATCTGTG TGTTGGTTTT  
TTAACGAGCT CGCCGGCGTT ATTTTATAGA AATAAAAGTA ATGTAGACAC ACAACCAAAA

6661 TTGTGTGAAT CGTAACTAAC ATACGCTCTC CATCAAAACA AAACGAAACA AAACAACTA  
AACACACTTA GCATTGATTG TATGCGAGAG GTAGTTTTGT TTTGCTTTGT TTTGTTTGAT

6721 GCAAAATAGG CTGTCCCCAG TGCAAGTGCA GGTGCCAGAA CATTCTCTA (SEQ ID NO:13)  
CGTTTTATCC GACAGGGGTC ACGTTCACGT CCACGGTCTT GTAAAGAGAT (SEQ ID NO:14)

Secuencia de aminoácidos IL13zetaquina (SEQ ID NO: 15)  
Secuencia de aminoácidos HyTK (SEQ ID NO: 16)

FIG. 6

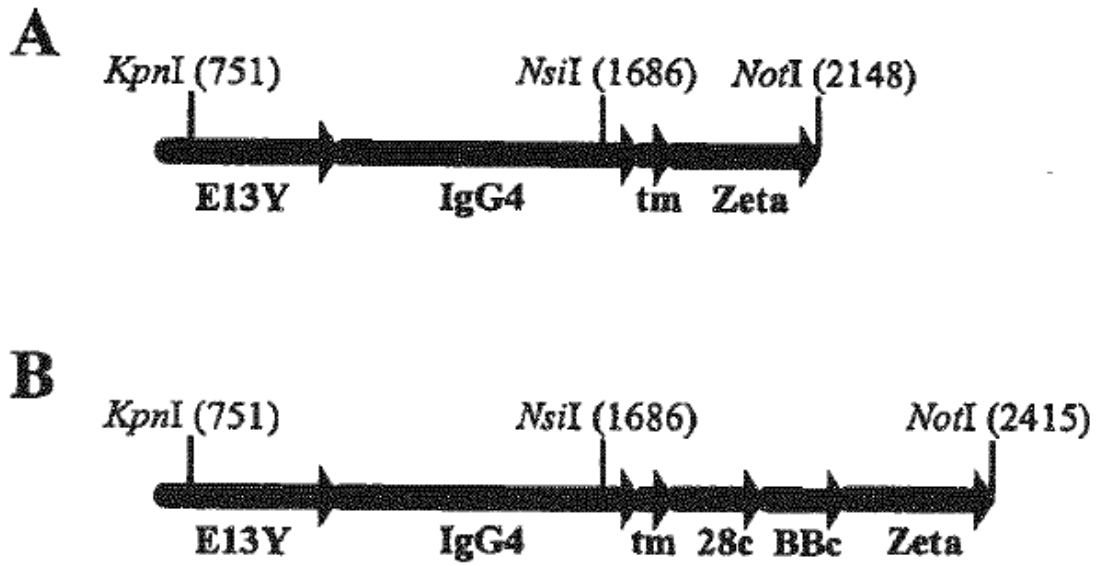


FIG. 7

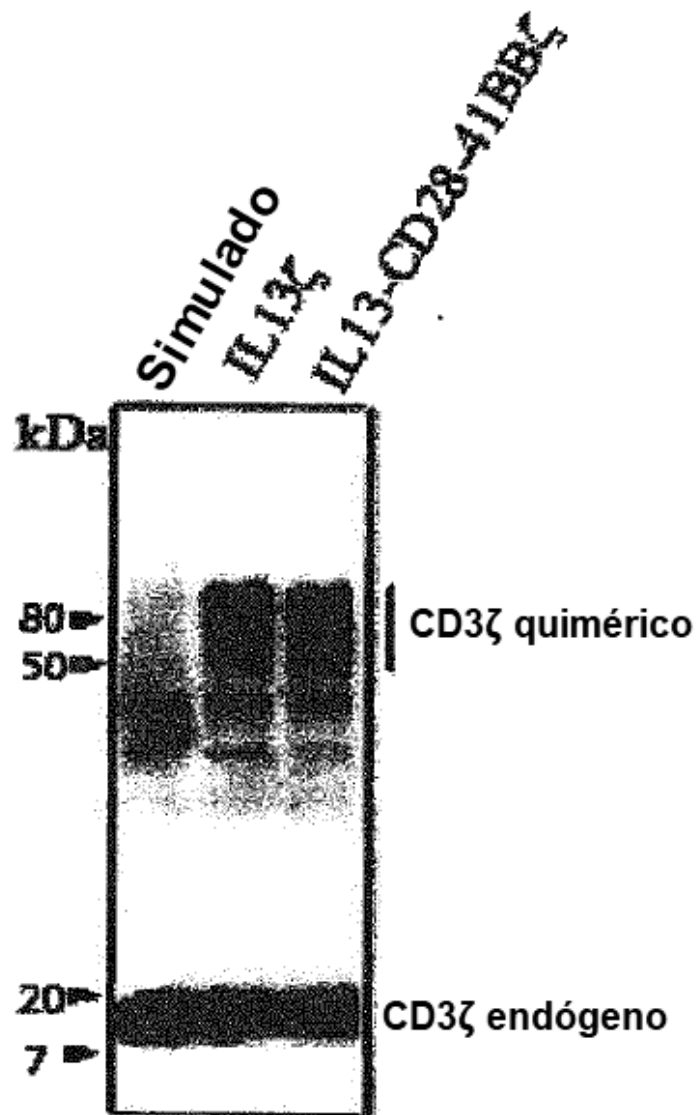


FIG. 8

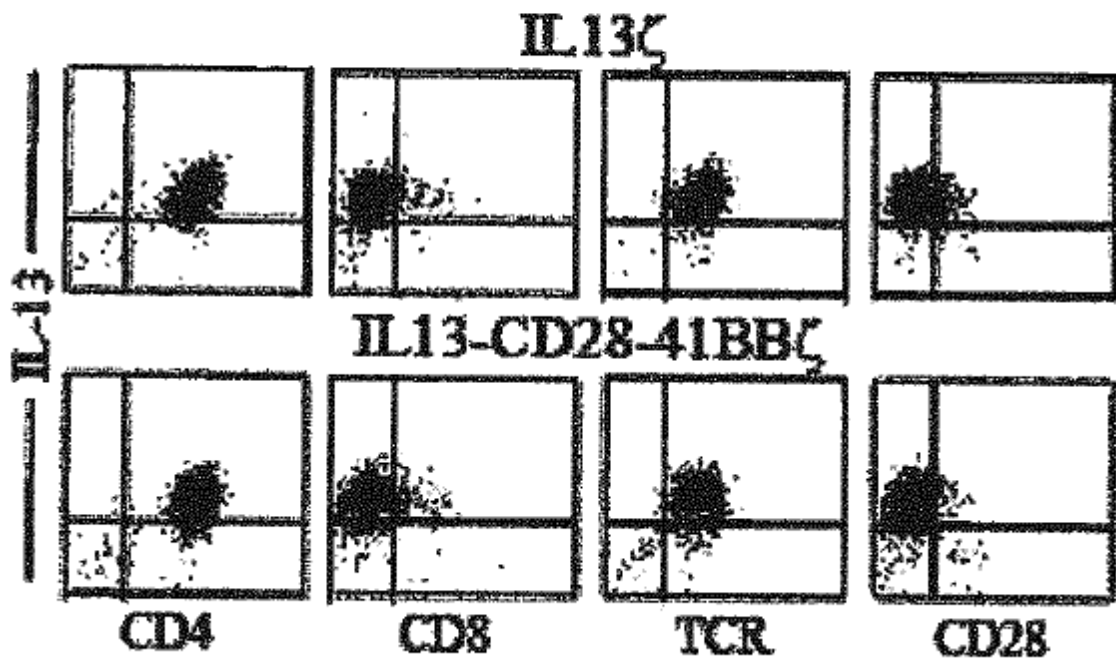


FIG. 9

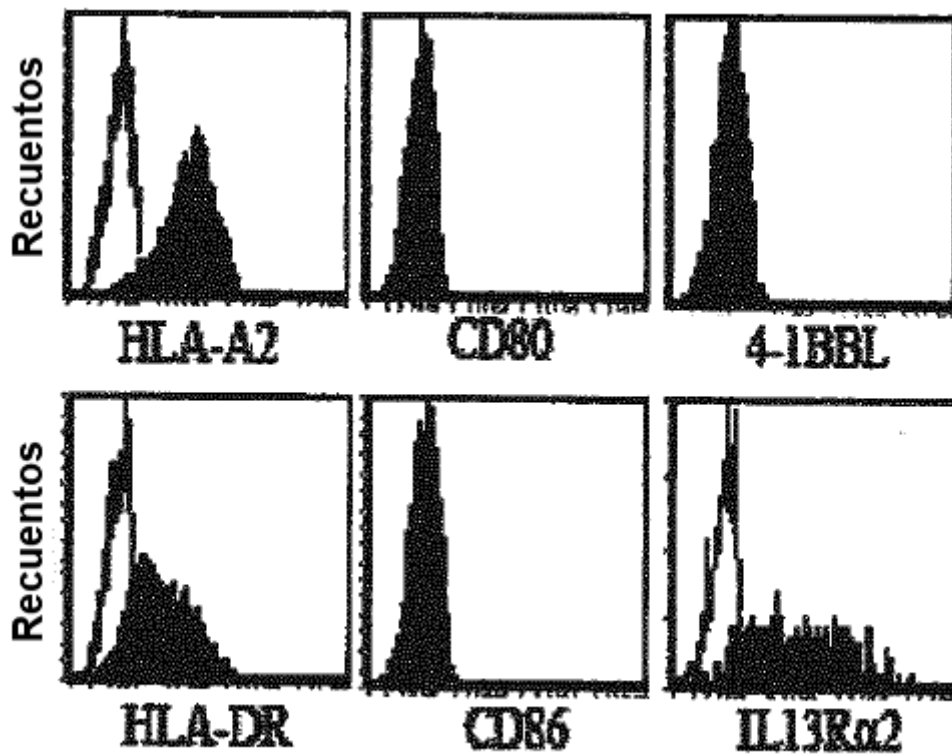




FIG. 10

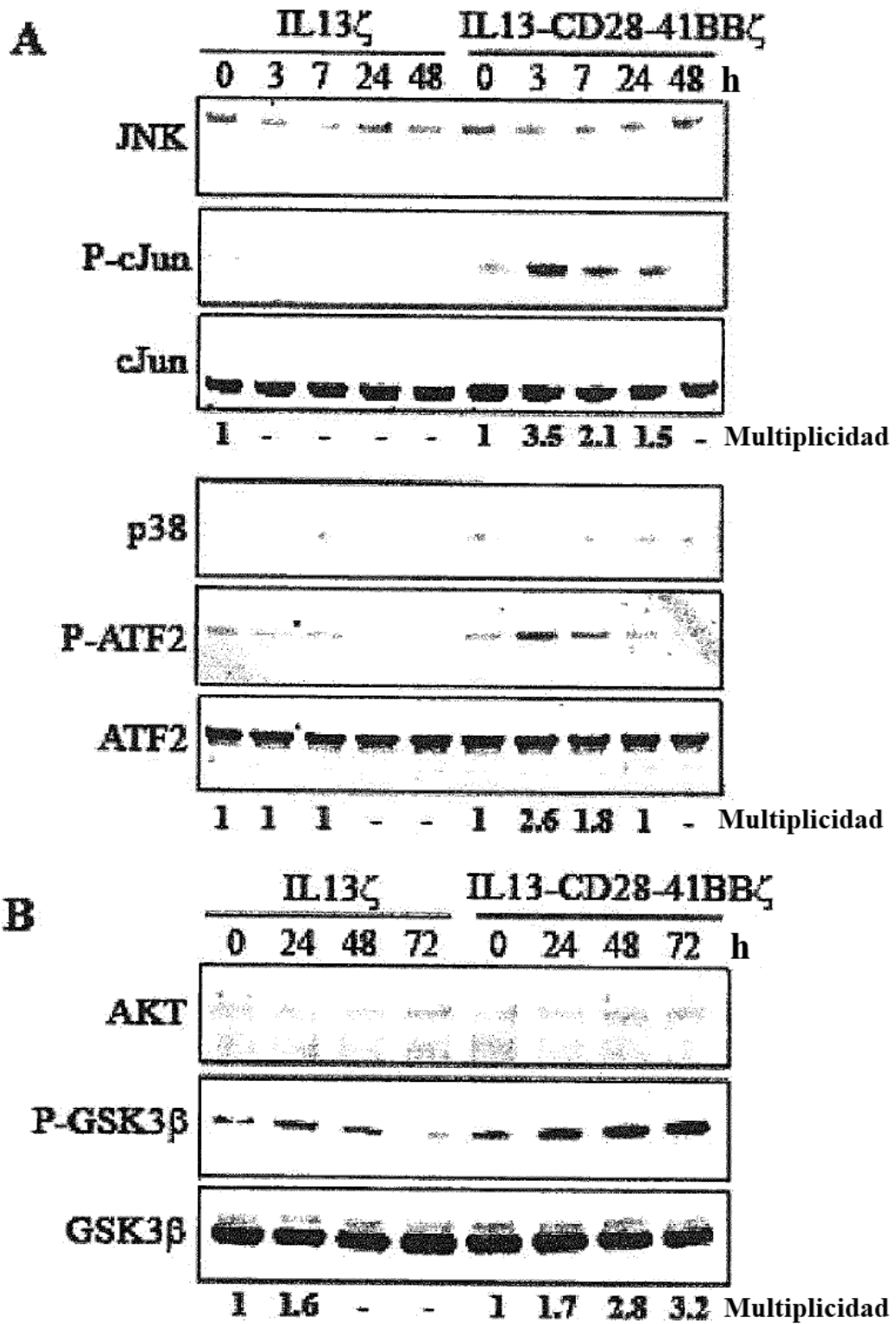


FIG. 11

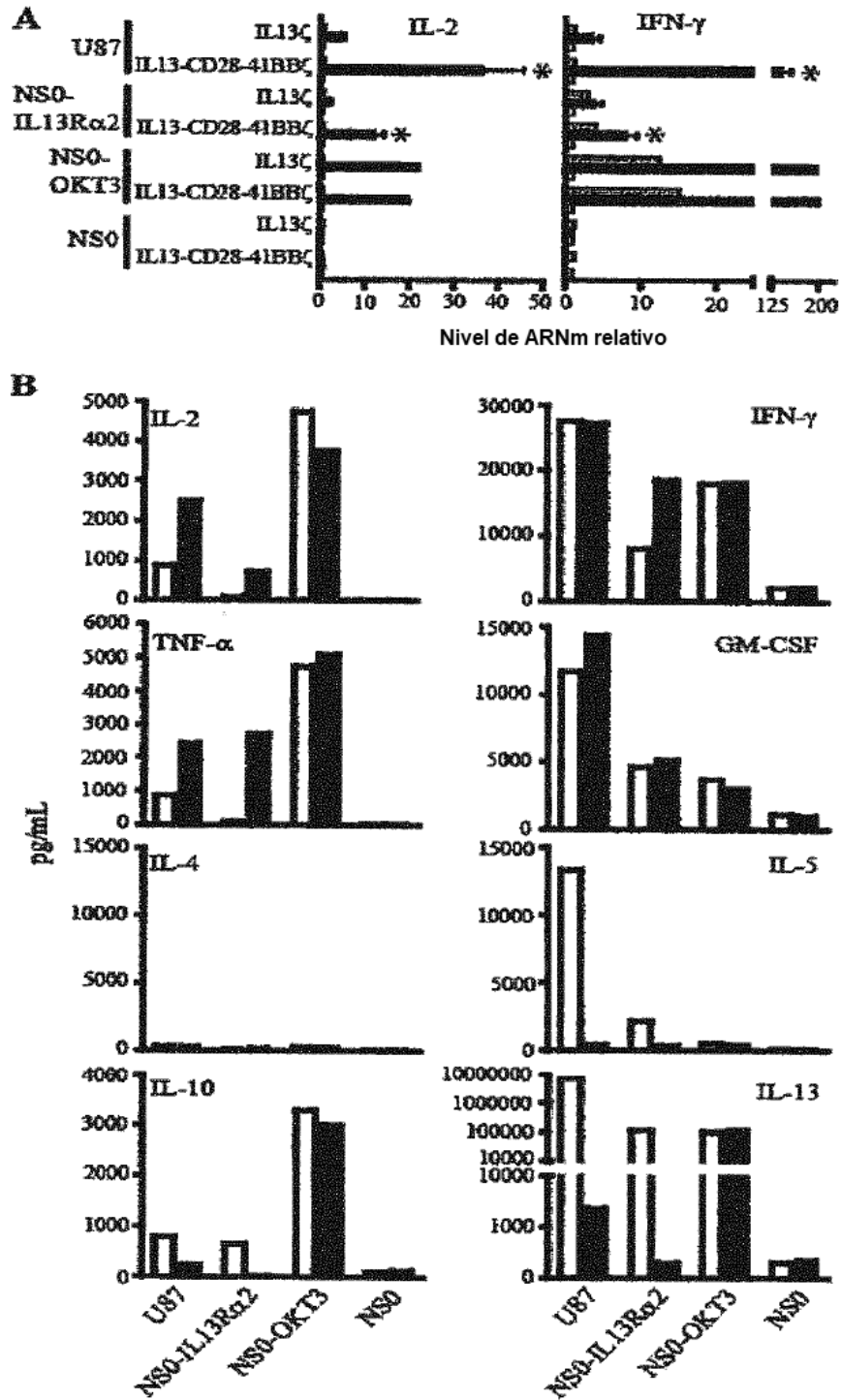


FIG. 12

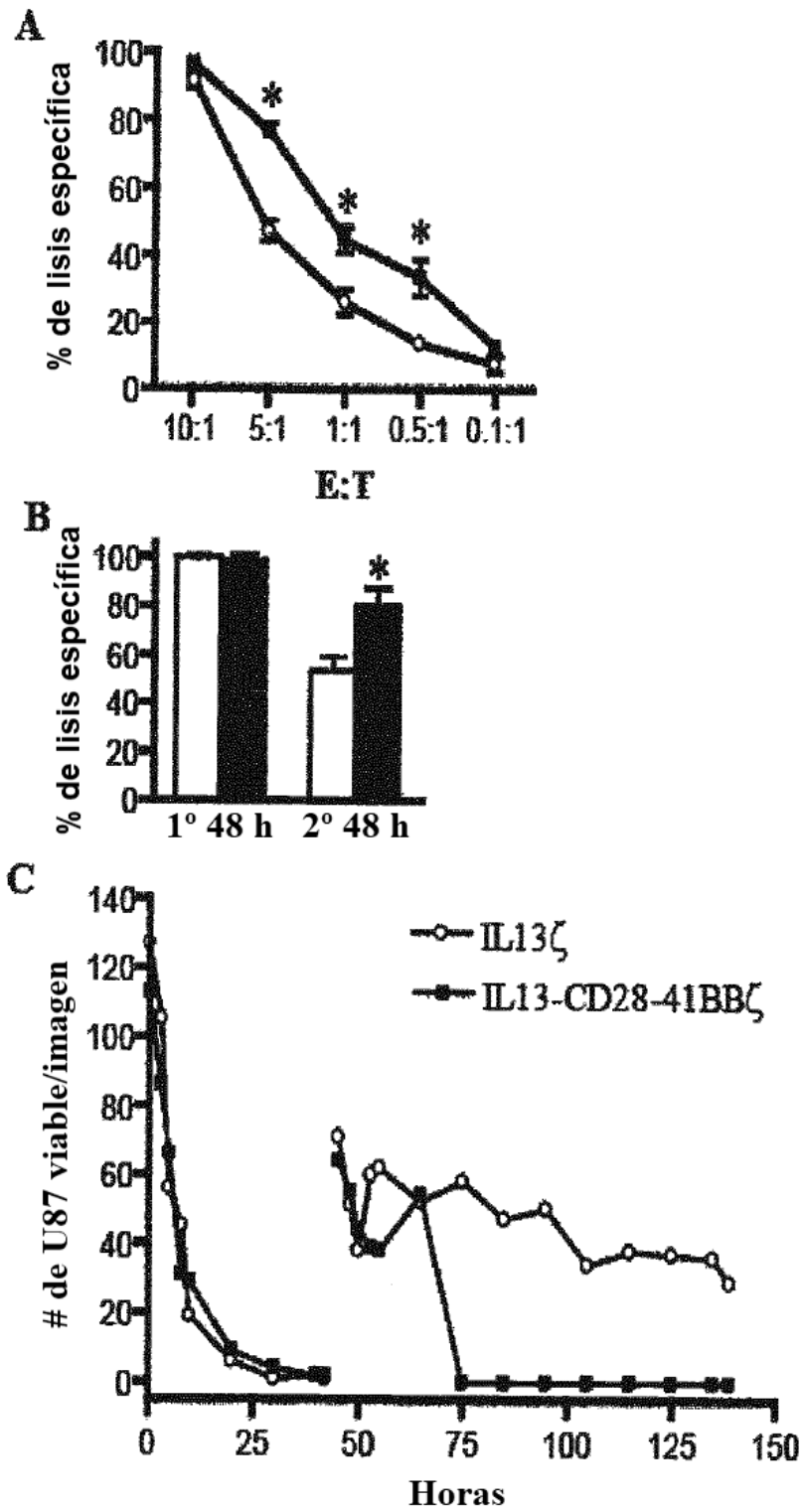
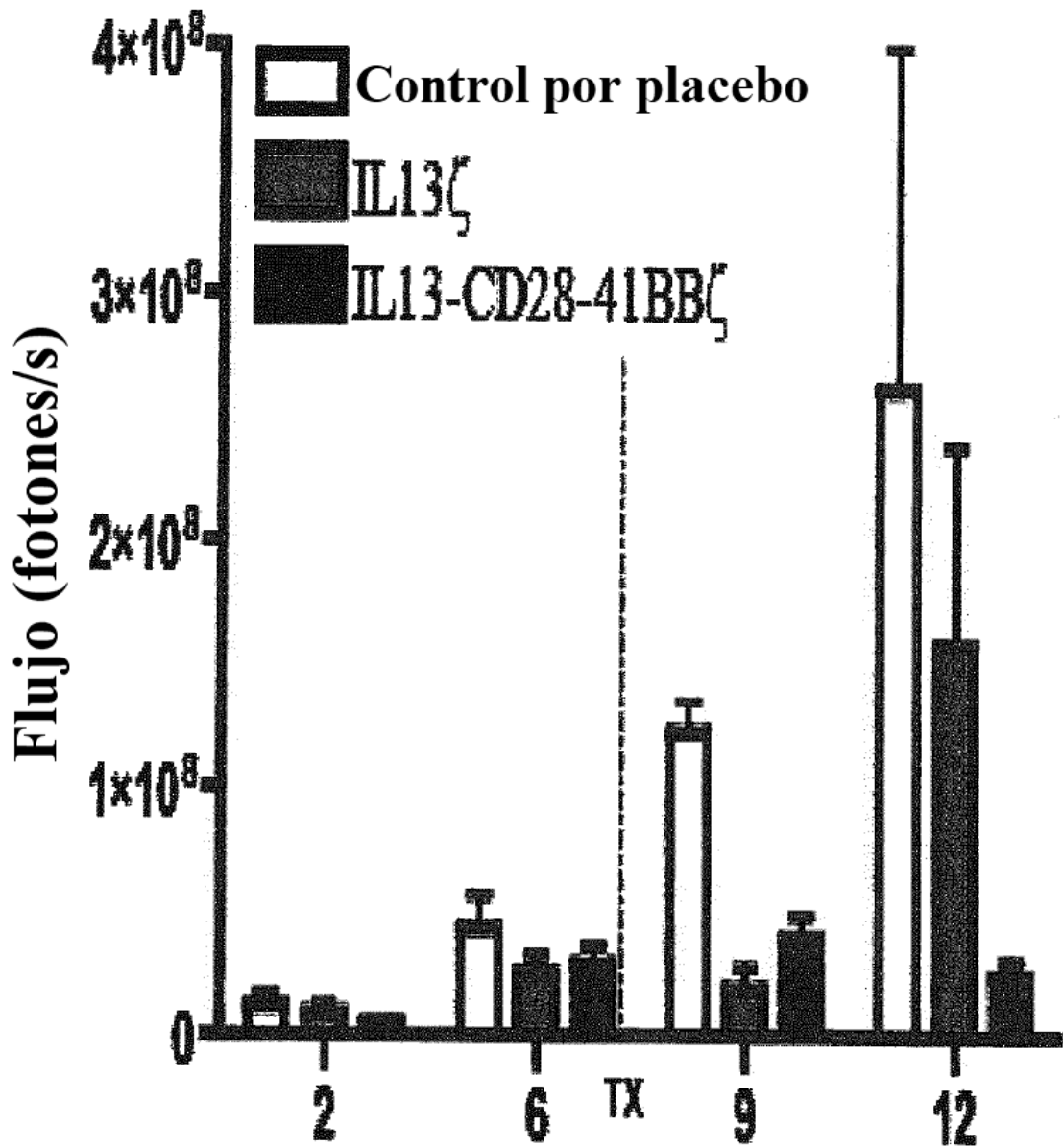


FIG. 13



Días después de inyección de tumor

FIG. 14

ATGCTGCTGC TGGTGACCAG  
 CCTGCTGCTG TGCAGCTGC CCCACCCCGC CTTTCTGCTG ATCCCTGGCC CCGTGCCCCC  
 TAGCACCGCC CTGCGCTACC TGATCGAGGA ACTGGTGAAC ATCACCCAGA ACCAGAAAGC  
 CCCCCTGTGC AACGGCAGCA TGGTGTGGAG CATCAACCTG ACCGCCGGCA TGTACTGTGC  
 CGCCCTGGAA AGCCTGATCA ACGTGAGCGG CTGCAGCGCC ATCGAGAAAA CCCAGCGGAT  
 GCTGTCCGGC TTCTGCCCCC ACAAGGTGTC CGCCGGACAG TTCAGCAGCC TGCACGTGCG  
 GGACACCAAG ATCGAGGTGG CCCAGTTCGT GAAGGACCTG CTGCTGCACC TGAAGAAGCT  
 GTTCCGGGAG GGCCGGTTCA ACGAGAGCAA GTACGGCCCT CCCTGCCCCC CTTGCCCTGC  
 CCCAGAGTTC CTGGGCGGAC CCAGCGTGT CTTGTTCCCC CCCAAGCCCA AGGACACCCT  
 GATGATCAGC CGGACCCCTG AGGTGACCTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC AGGAAGATCC  
 TGAGGTCCAG TTCAATTGGT ACGTGGACGG CGTGGAAGTG CACAACGCCA AGACCAAGCC  
 CAGAGAGGAA CAGTTCAACA GCACCTACCG GGTGGTGTCT GTGCTGACCG TGCTGCACCA  
 GGACTGGCTG AACGGCAAAG AATACAAGTG CAAGGTGTCC AACAAAGGGC TGCCCAGCAG  
 CATCGAAAAG ACCATCAGCA AGGCCAAGGG CCAGCCTCGC GAGCCCCAGG TGTACACCCT  
 GCCTCCCTCC CAGGAAGAGA TGACCAAGAA CCAGGTGTCC CTGACCTGCC TGGTGAAGGG  
 CTTTACCCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAC GGCCAGCCTG AGAACAACCTA  
 CAAGACCACC CCTCCCGTGC TGGACAGCGA CGGCAGCTTC TTCCTGTACA GCCGGCTGAC  
 CGTGGACAAG AGCCGGTGGC AGGAAGGCAA CGTCTTTAGC TGCAGCGTGA TGCACGAGGC  
 CCTGCACAAC CACTACACCC AGAAGAGCCT GAGCCTGTCC CTGGGCAAGA TGTCTGGGT  
 GCTGGTGGTG GTGGGCGGGG TGCTGGCCTG CTACAGCCTG CTGGTGACAG TGGCCTTCAT  
 CATCTTTTGG GTGCGGAGCA AGCGGAGCAG AGGCGGCCAC AGCGACTACA TGAACATGAC  
CCCCAGACGG CCTGGCCCCA CCCGGAAGCA CTACCAGCCC TACGCCCCAC CCAGGGACTT  
TGCCGCCTAC CGGTCCGGCG GAGGGCGGGT GAAGTTCAGC AGAAGCGCCG ACGCCCCTGC  
 CTACCAGCAG GGCCAGAATC AGCTGTACAA CGAGCTGAAC CTGGGCAGAA GGAAGAGTA  
 CGACGTCTTG GATAAGCGGA GAGGCCGGGA CCCTGAGATG GCGGCAAGC CTCGGCGGAA  
 GAACCCCCAG GAAGGCCTGT ATAACGAACT GCAGAAAGAC AAGATGGCCG AGGCCTACAG  
 CGAGATCGGC ATGAAGGGCG AGCGGAGGCG GGGCAAGGGC CACGACGGCC TGTATCAGGG  
 CCTGTCCACC GCCACCAAGG ATACCTACGA CGCCCTGCAC ATGCAGGCCC TGCCCCAAG  
 GTGA (SEQ ID NO:36)

FIG. 15

ATGCT TCTCCTGGTG ACAAGCCTTC TGCTCTGTGA GTTACCACAC  
 CCAGCATTCC TCCTGATCCC AGGCCCTGTG CCTCCCTCTA CAGCCCTCAG GGAGCTCATT  
 GAGGAGCTGG TCAACATCAC CCAGAACCAG AAGGCTCCGC TCTGCAATGG CAGCATGGTA  
 TGGAGCATCA ACCTGACAGC TGGCATGTAC TGTGCAGCCC TGGAAATCCCT GATCAACGTG  
 TCAGGCTGCA GTGCCATCGA GAAGACCCAG AGGATGCTGA GCGGATTCTG CCCGCACAAG  
 GTCTCAGCTG GGCAGTTTTC CAGCTTGCAT GTCCGAGACA CCAAAATCGA GGTGGCCCAG  
 TTTGTAAAGG ACCTGCTCTT ACATTTAAAG AAACTTTTTC GCGAGGGACG GTTCAACGAG  
 TCCAAATATG GTCCCCCATG CCCACCATGC CCAGCACCTG AGTTCCTGGG GGGACCATCA  
 GTCTTCCTGT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACTCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC  
 ACGTGCCTGG TGGTGGACGT GAGCCAGGAA GACCCCGAGG TCCAGTCAA CTGGTACGTG  
 GATGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTT CAACAGCACG  
 TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC  
 AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCG TCCTCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC  
 AAAGGGCAGC CCCGAGAGCC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCAGGA GGAGATGACC  
 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA CATCGCCGTG  
 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGCTGGAC  
 TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAGG CTAACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGGAG  
 GGGAATGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACACAGAAG  
 AGCCTCTCCC TGCTCTGGG TAAAATGGCC CTGATTGTGC TGGGGGGCGT CGCCGGCCTC  
 CTGCTTTTCA TTGGGCTAGG CATCTTCTTC AGGAGTAAGA GGAGCAGGCT CCTGCACAGT  
GACTACATGA ACATGACTCC CCGCCGCCCT GGGCCCACCC GCAAGCATT CCAGCCCTAT  
GCCCCACCAC GCGACTTCGC AGCCTATCGC TCCGGAGGTG GCAAACGGGG CAGAAAGAAA  
**CTCCTGTATA TATTCAAACA ACCATTTATG AGACCAGTAC AAACACTCA AGAGGAAGAT**  
**GGCTGTAGCT GCCGATTTCC AGAAGAAGAA GAAGGAGGAT GTGAACTGGG** AGGTGGCAGA  
 GTGAAGTTCA GCAGGAGCGC AGACGCCCCC GCGTACCAGC AGGGCCAGAA CCAGCTCTAT  
 AACGAGCTCA ATCTAGGACG AAGAGAGGAG TACGATGTTT TGGACAAGAG ACGTGGCCGG  
 GACCCTGAGA TGGGGGGAAA GCCGAGAAGG AAGAACCCTC AGGAAGGCCT GTACAATGAA  
 CTGCAGAAAG ATAAGATGGC GGAGGCCTAC AGTGAGATTG GGATGAAAGG CGAGCGCCGG  
 AGGGGCAAGG GGCACGATGG CCTTTACCAG GGTCTCAGTA CAGCCACCAA GGACACCTAC  
 GACGCCCTTC ACATGCAGGC CCTGCCCCCT CGCTGA (SEQ ID NO:37)

FIG. 16

AT GCTTCTCCTG GTGACAAGCC TTCTGCTCTG TGAGTTACCA  
 CACCCAGCAT TCCTCCTGAT CCCAGGCCCT GTGCCTCCCT CTACAGCCCT CAGGTACCTC  
 ATTGAGGAGC TGGTCAACAT CACCCAGAAC CAGAAGGCTC CGCTCTGCAA TGGCAGCATG  
 GTATGGAGCA TCAACCTGAC AGCTGGCATG TACTGTGCAG CCCTGGAATC CCTGATCAAC  
 GTGTCAGGCT GCAGTGCCAT CGAGAAGACC CAGAGGATGC TGAGCGGATT CTGCCC GCAC  
 AAGGTCTCAG CTGGGCAGTT TTCCAGCTTG CATGTCCGAG ACACCAAAT CGAGGTGGCC  
 CAGTTTGTAAG AGGACCTGCT CTTACATTTA AAGAACTTT TTCGCGAGGG ACGGTTCAAC  
 GAGTCCAAAT ATGGTCCCC ATGCCACCA TGCCAGCAC CTGAGTTCCT GGGGGACCA  
 TCAGTCTTCC TGTTCCCC AAAACCCAAG GACACTCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG  
 GTCACGTGCG TGGTGGTGGA CGTGAGCCAG GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC  
 GTGGATGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA GTTCAACAGC  
 ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG  
 TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC CCGTCCTCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAA  
 GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA GCCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCA GGAGGAGATG  
 ACCAAGAACC AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC  
 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCAGCC TCCCCTGCTG  
 GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AGGCTAACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG  
 GAGGGGAATG TCTTCTCATG CTCCGTGATG CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACACAG  
 AAGAGCCTCT CCCTGTCCCT AGGTAAATTT TGGGTGCTGG TGGTGGTTGG TGGAGTCTG  
GCTTGCTATA GCTTGCTAGT AACAGTGGCC TTTATTATTT TCTGGGTGAG GAGTAAGAGG  
 AGCAGGCTCC TGCACAGTGA CTACATGAAC ATGACTCCCC GCCGCCCGG GCCACCCGC  
 AAGCATTACC AGCCCTATGC CCCACCACGC GACTTCGCAG CCTATCGCTC CAGGGACCAG  
**AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT GGGGGAGGCA GTTCCGGAC CCCCATCCAA**  
**GAGGAGCAGG CCGACGCCCA CTCCACCCTG GCCAAGATCA GAGTGAAGTT CAGCAGGAGC**  
GCAGACGCCC CCGCGTACCA GCAGGGCCAG AACCAGCTCT ATAACGAGCT CAATCTAGGA  
CGAAGAGAGG AGTACGATGT TTTGGACAAG AGACGTGGCC GGGACCCTGA GATGGGGGGA  
AAGCCGAGAA GGAAGAACCC TCAGGAAGGC CTGTACAATG AACTGCAGAA AGATAAGATG  
GCGGAGGCCT ACAGTGAGAT TGGGATGAAA GCGAGCGCC GGAGGGGCAA GGGGCACGAT  
GGCCTTACC AGGGTCTCAG TACAGCCACC AAGGACACCT ACGACGCCCT TCACATGCAG  
GCCCTGCCCC CTCGCTGA (SEQ ID NO:38)

FIG. 17

ATGCTTCTCC TGGTGACAAG CCTTCTGCTC TGTGAGTTAC CACACCCAGC ATTCCTCCTG  
 ATCCCAGGCC CTGTGCCTCC CTCTACAGCC CTCAGGTACC TCATTGAGGA GCTGGTCAAC  
 ATCACCCAGA ACCAGAAGGC TCCGCTCTGC AATGGCAGCA TGGTATGGAG CATCAACCTG  
 ACAGCTGGCA TGTA CTGTGC AGCCCTGGAA TCCCTGATCA ACGTGT CAGG CTGCAGTGCC  
 ATCGAGAAGA CCCAGAGGAT GCTGAGCGGA TTCTGCCCGC ACAAGGTCTC AGCTGGGCAG  
 TTTTCCAGCT TGCATGTCCG AGACACCAA AATCGAGGTGG CCCAGTTTGT AAAGGACCTG  
 CTCTTACATT TAAAGAAACT TTTTCGCGAG GGACGGTTCA ACGAGTCCAA ATATGGTCCC  
 CCATGCCCAC CATGCCCAGC ACCTGAGTTC CTGGGGGGAC CATCAGTCTT CCTGTTCCCC  
 CCAAACCCA AGGACACTCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACGTG CGTGGTGGTG  
 GACGTGAGCC AGGAAGACCC CGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGATGG CGTGGAGGTG  
 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC  
 GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AACGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC  
 AACAAAGGCC TCCCCTCCTC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA  
 GAGCCACAGG TGTA CACCCT GCCCCATCC CAGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGT CAGC  
 CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT  
 GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCCTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC  
 TTCCTCTACA GCAGGCTAAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGGAGGGGAA TGTCTTCTCA  
 TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACAC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCC  
 CTAGGTAAAA TGTTTTGGGT GCTGGTGGTG GTTGGTGGAG TCCTGGCTTG CTATAGCTTG  
 CTAGTAACAG TGGCCTTTAT TATTTTCTGG GTGAGGAGTA AGAGGAGCAG GGGCGGACAC  
AGTGACTACA TGAACATGAC TCCCCGCCG CCTGGGCCCA CCCGCAAGCA TTACCAGCCC  
TATGCCCCAC CACGCGACTT CGCAGCCTAT CGCTCCGGAG GTGGCAAACG GGGCAGAAAG  
**AAACTCCTGT ATATATTCAA ACAACCATTT ATGAGACCAG TACAACTAC TCAAGAGGAA**  
**GATGGCTGTA GCTGCCGATT TCCAGAAGAA GAAGAAGGAG GATGTGAACT GGGAGGTGGC**  
 AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC CCCGCTACC AGCAGGGCCA GAACCAGCTC  
 TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC  
 CGGGACCCTG AGATGGGGGG AAAGCCGAGA AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT  
 GAACTGCAGA AAGATAAGAT GGC GGAGGCC TACAGTGAGA TTGGGATGAA AGGCGAGCGC  
 CGGAGGGGCA AGGGGCACGA TGGCCTTTAC CAGGGTCTCA GTACAGCCAC CAAGGACACC  
 TACGACGCC TTCACATGCA GGCCCTGCC CCTCGCTGA (SEQ ID NO:39)



FIG. 18

ATGCTTCTCC TGGTGACAAG CCTTCTGCTC  
 TGTGAGTTAC CACACCCAGC ATTCCTCCTG ATCCCAGGCC CTGTGCCTCC CTCTACAGCC  
 CTCAGGTACC TCATTGAGGA GCTGGTCAAC ATCACCCAGA ACCAGAAGGC TCCGCTCTGC  
 AATGGCAGCA TGGTATGGAG CATCAACCTG ACAGCTGGCA TGTACTGTGC AGCCCTGGAA  
 TCCCTGATCA ACGTGTGAGG CTGCAGTGCC ATCGAGAAGA CCCAGAGGAT GCTGAGCGGA  
 TTCTGCCCCG ACAAGGTCTC AGCTGGGCAG TTTTCCAGCT TGCATGTCCG AGACACCAAA  
 ATCGAGGTGG CCCAGTTTGT AAAGGACCTG CTCTTACATT TAAAGAACT TTTTCGCGAG  
 GGACGGTTCA ACGAGTCCAA ATATGGTCCC CCATGCCAC CATGCCAGC ACCTGAGTTC  
 CTGGGGGGAC CATCAGTCTT CCTGTTCCCC CCAAACCCA AGGACACTCT CATGATCTCC  
 CGGACCCCTG AGGTCACGTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC AGGAAGACCC CGAGGTCCAG  
 TTCAACTGGT ACGTGGATGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG  
 CAGTTCAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG  
 AACGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCCGTCCCTC CATCGAGAAA  
 ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAGCCACAGG TGTACACCCT GCCCCCATCC  
 CAGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTACCCC  
 AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCAGC  
 CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAGGCTAAC CGTGGACAAG  
 AGCAGGTGGC AGGAGGGGAA TGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC  
 CACTACACAC AGAAGAGCCT CTCCTGTCC CTAGGTAAAA TGTTTTGGGT GCTGGTGGTG  
 GTTGGTGGAG TCCTGGCTTG CTATAGCTTG CTAGTAACAG TGGCCTTTAT TATTTTCTGG  
GTGAGGAGTA AGAGGAGCAG GGGCGGACAC AGTGACTACA TGAACATGAC TCCCGCCGC  
CCTGGGCCCA CCCGCAAGCA TTACCAGCCC TATGCCCCAC CACGCGACTT CGCAGCCGGA  
**GGTGGCGGAG GTGGCAAACG GGGCAGAAAG AACTCCTGT ATATATTCAA ACAACCATTT**  
**ATGAGACCAG TACAACTAC TCAAGAGGAA GATGGCTGTA GCTGCCGATT TCCAGAAGAA**  
**GAAGAAGGAG GATGTGAACT GGGAGGTGGC AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC**  
 CCCGCGTACC AGCAGGGCCA GAACCAGCTC TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG  
 GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC CGGGACCCTG AGATGGGGGG AAAGCCGAGA  
 AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT GAACTGCAGA AAGATAAGAT GGCGGAGGCC  
 TACAGTGAGA TTGGGATGAA AGGCGAGCGC CGGAGGGGCA AGGGGCACGA TGGCCTTTAC  
 CAGGGTCTCA GTACAGCCAC CAAGGACACC TACGACGCC TTCACATGCA GGCCCTGCCC  
 CCTCGCTGA (SEQ ID NO:40)